



VICTOR ANGELO MARTINS MONTALLI

**“ESTUDO DO IMUNOFENÓTIPO DOS ADENOMAS DE CÉLULAS BASAIS
(ENFATIZANDO SUA RELAÇÃO COM AS LESÕES DO DUCTO
INTERCALADO) E DAS CÉLULAS MIOEPITELIAIS INFLUENCIADAS POR
FATORES DO MICROAMBIENTE TUMORAL”**

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

VICTOR ANGELO MARTINS MONTALLI

**“ESTUDO DO IMUNOFENÓTIPO DOS ADENOMAS DE CÉLULAS BASAIS
(ENFATIZANDO SUA RELAÇÃO COM AS LESÕES DO DUCTO
INTERCALADO) E DAS CÉLULAS MIOEPITELIAIS INFLUENCIADAS POR
FATORES DO MICROAMBIENTE TUMORAL”**

Orientadora: Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Co-orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Ferreira Martinez

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO VICTOR ANGELO
MARTINS MONTALLI E ORIENTADO PELA PROFA. DRA.
ALBINA MESSIAS DE ALMEIDA MILANI ALTEMANI.**

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M761e Montalli, Victor Angelo Martins, 1987-
Estudo do imunofenótipo dos adenomas de células basais (enfatizando sua relação com as lesões do ducto intercalado) e das células mioepiteliais influenciadas por fatores do microambiente tumoral / Victor Angelo Martins Montalli. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Albina Messias De Almeida Milani Altemani.
Coorientador: Elizabeth Ferreira Martinez.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias das glândulas salivares. 2. Imunoistoquímica. 3. Técnicas de cultura de células. I. Altemani, Albina Messias De Almeida Milani, 1953-. II. Martinez, Elizabeth Ferreira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the immunoprofile of basal cell adenoma (emphasizing its relation to intercalated duct lesion) and myoepithelial cells influenced by factors in the tumor microenvironment

Palavras-chave em inglês:

Salivary gland neoplasms

Immunohistochemical

Techniques of cell culture

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Albina Messias De Almeida Milani Altemani [Orientador]

Ney Soares de Araujo

Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

Maria Leticia Cintra

Fernanda Viviane Mariano

Data de defesa: 23-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

VICTOR ANGELO MARTINS MONTALLI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ALBINA MESSIAS DE ALMEIDA MILANI ALTEMANI

Co-Orientador (a) PROF(A). DR(A). ELIZABETH FERREIRA MARTINEZ

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). ALBINA MESSIAS DE ALMEIDA MILANI ALTEMANI



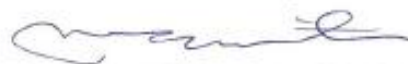
2. PROF(A). DR(A). NEY SOARES DE ARAUJO



3. PROF(A). DR(A). SUZANA CANTANHEDE ORSINI MACHADO DE SOUSA



4. PROF(A). DR(A). MARIA LETÍCIA CINTRA



5. PROF(A). DR(A). FERNANDA VIVIANE MARIANO



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 23 de abril de 2014

Dedico esta Tese de Doutorado aos meus queridos e amados pais, Angelo Fernandes Montalli e Luci Aparecida Martins Montalli e ao meu companheiro irmão Gabriel Angelo Martins Montalli. Nós somos um! Conseguimos, juntos! Obrigado por serem meu alicerce e também o meu refúgio.

AGRADECIMENTOS

Nesse momento posso colocar em palavras toda a gratidão que tenho por tantas pessoas que me ajudaram e apoiaram durante o período do Doutorado e da vida.

Mas, primeiramente, quero agradecer a Deus, pelo dom da vida e Se fazer presente em todos os momentos.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Reitor, Prof. Dr. José Tadeu Jorge e ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, a Coordenadora de Pós-Graduação Profa. Dra. Marilisa Mantovani Guerreiro, a Coordenadora da área de Concentração, Dra. Liliana Andrade, a secretária da Pós-Graduação Marcinha, tão prestativa em todos os momentos que precisei e também a secretária do Departamento de Anatomia Patológica responsável pelos assuntos da Pós-Graduação, a querida Maria do Carmo.

Sou grato também a minha Instituição de formação, a Faculdade São Leopoldo Mandic, na pessoa do Diretor Geral, Prof. Dr. José Luiz Cintra Junqueira por acreditar em mim e proporcionar a realização de uma etapa do nosso trabalho de tese. Meu muito obrigado com grande admiração, orgulho e respeito.

Meu agradecimento e admiração eterna à minha Orientadora, a Profa. Dra. Albina Altemani, por proporcionar tantas oportunidades que tive durante esse período. Seu profissionalismo, caráter e dedicação são características que me espelho. Agradeço pelos estímulos, pelas conversas, conselhos e conhecimentos transmitidos. Como sempre digo: essa é apenas uma etapa que está finalizando, mas espero poder continuar trabalhando e aprendendo com a senhora!

Também com eterna admiração e gratidão, quero agradecer a Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo por ter me inserido na “vida patológica”, convidando-me para o Mestrado e conduzindo-me também no Doutorado. Poder conviver com a senhora e com o Prof. Dr. Ney Soares de Araújo, que também agradeço o aceite em participar da minha banca, é um privilégio. A determinação, estímulo e amor em ensinar são características que também levarei para minha vida. Os senhores são um exemplo em todos os aspectos para mim! Meu muito obrigado!

Agradeço a Profa. Dra. Elizabeth Ferreira Martinez, minha co-orientadora, pela oportunidade em utilizar as dependências do laboratório de Cultura de Células da Faculdade São Leopoldo Mandic, sob sua responsabilidade. Pelo delineamento e ajuda durante as fases do experimento e pela oportunidade de aprendizado, convivência e também por ser seu assistente na Disciplina de Microbiologia. Aqui reforço meus sentimentos de admiração, com votos de muitas realizações acadêmicas e pessoais!

Agradeço a todos os Professores do Departamento de Anatomia Patológica, em especial a Profa. Dra. Maria Letícia Cintra, por aceitar fazer parte da banca de defesa, bem como, todos os funcionários e residentes, que sempre me sanaram qualquer dúvida. Aos atenciosos Adilson Piazza, Elisabeth Justi Rodrigues, Dario Silva, Felipe Billis, Flávia, Mayara Rodrigues Sérgio Cardoso (*in memoriam*), Tainá e Viviane Ubiali, muito obrigado! É importante destacar e agradecer em especial às técnicas do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP, que sem elas não teríamos conseguido: Aretuza de Souza, Ana Cláudia Piazza e Luzia Alves, muito obrigado por todo profissionalismo, paciência, ajuda e carinho que recebi durante esses anos!

À Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, por aceitar o convite em fazer parte da banca de defesa do Doutorado. É uma honra tê-la nesse momento. Muito obrigado!

Aos colegas de Pós-Graduação da UNICAMP, pelos momentos de risadas, conversas e conhecimentos trocados: Ana Flávia Costa, Camila Gómez, Erika Egal, Harim Tavares, Letícia Fogagnolo e a Profa. Dra. Fernanda Viviane Mariano, pela amizade e por ter aceitado o convite em compor a banca de defesa de Doutorado. E aos colegas de Pós-Graduação da São Leopoldo Mandic, pela amizade e apoio em todos os momentos: a minha querida amiga Dra. Carolina Barcellos Silva e ao casal que tanto gosto, Marcelo Sperandio e Amy Brown.

Quero agradecer também à equipe da São Leopoldo Mandic, o Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Jr, Coordenador do curso de graduação em Odontologia pela oportunidade de também ser seu assistente na Disciplina de Histologia, ao Prof. Dr. Paulo de Camargo Moraes, responsável pela Disciplina de Estomatologia, por ser um exemplo de humanidade, profissionalismo e dedicação. Reitero aqui minha eterna admiração! Aos Professores e amigos do Instituto de Pesquisa, Profa. Dra. Ana Paula Dias, Profa. Dra. Andresa Soares, Profa. Dra. Daiane Peruzzo, Prof. Dr. Fabricio Passador-Santos e Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga e as eficientes e dedicadas funcionárias: Rita de Cássia Alves, as queridas Nadir Freitas e Jeruza Bossonaro pelo carinho de sempre, muito obrigado! E às “meninas” do laboratório de Cultura de Células, que foram por vezes meu braço direito e esquerdo durante essa jornada, Pollyanna Montaldi e Vanessa Araújo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por conceder a bolsa de Doutorado, processo nro. 2011/10366-7 e viabilizar financeiramente

a aquisição de equipamentos e materiais para realização desta pesquisa, por meio do auxílio à pesquisa processo nro. 2011/51112-8.

Sou grato a equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FCM-UNICAMP, por sempre ter sido bem recebido em todas as coletas que fiz para o banco de tumores. Esta foi uma oportunidade de experiência e aprendizado. Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Santos Martins, Prof. Dr. Alfio José Tincani, Prof. Dr. André Del Negro, e Dr. André Del Maion Casarim, o ex-residente Dr. Daniel Guarda Manso e o atual, Dr. Bruno.

À minha família, meus pais e meu irmão, por compreenderem minha ausência em momentos tão importantes que passamos. Agradeço o estímulo em continuar olhando para a frente, pelo amor incondicional e o total apoio em todos os momentos. Obrigado por me amarem tanto!

Faltam-me palavras para agradecer à pessoa que é responsável por me fazer ver de maneira diferente a vida, completando algumas lacunas que faltavam, a minha Mariana, por compreender e me estimular sempre! Obrigado, obrigado, obrigado! Agradeço também a toda sua família, em especial seus pais, Sr. Gilson Raeder e Sra. Osmaíra Raeder por me receberem como filho e ao seu irmão Tomás Raeder, que são pessoas que tenho muito carinho e respeito.

Aos meus familiares que me deram apoio quando precisei em Campinas, minha avó Nair, minhas tias Lígia, Lucia, Marisa, Lili e primos e também à minha cunhada Natália Navarini.

Aos amigos de Foz do Iguaçu, cidade que amo e aos amigos de Campinas – vocês são muito importantes na minha vida! Muito obrigado pela sincera amizade!

Por fim, agradeço a todos, que de uma maneira ou outra colaboraram para esta etapa tão importante da minha vida!

*“Mude suas opiniões,
mantenha seus princípios.
Troque suas folhas,
mantenha suas raízes.”*

Victor Hugo

RESUMO

As lesões salivares tumorais compostas por dupla população celular (epitelial e mioepitelial) são consideradas originárias do ducto intercalado e estas lesões são subdivididas em diversas entidades que apresentam sobreposição morfológica, com delimitações entre elas nem sempre nítidas. Entre as neoplasias benignas estão o adenoma pleomórfico (AP) e o adenoma de células basais (ACB). Recentemente foi descrita uma nova entidade tumoral benigna, com composição epitelial e mioepitelial, denominada de lesão do ducto intercalado (LDI). Diante disso, o nosso **primeiro objetivo** foi analisar os perfis morfológicos e imuno-histoquímicos de LDIs e ACBs classificados em tubulares (ACB-T) e não tubulares (ACB-NT) para verificar se as LDIs e ACB-Ts representam entidades distintas. Ainda, dado o papel crítico da célula mioepitelial na morfogênese das lesões tumorais salivares histogeneticamente relacionadas ao ducto intercalado, nosso **segundo objetivo** foi avaliar *in vitro* a influência de fatores do microambiente tumoral (proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento) sobre a morfologia, viabilidade e proliferação de células mioepiteliais advindas de AP. Para a análise morfológica e imuno-histoquímica, foram estudados oito casos de LDIs, nove ACBs-T e 19 ACBs-NT. Todos os ACB-T continham áreas LDI-like, enquanto nos ACB-NT estas eram raras e escassas. As células luminais das LDIs e ACBs-T exibiram positividade para CK7, lisozima, S100 e DOG1. No grupo ACB-NT, poucas células luminais mostraram tal expressão, sendo principalmente positivas para CK14. As células mioepiteliais das LDIs, ACB-T e ACB-NT foram positivas para CK14, calponina, AML e p63, mas essas eram mais numerosas nos ACBs. No estudo *in vitro*, a morfologia e diferenciação das células mioepiteliais foram avaliadas qualitativamente por imunofluorescência indireta (expressão da vimentina e AML, respectivamente). As células mioepiteliais exibiram morfologia poliédrica em todas as matrizes, independentemente da suplementação do fator de crescimento. AML foi imunoexpressa de forma heterogênea nas células mioepiteliais, porém houve aumento da expressão desta proteína quando acrescentado o TGF- β 1, independentemente do tipo de matriz usada. TGF- β 1 também aumentou significativamente a viabilidade das células mioepiteliais cultivadas na matriz fibronectina. **Conclusões:** as LDI, ACB-T e ACB-NT formam um *continuum* de lesões onde as LDIs estão estreitamente relacionadas com o ACB-T, visto que em ambos o imunofenótipo das células luminais e mioepiteliais é semelhante àquele observado nos ductos intercalados. A principal diferença entre LDI e ACB-T é a quantidade de células mioepiteliais, que é maior no último. Além disso, nossos resultados indicam que pelo menos alguns ACBs podem surgir via LDI. Os estudos em cultura de células sugerem que as diferentes matrizes celulares não influenciam a morfologia e diferenciação da célula mioepitelial. Dentre os fatores de crescimento estudados apenas TGF- β 1 associou-se com aumento da expressão de AML (diferenciação celular) e aumentou significativamente a viabilidade celular associado à matriz fibronectina.

ABSTRACT

Salivary tumor lesions composed of dual cell population (epithelial and myoepithelial) are considered to originate from the intercalated duct. These lesions are subdivided into several entities that share morphological features. Among the benign tumors are pleomorphic adenomas (PA) and basal cell adenoma (BCA). Recently, a new entity was described that is a benign tumor with epithelial and myoepithelial composition, called intercalated duct lesion (IDL). Our **first objective** was to analyze the morphological and immunohistochemical profiles of IDLs and BCAs classified into tubular (T-BCA) and non-tubular subtypes (NT-BCA), to determine whether or not IDL and tubular BCA represent distinct entities. Also, given the critical role of myoepithelial cells in the morphogenesis of the salivary tumor lesions histogenetically related to the intercalated duct, our **second objective** was to evaluate *in vitro* the influence of tumor microenvironment factors (extracellular matrix proteins and growth factors) on the morphology, viability and proliferation of myoepithelial cells arisen from PA . Eight IDLs, nine tubular BCAs and 19 non-tubular BCAs were studied by immunohistochemical technique. All tubular BCAs contained IDL-like areas, which represented 20-70% of the tumor. In non-tubular BCA, IDL-like areas were occasional and small (<5%). One patient presented IDLs, tubular BCAs and IDL/tubular BCA combined lesions. Luminal ductal cells of IDLs and tubular BCAs exhibited positivity for CK7, lysozyme, S100 and DOG1. In the non-tubular BCA group, few luminal cells exhibited such immunoprofile; they were mainly CK14-positive. Basal/myoepithelial cells of IDLs, tubular BCAs and non-tubular BCAs were positive for CK14, calponin, α -SMA and p63; they were more numerous in BCA lesions. The *in vitro* study analyzed morphology and differentiation of myoepithelial cells by vimentin and SMA expressions, respectively, which were qualitatively assessed using indirect immunofluorescence. Myoepithelial cells showed polyhedral morphology in all extra cellular matrixes regardless of the supplementation of growth factors. These cells expressed SMA heterogeneously but when TGF- β 1 was added such expression increased. This modification did not show relationship with the type of extracellular matrix. The viability of myoepithelial cells cultured on fibronectin matrix increased significantly with addition of TGF - β 1. **Conclusions:** IDL, tubular BCA and non-tubular BCA form a continuum of lesions in which IDLs are related closely to tubular BCA. In both, the immunoprofile of luminal and myoepithelial cells recapitulates the normal intercalated duct. The difference between the adenoma-like subset of IDLs and tubular BCA rests mainly on the larger numbers of myoepithelial cells in the latter. Our findings indicate that at least some BCAs can arise via IDLs. The cell culture studies suggest that the different matrixes do not influence the morphology and differentiation of myoepithelial cells. Among the growth factors studied, only TGF - β 1 was associated with an increased expression of SMA (cell differentiation) and a significant increase of the cellular viability associated with the fibronectin matrix.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 – Revisão dos casos relatados na literatura sobre o perfil imuno-histoquímico do Adenoma de Células Basais.....	24
Tabela 2 – Perfil imuno-histoquímico do ducto intercalar normal, das Lesões do Ducto Intercalado (LDI) e dos Adenomas de Células Basais (ACB).....	27
Tabela 3 - Características contrastantes de lesões dos ductos intercalares e adenomas de células basais.....	28
Tabela 4 - Anticorpos utilizados nos testes imuno-histoquímicos, com as diluições utilizadas e fornecedores.....	37
Tabela 5 – Painel de anticorpos utilizados para caracterização da linhagem de células mioepiteliais do adenoma pleomórfico.....	37
Figura 1 - Linhagem de células mioepiteliais benignas de Adenoma Pleomórfico.....	38
Tabela 6 - Aspectos clínico-patológicos das LDIs.....	43
Tabela 7 - Aspectos clínico-patológicos dos ACBs.....	44
Figura 2 - Caso 6.....	46
Figura 3 - LDIs e seus diferentes aspectos.....	47
Gráfico 1 - Idade (média±desvio padrão) dos casos de LDI, ACB-T e ACB-NT.....	48
Gráfico 2 - Tamanho em mm (média±desvio padrão) dos casos de LDI, ACB-T e ACB-NT.....	48
Figura 4 - ACB-Te ACB-NT.....	50
Figura 5 - Aspecto histoquímico e imuno-histoquímicos das glândulas salivares normais.....	52
Tabela 8 - Achados histoquímicos e imuno-histoquímicos das LDIs e ACBs.....	53
Figura 6 - PAS com diastase.....	54
Figura 7 - LDI, ACB-T e ACB-NT: Expressão de Lisozima, S100, DOG-1 e CK7.....	55
Tabela 9 - Expressões de PAS, Lisozima, Proteína S-100 e CK14 nos casos de LDI, ACB-T e ACB-NT.....	56
Figura 8 – LDI, ACB-T e ACB-NT: Expressão de CK14, AML e p63.....	57
Figura 9 - Aspectos morfológicos e imunofenotípicos das células mioepiteliais cultivadas em diferentes substratos e sem fatores de crescimento.....	59

Figura 10 - Aspectos morfológicos e imunofenotípicos das células mioepiteliais cultivadas em diferentes substratos e EGF.	60
Figura 11 -. Aspectos morfológicos e imunofenotípicos das células mioepiteliais cultivadas em diferentes substratos e TGF- β 1	61
Gráfico 3 - Média \pm DP da triplicata dos grupos nos tempos de 24, 48 e 72h.	62
Gráfico 4 - Curva de crescimento das células mioepiteliais nos tempos avaliados: 24, 48 e 72h A) EGF; B) TGF- β 1	63
Gráfico 5 - Curva de crescimento das células mioepiteliais cultivadas em poliestireno e nas matrizes Matrigel, Fibronectina e Colágeno tipo I com o acréscimo de EGF.....	64
Gráfico 6 - Viabilidade celular com o teste MTT nos tempos de 24, 48 e 72h.	65
Gráfico 7 – Viabilidade celular com o teste MTT nos tempos avaliados: 24, 48 e 72h A) EGF: 5, 10 e 20 ng/mL; B) TGF- β 1: 5, 10 e 20ng/mL.....	65
Gráfico 8 – Viabilidade celular com o teste MTT das células mioepiteliais cultivadas em polietireno (controle) e nas matrizes Matrigel, Fibronectina e Colágeno tipo I com o acréscimo de EGF - 20 ng/mL (A) e TGF- β 1 20 ng/mL nos tempos avaliados: 24, 48 e 72h.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB – Adenoma de Células Basais

ACB-NT – Adenoma de Células Basais túbulo-trabeculares e sólidos

ACB-T – Adenoma de Células Basais predominantemente tubular

ADI – Adenoma do Ducto Intercalado

AP – Adenoma Pleomórfico

CME – Células Mioepiteliais

CXAP – Carcinoma Ex Adenoma Pleomórfico

DMEM – Meio Essencial Mínimo Modificação Dulbecco

EGF – *Epidermal growth factor*

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HDI – Hiperplasia do Ducto Intercalado

HE – Hematoxilina e Eosina

LDI – Lesão do Ducto Intercalado

N/D – Não disponível

PAS – Ácido periódico de Schiff

PBS – Solução de tampão fosfato

PBSA – Tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TGF- β 1 – *Transforming growth factor 1*

Vim – Vimentina

α - AML – Alfa Actina de Músculo Liso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1 ADENOMA DE CÉLULAS BASAIS (ACB).....	23
3.2 LESÕES DO DUCTO INTERCALADO (LDI).....	24
3.3 CÉLULAS MIOEPITELIAIS.....	29
3.4 FATORES DE CRESCIMENTO (EGF E TGF- β1).....	31
3.5 Matrizes extracelulares (Matrigel, Fibronectina e Colágeno tipo I).....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5. RESULTADOS.....	43
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO 1 – Aprovação do CEP/FCM UNICAMP.....	84

1 INTRODUÇÃO

A estrutura fundamental da glândula salivar é a unidade acinar-ductal, sendo que o sistema ductal é subdividido em três segmentos: intercalado, estriado e excretório. O ducto intercalado é a porção terminal deste sistema e é revestido por dupla camada de células: ductal (luminal) e mioepitelial (a mais externa). Os tumores salivares com esta dupla diferenciação celular (adenomas pleomórfico e de células basais e carcinomas epitelial-mioepitelial, adenóide cístico e de células basais) são considerados originários deste ducto (Chetty, 2000).

Além desses tumores classicamente relacionados ao ducto intercalado, recentemente, foram descritas outras proliferações ductais denominadas de Lesões do Ducto Intercalado (LDI), compreendendo tanto hiperplasias como adenomas. Do ponto imuno-histoquímico, as LDIs compartilham com o ducto normal o mesmo padrão de expressão para CK 7, lisozima e receptor de estrógeno, porém diferem em relação à proteína S-100, que é difusamente expressa somente nas LDI. Estas lesões não raro estão associadas a outros tumores, particularmente ao adenoma de células basais (ACB) (42 %), sugerindo uma possível relação entre os ACBs e as LDIs (Weinreb et al 2009). Interessantemente, as LDIs, além de se associarem ao ACB, também podem apresentar focos morfológicamente semelhantes ao ACB e, ocasionalmente, a hiperplasia do ducto intercalado pode estar combinada ao adenoma (ACB sólido e hiperplasia do ducto intercalado), com área transicional entre eles (Weinreb et al. 2009).

O ACB apresenta vários padrões de crescimento (tubular, trabecular, sólido e membranoso), sendo que mais de um pode estar presente num dado tumor, embora usualmente com predominância de um deles (Araújo, 2005). Dentre os padrões de

crescimento do ACB, o tubular é o que mais se assemelha morfológicamente às LDIs. Na literatura há ilustrações de ACB tipo tubular e de outros adenomas que foram denominados de adenoma ductal e adenoma túbulo-alveolar que mostram aspecto morfológico semelhante aquele descrito no adenoma do ducto intercalado (Pulitzer et al., 1985; Dardick, 1995; Zarbo et al. 2000). Esta sobreposição de morfologia entre o ACB (particularmente do tipo tubular) e as recém descritas LDIs, adicionado ao fato do perfil imuno-histoquímico dos ACBs e suas variantes ter sido ainda pouco explorado (Takahashi et al. 1991, Zarbo et al. 2000, Machado de Sousa et al. 2001) levou-nos a estudá-lo, com ênfase na variante tubular e sua possível relação com as LDIs.

Os ACBs também compartilham semelhanças morfológicas com os adenomas pleomórficos (APs), que são as neoplasias benignas mais comuns das glândulas salivares (Auclair, Ellis, 1996). Em alguns casos, a distinção entre ACB e AP é subjetiva e possivelmente sem um consenso, mesmo entre especialistas em neoplasias salivares (Auclair, Ellis, 1996; Zarbo et al., 2000). Alguns autores acreditam que os adenomas salivares pertencem a um espectro, onde ACB e AP difeririam essencialmente no tipo e quantidade de matriz extracelular produzida pelas células mioepiteliais (Zarbo et al., 2000). Nos APs a matriz seria predominantemente formada por proteoglicanas de sulfato de condroitina e no ACB por elementos da membrana basal.

Em todas as variantes do ACB têm sido detectadas células mioepiteliais neoplásicas, porém é na túbulo-trabecular que essas células apresentam participação mais proeminente. (Zarbo et al., 2000; Araújo, 2005). As células mioepiteliais neoplásicas caracterizam-se por ter uma grande diversidade morfológica, que se reflete no seu imunofenótipo (Ogawa, 2003). O imunofenótipo do citoesqueleto da célula mioepitelial é

complexo e ainda não completamente compreendido, acreditando-se que, possivelmente, sinalizações externas advindas da matriz extracelular ou de fatores de crescimento poderiam modificá-lo (Savera et al., 1997). Dado o papel crítico da célula mioepitelial na morfogênese dos diferentes adenomas salivares histogeneticamente relacionados ao ducto intercalado, o segundo objetivo do nosso estudo é ampliar o conhecimento sobre os fatores que influenciam o imunofenótipo e a secreção destas células.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Comparar o perfil histoquímico e imuno-histoquímico do Adenoma de Células Basais com o das lesões do ducto intercalado (Objetivo A).

Avaliar *in vitro* a influência de fatores do microambiente tumoral (proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento) sobre as células mioepiteliais (Objetivo B).

Objetivos específicos:

Objetivo A) Em uma série de LDIs e ACBs subdivididos em predominantemente tubulares (ACB-T) e túbulo-trabeculares e sólidos (ACB-NT):

- a) Analisar a expressão imuno-histoquímica de lisozima, proteína S-100, citoqueratinas 7, 14, actina músculo liso, calponina, p63 e DOG-1 e histoquímica do Ácido Periódico de Schiff (PAS) com diastase nos componentes epitelial e mioepitelial dos tumores.
- b) Comparar a expressão dos marcadores (descritos no item anterior) nos diferentes subtipos de ACBs com a dos ductos intercalados normais e LDIs.

Objetivo B) Em cultura de células:

Avaliar *in vitro* a influência de proteínas da matriz extracelular (Matrigel, Fibronectina, Colágeno tipo I) e fatores de crescimento (EGF e TGF- β 1) sobre a morfologia, imunofenótipo, proliferação e viabilidade das células mioepiteliais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ADENOMA DE CÉLULAS BASAIS (ACB)

Corresponde a cerca de 2% de todos os tumores salivares, ocorre em frequências semelhantes entre homens e mulheres e acomete principalmente entre a quarta e nona décadas da vida e cerca de 70% afeta a parótida e 20% o lábio superior (Araújo, 2005). O ACB caracteriza-se por proliferação de células com aparência basalóide e pela ausência do estroma mixocondróide, que é característico do adenoma pleomórfico. São classificados em sólido, trabecular, tubular e membranoso (Mărgăritescu et al., 2005). O tipo membranoso é uma variante com características distintas, e é também denominado de tumor análogo da derme. Este subtipo do ACB ocorre predominantemente em homens (90%), é frequentemente multifocal, não encapsulado e pode estar associado com tumores de anexos cutâneos, tais como: cilindroma, tricoepitelioma e espiroadenoma écrino. Os outros tipos de ACB apresentam-se como nódulo único, encapsulado ou bem delimitado (Gardner, Daley, 1983; Yu et al., 1998; Araújo, 2005).

Os ACB são compostos por dois tipos celulares: a) as pequenas (mioepiteliais ou basais), com núcleos hipercromáticos, dispostas em paliçada na periferia dos cordões e ilhotas tumorais e b) as maiores poligonais (epiteliais), com núcleo mais claro, localizadas mais centralmente (Machado de Souza et al., 2001). Na variante sólida, as células são predominantemente do tipo pequeno, dispostas em aglomerados densos, com paliçada na periferia e, ocasionalmente, com diferenciação escamosa. Nas variantes trabecular e tubular, as células estão dispostas em cordões / trabéculas, sendo que o estroma apresenta padrão vascular proeminente (Takahashi et al., 1991). As células epiteliais do padrão tubular podem exibir aspecto reminiscente de célula acinar, com poucos grânulos

eosinófilos no pólo luminal. Na variante membranosa, as ilhotas epiteliais são circundadas por material hialino, que corresponde a replicações de membrana basal, tornando-o muito semelhante ao cilindroma da derme. Este material hialino também pode ser observado dentro das ilhotas tumorais (Yu et al., 1998).

Há poucos estudos sobre o perfil imuno-histoquímico do ACB e estes estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Revisão dos casos relatados na literatura sobre o perfil imuno-histoquímico do Adenoma de Células Basais.

Autores	Ano	Número de casos	Anticorpos utilizados
Takahashi et al.	1991	7	<i>S-100, S-100α, S-100β, α_1-AT, α_1-ACT, CEA, Actina, NSE, KLI, PKK1, PKK2, PKK3, Vimentina, GFAP, VIP</i>
Yu et al.	1998	12	<i>S-100, Actina, Fibronectina, Laminina, Colágeno tipo IV, KLI, CK-MNF</i>
Machado de Souza et al.	2001	3	<i>CK7, CK8, CK14, CK 13, CK19, Actina de músculo liso, Vimentina</i>
Edwards et al.	2004	11	<i>p63</i>
Mărgăritescu et al.	2005	4	<i>S-100, AE1/AE3, CK19, CEA, Actina de músculo liso, Vimentina, PCNA</i>
Paker et al.	2010	1	<i>S-100, Actina de músculo liso, Calponina, GFAP, p63, AE1/AE3, CK14, CK7, EMA, ki-67, p53</i>

3.2 LESÕES DO DUCTO INTERCALADO (LDI)

O epitélio do ducto intercalado tem grande potencial regenerativo, de tal modo que hiperplasia regenerativa deste ducto é observada numa série de condições clínico-patológicas, tais como sialadenite crônica, oclusão de ductos glandulares, irradiação e tumores (Yu, Donath 2001). Em relação aos tumores, Di Palma (1994) descreveu, pela

primeira vez, a associação do carcinoma epitelial-mioepitelial com hiperplasia do ducto intercalado (HDI), sendo que esta associação foi posteriormente reforçada por Chetty (2000) e Weinreb et al. (2009). Na série de Weinreb et al. (2009) o carcinoma epitelial-mioepitelial foi o segundo tipo de tumor que mais frequentemente se associou com HDI (3 tumores em 19 LDI), enquanto que o ACB foi a primeiro (8 /19). Baseada nessas associações tem sido sugerido que as LDI seriam, possivelmente, lesões precursoras destes dois tumores (Di Palma, 1994; Chetty, 2000; Weinreb et al., 2009).

Nas lesões do ducto intercalado, os ductos proliferados apresentam padrão de crescimento compacto, com muito pouco estroma entre eles, tendo de permeio algumas células acinares (serosas ou mucosas) residuais do parênquima salivar (Yu, Donath 2001; Weinreb et al., 2009). Os ductos, embora sejam revestidos por dupla camada celular (ductal e mioepitelial), aparentam ser formados apenas pelas ductais, visto que as mioepiteliais são geralmente pouco perceptíveis na coloração rotineira por hematoxilina e eosina. A HDI tende a expandir o lóbulo da glândula salivar e não contem células adiposas ou inflamatórias no interior da lesão (Weinreb et al., 2009). Baseada na morfologia dos ductos proliferados, Yu & Donath (2001) identificaram as fases evolutivas do processo, onde nos estágios precoces da proliferação ductal, as células acinares perdem gradativamente seus grânulos secretórios e adquirem aparência semelhante a do epitélio do ducto intercalado. Estes autores denominaram esse processo de desdiferenciação das células acinares e propuseram haver uma relação entre a atrofia do ácino e a proliferação dos ductos.

A HDI distingue-se do adenoma de ducto intercalado (ADI) por ser uma proliferação ductal não encapsulada, enquanto que o adenoma é uma lesão nodular, arredondada, parcialmente ou completamente encapsulada, com contornos bem definidos

(Weinreb et al., 2009). Entretanto, há também lesões híbridas, as quais apresentam aspecto de adenoma intimamente associados com áreas de hiperplasia, sugerindo ser transicionais entre adenoma e hiperplasia (Weinreb et al., 2009).

Quanto ao perfil imuno-histoquímico, como mencionado anteriormente, as LDI apresentam fortes semelhanças com o ducto intercalado normal, sendo que a principal diferença está na positividade para proteína S-100 nas células luminares das LDI e sua ausência nos ductos normais (Tabela 2). Recentemente, foi descrito que o anticorpo anti-DOG-1 identifica células acinares e luminares do ducto intercalado, tanto normais como nas LDIs (Chenevert et al., 2012). O gene DOG-1, também conhecido como TMEM16a ou ANO1, é um gene expresso em uma variedade de tecidos normais e tumorais, inicialmente descrito no GIST e usado para diferenciar tumores gastrointestinais de outros tumores mesenquimais (Caputo et al., 2008). Suas propriedades sugerem um papel importante em células exócrinas, tais como as da glândula salivar e tumores derivados destes tipos de células (West et al., 2004).

Tabela 2 – Perfil imuno-histoquímico do ducto intercalar normal, das Lesões do Ducto Intercalado (LDI) e dos Adenomas de Células Basais (ACB).

<i>Anticorpos</i>	Ducto Intercalar normal (DIN)	Lesão do Ducto Intercalado (LDI)	Adenoma de Células Basais (ACB)
<i>Células ductais</i>			
CK18	+	+	+
KL-1	+	+	+
Lactoferrina	++	++	+
Lisozima	+	+	+
Amilase	-	-	-
CK7	+	+	+
S100	-	+	+
receptores de estrógeno	+	+	+
receptores de progesterona	-	-	-
<i>Células mioepiteliais</i>			
Actina de Músculo Liso	-	-	+
Calponina	+	+	+
CK14	+	+	+
Vimentina	+	+	+

-, negativo; +, positivo; ++, fortemente positivo.

Devido ao fato das LDIs e os ACBs mostrarem alguma sobreposição tanto morfológica como de perfil imuno-histoquímico, na série de Weinreb et al. (2009), os autores especificaram as diferenças (Tabela 3) que auxiliariam a distinguir as duas entidades.

Tabela 3 - Características contrastantes de lesões dos ductos intercalares e adenomas de células basais

Característica	Lesão do Ducto Intercalado	Adenoma de Células Basais
Tamanho Padrão / Borda	Usualmente < 5mm Irregular ou encapsulado	Usualmente > 10 mm Usualmente circunscrito e encapsulado
Presença de células acinares	Frequente, especialmente em lesões irregulares	Raro
Dupla camada	Imperceptível ou focalmente visível	Óbvia e domina lesões
Estroma com células fusiformes	Ausente	Comum
Mudança cística, secreções luminais, cribriforme, com material semelhante da lamina basal	Focal, ocasionais	Comum
Expressão da Citoqueratina 7 nas células luminais	Difuso em 100% dos casos	Inconsistente e desigual
Expressão dos receptores de estrógeno e lisozima	Presente focalmente na maioria, ocasionalmente difusa	Presente focalmente na minoria e apenas em células isoladas, na maioria
Expressão da proteína S100 nas células luminais	Difusa em 73% dos casos	Inconsistente e desigual quando presente
Expressão da proteína S100 na camada externa	Ausente	Forte nas células fusiformes do estroma
Expressão da Citoqueratina 14 na camada externa	Presente difusamente em células mioepiteliais	Proeminente marcação de Citoqueratina 14 nas grandes células basais na camada externa
Expressão da Calponina na camada externa	Presente difusamente em células mioepiteliais	Inconsistente e desigual.

Fonte: Weinreb et al., 2009.

3.3 CÉLULAS MIOEPITELIAIS

As células mioepiteliais têm sido alvo de inúmeras pesquisas, uma vez que participam também do processo neoplásico, benigno e maligno, da maioria dos tumores envolvendo as glândulas salivares (Gudjonsson et al., 2005).

Em mama, algumas pesquisas têm enfatizado a importância destas células no comportamento das neoplasias, evidenciando o papel das células mioepiteliais como um supressor de tumor, promovendo defesa importante contra a invasão do câncer. Esta função é baseada na capacidade da célula mioepitelial de acumular quantidades abundantes de matriz extracelular e de secretar níveis baixos de proteases capazes de degradar a matriz e ao mesmo tempo altos níveis de maspina e outros inibidores de proteases (Sternlicht et al., 1996; Sternlicht, Barsky, 1997).

Estudos adicionais demonstraram que as células mioepiteliais exercem um efeito supressor da invasão via parácrina através da diminuição da expressão de metaloproteinases (MMPs) por fibroblastos e células tumorais (Jones et al., 2003). Foi também demonstrado que as células mioepiteliais de tumores benignos apresentam um fenótipo imunossupressor distinto e uma super-expressão de genes que pertencem à classe das proteínas da matriz extracelular e de inibidores de proteases e diminuição da expressão em genes de fatores angiogênicos e proteinases (Barsky, 2003).

Já em neoplasias de glândulas salivares é notória a enorme variedade histomorfológica e os diferentes arranjos arquitetônicos provenientes da proliferação das células mioepiteliais e os seus produtos secretados na matriz extracelular, justificando as diferentes imunomarcações entre os tumores envolvendo o componente mioepitelial, bem como, quando comparado com as células normais (Araújo et al., 2000). Para detecção das

células mioepiteliais neoplásicas, recomenda-se um painel imuno-histoquímico utilizando-se a vimentina, α -actina de músculo liso e calponina (Araújo et al., 2000; Furuse et al., 2006).

De acordo com Saveria & Zarbo (2004) as células mioepiteliais neoplásicas caracterizam-se da complexa interação de três características fundamentais: a) diferenciação citológica: as células mioepiteliais neoplásicas têm a capacidade de sofrer diferenciação mesenquimal, resultando em células morfologicamente distintas, tais como células basaloides, epitelioides, claras, fusiformes e plasmocitoides; b) diferentes arranjos arquiteturais: dependente da diferenciação citológica e da quantidade de matriz extracelular produzida pode-se apresentar de várias formas, como por exemplo, mixoide, sólido, reticular, pseudocístico e cribriforme; c) capacidade de produção de matriz extracelular: todas essas variáveis citológicas e arquiteturais acontecem graças ao aumento característico da produção de matriz extracelular das células mioepiteliais neoplásicas.

Assim, os tumores de origem mioepitelial apresentam matriz extracelular heterogênea, sendo composto por componentes da membrana basal, como colágeno tipo IV, laminina, entactina e heparan sulfato proteoglicano e por componentes não pertencentes à membrana basal, como o sulfato de condroitina (Sternlicht et al., 1996). Além destes, fatores de crescimento são secretados e assumem papel importante no crescimento, sobrevivência tumoral e, eventualmente no comportamento invasivo das células neoplásicas. Este aspecto do microambiente tumoral foi pesquisado através de estudos *in vivo* e *in vitro* (Bissell, Radisky, 2001; Radisky et al., 2001; Tlsty, 2001, Martinez et al., 2010).

3.4 FATORES DE CRESCIMENTO (EGF E TGF- β 1)

Os fatores de crescimento desempenham papéis importantes no controle do crescimento, proliferação e diferenciação das células. Os Fatores de Crescimento Epidermal, do inglês “*Epidermal Growth Factor*” (EGF), foram primeiramente descritos por Cohen em 1961 (Cohen, 1962) e são proteínas regulatórias essenciais para a sobrevivência celular. Normalmente, desempenham papéis importantes no controle do crescimento, proliferação e diferenciação das células tanto de origem ectodérmica como mesenquimal (Henson, Gibson, 2006; Jorissen et al., 2003). Estruturalmente, o EGF humano é uma proteína com peso molecular de 6045 kDa, formada por 53 aminoácidos residuais (Carpenter, Cohen, 1990).

O *Transforming Growth Factor - β* (TGF- β) é uma proteína secretada que existe em três isoformas chamada TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Este fator de crescimento é parte de uma superfamília de proteínas conhecidas como superfamília TGF- β , que inclui inibinas, ativina, hormônio anti-mülleriano, proteína morfogenética óssea, decapentaplégico (dpp) e VG-1. O fator de crescimento tumoral- β (TGF- β) é secretado pela maioria das células corporais e apresenta uma gama de atividades biológicas. O TGF- β é um regulador multifuncional do crescimento e diferenciação celular durante o desenvolvimento e reparação, influenciando a síntese de componentes da matriz extracelular, como colágenos, fibronectina, laminina e glicosaminoglicanas (Ignatz et al., 1987; Border, Noble, 1994). Além disso, é um importante modulador da síntese de receptores de membrana, as integrinas, aumentando assim a interação célula-célula e célula-matriz (Roberts et al., 1988; Heino et al., 1989). O TGF- β tem a capacidade de inibir o crescimento de muitos tipos celulares, incluindo a maioria das células epiteliais e células do sistema imunológico. A

perda da função de inibição do crescimento mediada pelo TGF- β contribui para o desenvolvimento e a progressão de uma variedade de tumores.

O TGF- β 1 é um regulador negativo do crescimento das células epiteliais normais, suprime o crescimento de células tumorais nos estágios iniciais da carcinogênese, promove a progressão do tumor em estágios posteriores. Quando essas moléculas de sinalização celular se ligam a um receptor específico, elas ativam uma série de alvos intracelulares (Derynck et al. 2001). Por ser um polipeptídeo multifuncional que participa de uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, tais como diferenciação, crescimento celular, angiogênese e progressão tumoral, além de participarem ativamente na transição epitélio-mesenquima e contribuir para invasão tumoral (Oyanagi et al., 2012).

3.5 MATRIZES EXTRACELULARES (MATRIGEL, FIBRONECTINA E COLÁGENO TIPO I)

O Matrigel é uma proteína de matriz desenvolvida em laboratório que mimetiza a membrana basal e é rica em diversos fatores de crescimento (EGF, FGF, NGF, PDGF, IGF-1 e TGF- β), bem como, das proteínas entactina, proteoglicanas e colágeno tipo IV (Jones et al., 2003; BD Biosciences, 2011). Além disso, o Matrigel em cultura de células é modulador chave nas mudanças morfogênicas e na citodiferenciação via parácrina das células mioepiteliais do adenoma pleomórfico (Freitas et al., 2008).

A Fibronectina é uma classe de glicoproteínas adesivas da matriz extracelular (Hynes, 1990) e está envolvida em inúmeras funções celulares incluindo adesão e espraiamento a outras células ou substrato (De Wever, et al., 2011), promovendo migração na matriz, organização de microfilamentos no citoplasma, alteração na morfologia celular e

diferenciação, assumindo um papel importante nos processos fisiológicos bem como patológicos (Ritzenthaler et al., 2008; Jia et al., 2010). Martinez et al. (2012) demonstraram *in vitro* que a fibronectina promove adesões focais das células mioepiteliais na matriz extracelular, assim, esses fatores favorecem a progressão tumoral e prejudicam a função das células mioepiteliais como supressoras de tumor.

O colágeno é uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas. As cadeias fibrosas de cadeia tripla se enrolam uma ao redor da outra semelhante a fios de uma corda e são divididos em duas categorias: colágenos fibrilares e não fibrilares. O colágeno tipo I é o mais comum e faz parte da categoria fibrilar e essas fibras são com banda com periodicidade transversal de 64 nm, fornecendo resistência à tração. Esta proteína aparece nos tendões, na cartilagem fibrosa, no tecido conjuntivo frouxo comum, no tecido conjuntivo denso, sempre formando fibras e feixes, porém há relatos na literatura que esta proteína está também envolvida na conversão do AP em CXAP. Araújo et al. (2009) notaram em imuno-histoquímica o contato direto das células tumorais com colágeno fibrilar do tipo I, particularmente perto do fronte invasivo e em áreas invasivas em pequenos ninhos de células de CXAP. Essa associação poderia depender da organização das moléculas de colágeno, sendo impedido por estruturas poliméricas de alta ordem, dessa forma, podendo implicar o microambiente local na transição do AP pré-maligno para CXAP invasivo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado no Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP sob protocolo nº 392/2011 (Anexo 1).

A) Para o **primeiro objetivo** do trabalho foram selecionados oito casos de LDIs e 28 casos de ACBs pertencentes do arquivo de Patologia Cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Estadual de Campinas – FCM/UNICAMP, coletados no período de 1990 a 2012. Todas as amostras foram revistas por dois examinadores (Albina Altemani e Victor Montalli) em coloração de hematoxilina e eosina.

As **LDIs** foram identificadas e classificadas conforme os critérios estabelecidos por Weinreb et al. (2009) em:

1) Hiperplasia do ducto intercalado (HDI) - proliferação ductal compacta, não encapsulada, que se misturava imperceptivelmente com o parênquima adjacente (Figuras 2a e 2b).

2) Adenoma do ducto intercalado (ADI) - proliferação ductal compacta, completamente encapsulada (Figuras 2e e 2f).

Os **ACBs** foram diagnosticados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (Araújo, 2005) e posteriormente subdivididos quanto à quantidade de túbulos (estruturas ductais) em:

1) predominantemente tubulares (ACB-T) –as estruturas ductais representavam 80% ou mais da lesão.

2) túbulo/trabeculares e sólidos (ACB-NT) – as estruturas ductais representavam menos de 80% da lesão.

Em todos os casos de LDIs e ACBs foram realizadas **reações imuno-histoquímicas** usando os anticorpos lisozima, S100, CK7, CK14, α -AML, Calponina, P63 e DOG-1 (**Tabela 4**) e coloração **histoquímica** usando PAS com diástase.

Técnica de Imuno-histoquímica

Para estudo imuno-histoquímico, as colorações foram realizadas seguindo protocolos previamente estabelecidos. Nos blocos selecionados de cada caso foram feitas secções de 4 μ m de espessura, e o material colocado em lâminas tratadas com solução de organossilano a 4% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, SIGMA código A3648). A seguir, as lâminas foram colocadas em estufa a 110 °C por uma hora, antes do início da reação. A desparafinização foi feita com três banhos de xilol e hidratação em dois banhos de álcool absoluto. Posteriormente, as lâminas foram banhadas em álcool nas concentrações decrescentes de 80% e 50% e depois lavadas em água corrente seguida de água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito através de três banhos de imersão (três minutos cada) em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 10%, à temperatura ambiente, seguidos de lavagem em água corrente e passagem por água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada pela imersão das lâminas em solução tampão fostato (PBS), com adição de solução tampão de citrato (pH 6,0) sob ação de calor úmido da panela a vapor T-fal (Stem Cuisine Hi-Speed 700) a 95°C por 30 minutos. Após esfriarem durante 15 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, permanecendo em PBS. Posteriormente, foi acrescentado sobre os cortes o bloqueador de proteínas Dako (x0909) deixando-o agir por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foi realizada a reação antígeno-anticorpo primário (tabela 4) foram aplicados sobre os cortes histológicos

e incubados em câmara úmida por 30 minutos na estufa a 37°C. Logo após, as lâminas permaneceram overnight (16-18 horas) em câmara úmida a 4°C. Em seguida a incubação, houveram três lavagens em PBS, por 3 minutos cada, à temperatura ambiente, para retirada do excesso do anticorpo primário.

A detecção do anticorpo primário foi efetuada utilizando-se o Sistema EnVision Plus (Dako). A solução foi gotejada sobre os cortes histológicos que permaneceram, durante uma hora, em câmara úmida a 37 °C. Após, as lâminas foram submersas em PBS, em temperatura ambiente. A coloração foi realizada utilizando o DAB (3,3-tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina, SIGMA, código D5637) por cinco minutos a 37 °C. A seguir, as lâminas foram submetidas novamente à lavagem em água corrente e passagem por água destilada.

A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris (Merck), durante 15 segundos, na temperatura ambiente, com posteriores lavagens em água corrente e destilada. Posteriormente, a desidratação foi feita pela passagem das lâminas em três banhos de álcool absoluto e de xilol. A montagem foi feita aderindo-se as lamínulas sobre os corte histológicos utilizando-se a resina histológica Entellan (Merck, código 7961).

Para cada caso, a quantidade relativa de células ductais e mioepiteliais marcadas por cada anticorpo nas LDIs e ACBs foi avaliada usando-se a seguinte escala: a) negativa (-): ausente ou positiva em até 5% das células; b) positiva focal (+): >5% a 50% das células; c) positiva difusa (++) : >50.

Tabela 4 - Anticorpos utilizados nos testes imuno-histoquímicos, com as diluições utilizadas e fornecedores.

Anticorpo	Diluição	Fornecedor
Lisozima	1:8000	Dako
S100	1:500	Dako
CK7	1:100	Dako
CK14	1:1200	Labvision
α -AML	1:200	Dako
Calponina	1:50	Dako
P63	1:400	Dako
DOG-1	1:1	Abcam

B) Para o segundo objetivo em cultura de células:

As células mioepiteliais (CME) foram obtidas de adenoma pleomórfico através da técnica do *explant*. Foram utilizadas linhagens de três doadores diferentes e o fenótipo das células mioepiteliais *in vitro* foram confirmados após a terceira passagem da subcultura. A caracterização destas células foi realizada através da imunofluorescência indireta (Figura 1), utilizando os anticorpos primários descritos na tabela 5 (Miguita et al., 2010).

Tabela 5 – Pannel de anticorpos utilizados para caracterização da linhagem de células mioepiteliais do adenoma pleomórfico.

Anticorpo	Titulação	Tempo de incubação	Hospedeiro	Procedência
Anti-calponina	1:20	2 horas	Camundongo	Dako*
Anti- α -actina de músculo liso	1:50	1 hora	Camundongo	Dako*
Anti-vimentina	1:400	1 hora	Camundongo	Dako*
Anti-CK7	1:50	1 hora	Camundongo	Dako*

*Dako Cytomation, Glostrup, Copenhagen, Dinamarca

O anticorpo secundário utilizado foi anticamundongo (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA), na concentração de 1:100, por trinta minutos, seguido da incubação do conjugado estreptavidina-fluoresceína (Vector Laboratories Inc.). Em seguida, procedeu-se a montagem das lamínulas sobre as lâminas de vidro utilizando-se do

meio de montagem Vectashield[®] com DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories Inc.).

As análises e fotomicrografias foram realizadas com epi-iluminação em microscópio de fluorescência Axioskop Plus (Carl Zeiss, Alemanha), usando objetivas Plan Neofluor de 20x e 63x e abertura numérica de 1,4.

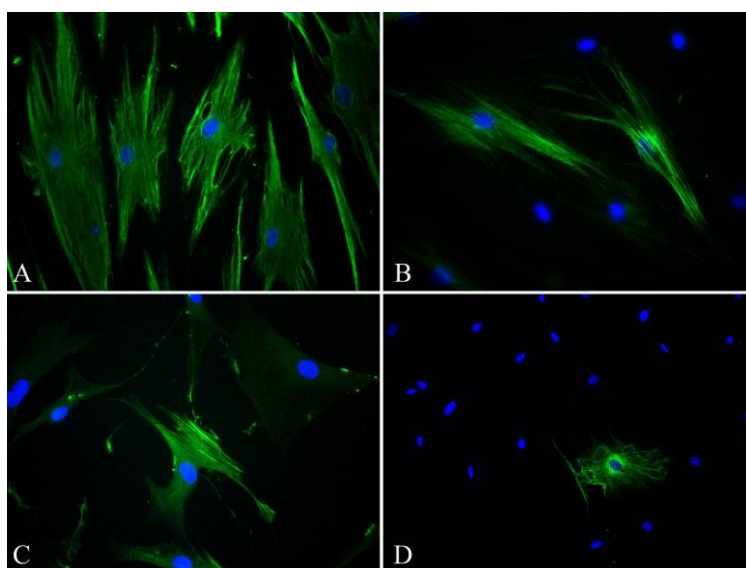


Figura 1 - Linhagem de células mioepiteliais benignas de Adenoma Pleomórfico. Imunomarcação para vimentina (A), α -actina de músculo liso (B), calponina (C) e imunomarcação fraca e ocasional para citoqueratina 7 (D). Aumento original: A-D X400.

As CME foram cultivadas em meio Essencial Mínimo Modificação Dulbecco (DMEM) (Nutricell[®], Campinas, SP, Brasil) suplementados com 10% de soro fetal Bovino (Cultilab[®], Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA).

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

As células foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida, contendo 95% de ar atmosférico e 5% de dióxido de carbono (CO₂). O meio de cultura foi trocado a

cada 2-3 dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno (plástico).

Após atingirem a subconfluência, as células foram enzimaticamente removidas dos frascos de cultura, contadas em um hemocítômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e plaqueadas na concentração de $1,9 \times 10^4$ células (110 células/mm^2).

Depois de 24h, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM sem soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e foram acrescentados nos grupos experimentais doses diárias dos fatores de crescimento *Epidermal Growth Factor* - EGF (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) nas concentrações de 5, 10 e 20 ng/mL ou doses de *Transforming Growth Factor-β1* - TGF-β1 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) nas concentrações 5, 10 e 20 ng/mL, para todos os experimentos descritos a seguir, nas diferentes proteínas de matriz extracelular. As matrizes utilizadas foram matrigel (6mg/mL), fibronectina (20μg/mL) e colágeno tipo I (0,3mg/mL), de acordo com Martinez et al. (2012) com a finalidade de formar uma estrutura tridimensional, mimetizando o ambiente *in vivo*. Como controle, as células foram cultivadas sem a presença das matrizes e sem o acréscimo dos fatores de crescimento.

Para os experimentos descritos a seguir, o volume de cada matriz foi de 30 μl para a morfologia, imunofenótipo e curva de crescimento e 10μl para o ensaio de viabilidade celular (MTT).

Morfologia e imunofenótipo celular (Imunofluorescência Indireta)

Para a análise da morfologia das células mioepiteliais nos diferentes tipos de matrizes extracelulares e/ou suplementação de fatores de crescimento (EGF e TGF- β 1), utilizamos a vimentina (Vim) por ser um componente do citoesqueleto e responsável por manter a integridade celular. Para avaliar a diferenciação celular (imunofenótipo) utilizamos a α -Actina de Músculo Liso (α -AML), por ser um microfilamento que compõe o citoesqueleto das células mioepiteliais, tendo uma importante função contrátil nestas células.

As análises morfológicas e do imunofenótipo foram feitas após 96 horas, para que houvesse tempo da célula aderir e espriar no seu substrato, bem como, imunoexpressar as proteínas avaliadas no presente estudo.

As células mioepiteliais foram fixadas em metanol à -20°C por 6 minutos, e lavadas em solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA). Para o bloqueio da marcação inespecífica, as células foram incubadas em solução de leite desnatado a 1% em PBSA, por 30 minutos em temperatura ambiente. Procedeu-se a incubação do anticorpo primário, durante 60 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente.

Proliferação celular

Para este teste, as células mioepiteliais foram plaqueadas na concentração de 110 células por mm^2 ($1,8 \times 10^4$)/poço, em placas de 24 poços e utilizou-se o método automatizado Vi-Cell TM (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) para avaliação da proliferação celular. Após 24, 48 e 72 horas as culturas celulares plaqueadas sobre as

diferentes matrizes extracelulares e nas diferentes concentrações dos fatores de crescimento EGF e TGF- β 1 foram avaliadas. Tal metodologia foi realizada em triplicata. Para tanto, as células foram enzimaticamente removidas com tripsina (500 μ L) das placas e o precipitado de células resultante foi ressuspensão em 500 μ L de meio DMEM, com o objetivo de parar a atividade enzimática da tripsina. O volume total de cada amostra (1mL) foi retirado e transferido para um recipiente específico do equipamento automatizado. O equipamento ViCell™ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) realizou a análise de cada amostra, onde este fornecia fotografias em tempo real, bem como, se estas células se encontravam viáveis ou não. Para análise estatística considerou-se apenas os valores das células viáveis.

Avaliação da viabilidade celular (MTT)

As culturas celulares foram testadas quanto à viabilidade celular utilizando o ensaio MTT após 24, 48 e 72 horas, das culturas celulares plaqueadas sobre as diferentes matrizes extracelulares e diferentes concentrações dos fatores de crescimento EGF e TGF- β 1. Neste ensaio, foram utilizadas $1,8 \times 10^4$ células/poço, em placa de 96 poços, incubadas com as diferentes matrizes. Após cada tempo experimental, acrescentou-se 10 μ l da solução de MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) (5 mg/mL) diluídos em meio de cultura DMEM sem soro às culturas tratadas e estas incubadas por um período de 3 horas, a 37 °C. Após o período total de incubação (4 horas) foram adicionados 100 μ l de solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e ácido clorídrico 0,01 N.

Este ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem o MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) a cristais de formazan, de cor púrpura. A intensidade da cor

púrpura reflete o grau de viabilidade celular. A quantificação da viabilidade celular foi realizada em leitor de microplacas ELX800 (Biotek Instruments, Inc.) a uma densidade óptica de 590 nm.

5. RESULTADOS

A) Os resultados do primeiro objetivo (LDI e ACBs) são:

Achados clínico-patológicos

Os achados clínico-patológicos das LDIs e ACBs estão nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 6 - Aspectos clínico-patológicos das LDIs.

Caso	Lesão	Classificação	Sexo	Idade	Local	Tamanho	Doença original
1	LDI	HDI	M	88	Parótida	1 mm	Melanoma
2	LDI	HDI	F	56	Parótida	3 mm	Adenocarcinoma metastático
3	LDI	HDI	M	35	Parótida	1 mm	AP
4	LDI	HDI	F	40	Parótida	2 mm	ACB
5	LDI	HDI Multifocal	F	37	Parótida	2 mm	AP
6	LDI	HDI & ADI	F	N/D	Parótida	4 mm	ACB
7	LDI	ADI	F	19	Parótida	3 mm	Própria lesão
8	LDI	ADI	M	50	Parótida	3 mm	Própria lesão
<i>Média</i>		<i>HDI (75%); ADI (25%).</i>	<i>F (62,5%) M(37,5%)</i>	<i>46,4</i>	<i>Parótida</i>	<i>2,4 mm</i>	

LDI indica Lesão do Ducto Intercalado; **HDI**, Hiperplasia do Ducto Intercalado; **ADI**, Adenoma do Ducto Intercalado; **AP**, Adenoma pleomórfico; **ACB**, Adenoma de Células Basais; **N/D**, não disponível.

Tabela 7 - Aspectos clínico-patológicos dos ACBs.

Casos	Classificação	Sexo	Idade	Local	Tamanho
1	ACB-T (100%)	N/D	N/D	Parótida	9 mm
2	ACB-T (90%)	N/D		Parótida	6 mm
3	ACB-T (90%)	F	61	Parótida	13 mm
4	ACB-T (90%)	M	55	Parótida	30 mm
5	ACB-T (90%)	F	71	Parótida	20 mm
6	ACB-T (90%)	N/D	N/D	Parótida	10 mm
7	ACB-T (80%)	F	37	Parótida	13 mm
8	ACB-T (80%)	F	41	Parótida	15 mm
9	ACB-T (80%)	F	57	Parótida	13 mm
10	ACB-NT	F	53	Parótida	25 mm
11	ACB-NT	M	36	Parótida	17 mm
12	ACB-NT	F	71	Parótida	11 mm
13	ACB-NT	N/D	N/D	Parótida	14 mm
14	ACB-NT	F	78	Parótida	20 mm
15	ACB-NT	F	70	N/D	30 mm
16	ACB-NT	N/D	N/D	Parótida	17 mm
17	ACB-NT	N/D	N/D	Parótida	15 mm
18	ACB-NT	F	53	Parótida	23 mm
19	ACB-NT	F	55	Parótida	17 mm
20	ACB-NT	N/D	N/D	N/D	5 mm
21	ACB-NT	M	63	Parótida	30 mm
22	ACB-NT	N/D	N/D	Parótida	10 mm
23	ACB-NT	M	77	Parótida	20 mm
24	ACB-NT	M	65	Parótida	10 mm
25	ACB-NT	F	40	Parótida	10 mm
26	ACB-NT	M	57	N/D	17 mm
27	ACB-NT	N/D	96	Parótida	20 mm
28	ACB-NT	N/D	N/D	Parótida	19 mm
Média		F (44,4%) M (22,2%)	60	Parótida	16,39 mm

ACB-T indica Adenoma de células basais com predominância tubular; **ACB-NT**, Adenoma de Células Basais túbulo/trabeculares e sólidos; **N/D**, não disponível.

As **LDIs** predominaram em mulheres (62,5%), a idade dos pacientes variou de 19 a 88 anos (média 46,4 anos), o tamanho médio das lesões foi 2,4mm (variou de 1 a 4 mm) e todas foram encontradas na parótida. As **LDIs** formavam lesões nodulares únicas em todos os casos, exceto em um (caso 6), onde foram observados múltiplos nódulos hiperplásicos e adenomatosos (Figura 2). Na presente série, os tumores de glândula salivar associados às **LDIs** foram o **ACB** (dois casos) e o adenoma pleomórfico (dois casos). Em apenas dois casos, a **LDI** foi o motivo principal da remoção cirúrgica da parótida e em

ambos a lesão foi classificada como adenoma. Nestes dois casos, a história clínica era de um nódulo pequeno de longa duração.

Morfológicamente, dos oito casos de LDIs, seis apresentavam características de hiperplasia (Figura 3a, b, c, d) e três de adenoma (Figura 3e, f) (em um caso, nódulos hiperplásicos e adenomas coexistiam). Em todos os casos, a LDI tendia a expandir o lóbulo da glândula salivar e não continha células adiposas ou inflamatórias no interior da lesão. Os ductos proliferados apresentavam padrão de crescimento compacto, com muito pouco estroma entre eles, exceto em dois casos, onde estavam separados por moderada quantidade de material hialinizado (Figura 2c, d).

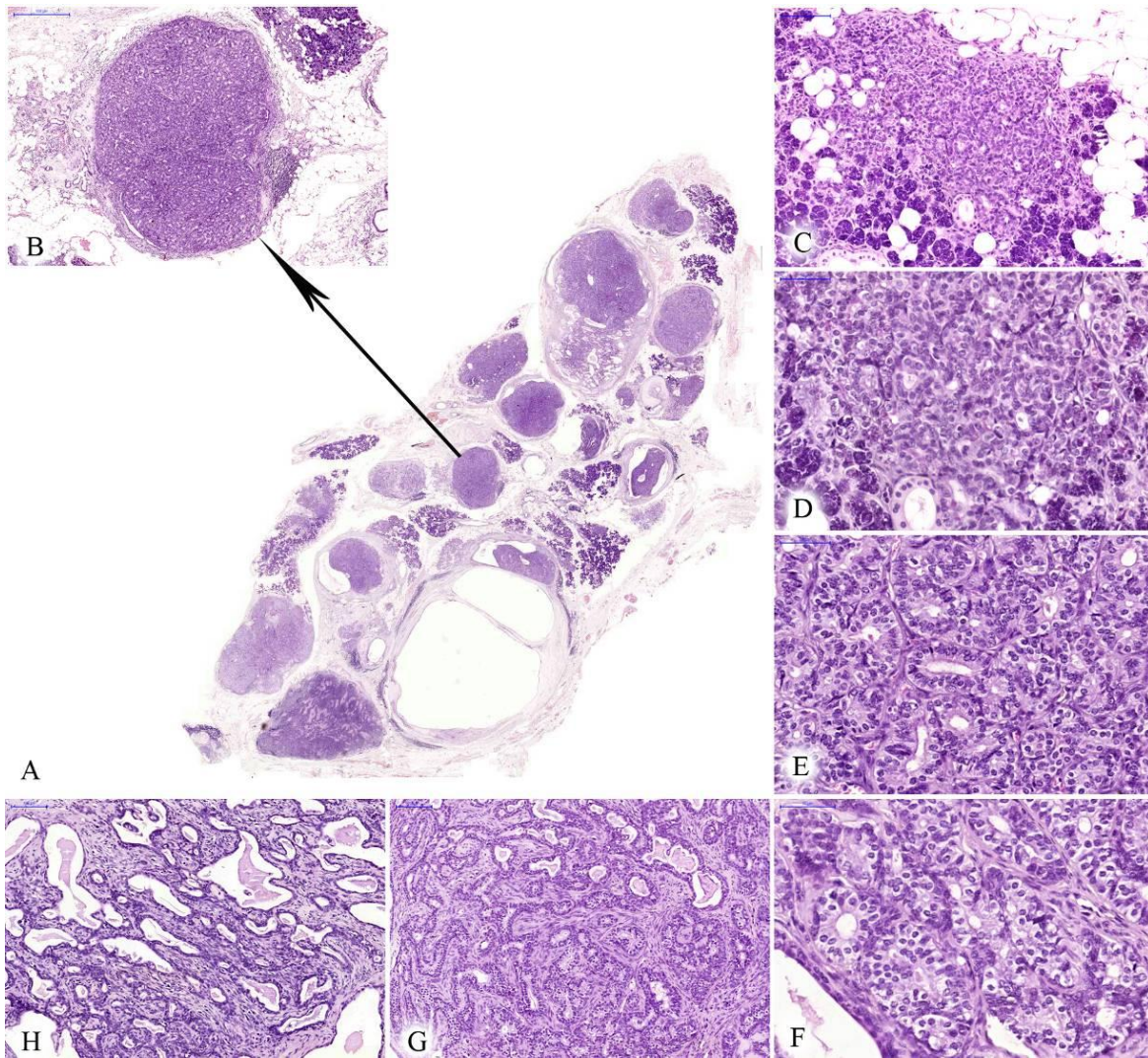


Figura 2 - Caso 6. **A.** Múltiplas lesões evidenciadas em menor aumento (1X); **B.** ADI (seta); **C e D.** Nódulos hiperplásicos (HDI) (400X); **E.** Maior aumento da ADI ilustrada em B; **F, G, H.** ACB-T: Notar que as estruturas ductais estão separadas por moderada quantidade de células fusiformes, em contraste com a figura E (ADI), onde os túbulos estão justapostos (400X).

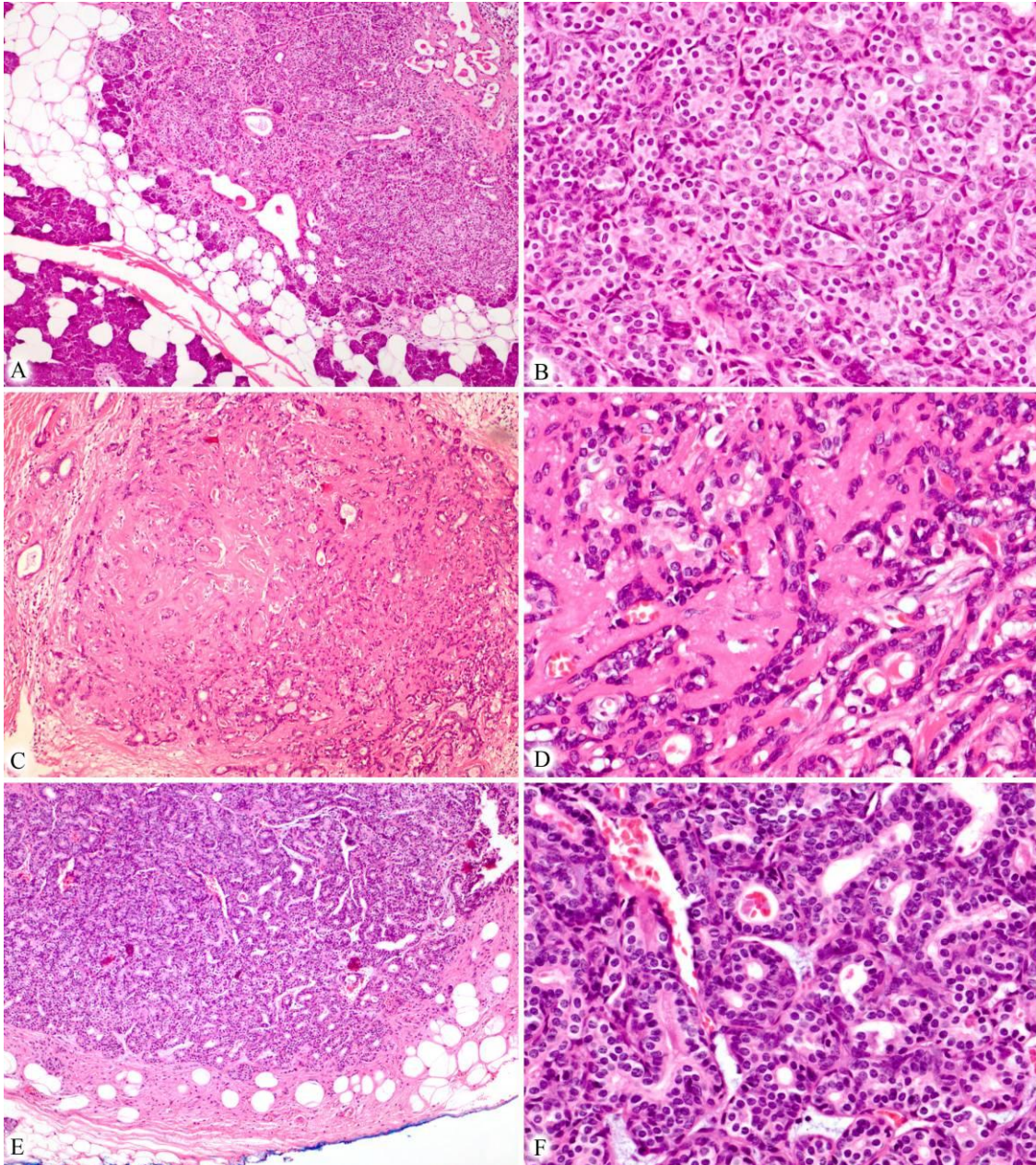


Figura 3 - LDIs e seus diferentes aspectos. Observa-se proliferação ductal compacta nas LDIs; *A e B*. Hiperplasia do ducto intercalado. Nota-se uma continuidade com o parênquima adjacente; *C e D*. Hiperplasia do ducto intercalado com intensa deposição de matriz hialinizada e; *E e F*. Adenoma do ducto intercalado. Cápsula fibrosa circundando a proliferação ductal (aumentos de 100X e 400X, respectivamente).

Os **ACBs** afetaram predominantemente as mulheres (relação 2/1), a idade média dos pacientes variou de 36 a 96 anos (média 60 anos), o tamanho médio da lesão foi 16,39mm e todos ocorreram na parótida. Os ACB-Ts (9 casos) apresentaram médias

menores que àquelas dos ACB-NTs (19 casos) tanto em relação à idade dos pacientes quanto ao tamanhos das lesões: a) idade: 53,6 versus 62,6 anos, b) tamanho: 15,3 versus 19,3mm. Entretanto, as diferenças estatísticas não foram significantes em relação à idade ($p= 0,4688$) (Gráfico 1). Quanto ao tamanho das LDI e ACBs, notou-se diferença estatística no grupo LDI e ACB-T ($p<0,001$) e o grupo LDI e ACB-NT ($p<0,001$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ACB-T e ACB-NT ($p>0,05$) (Gráfico 2). O teste estatístico realizado foi ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey.

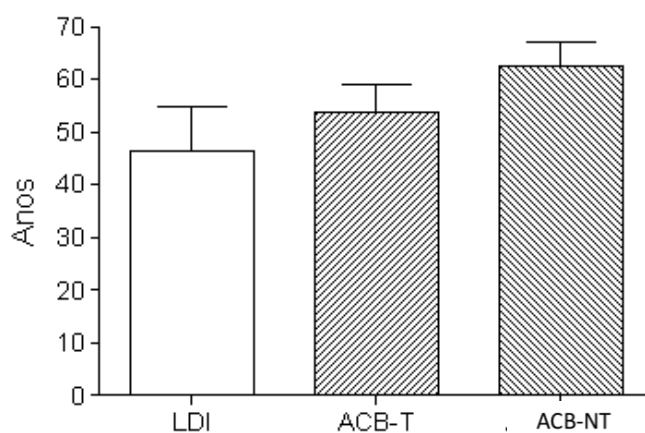


Gráfico 1 - Idade (média±desvio padrão) dos casos de LDI, ACB-T e ACB-NT. ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey. ($p>0,05$).

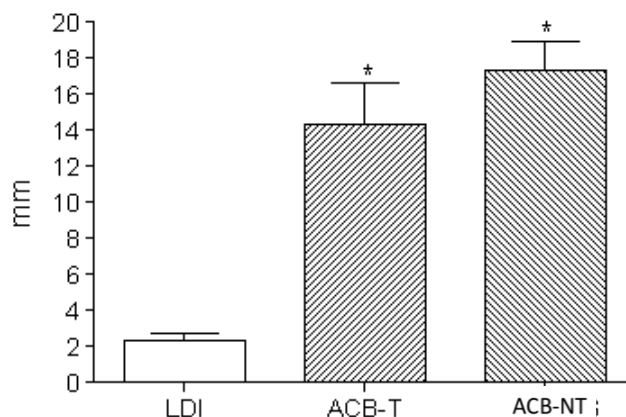


Gráfico 2 - Tamanho em mm (média±desvio padrão) dos casos de LDI, ACB-T e ACB-NT. (“*”= $p<0,05$) ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey.

Morfológicamente, nos ACB-Ts, uma proporção variável das estruturas ductais apresentava aspecto muito semelhante ao dos ductos proliferados das LDIs, particularmente quanto às células ductais (comparar Figuras 3b e 4b). Em ambos (LDIs e ACB-Ts) as células ductais mostravam citoplasma amplo, claro, frequentemente com pequena quantidade de grânulos eosinófilos na sua porção apical. A principal diferença entre LDIs e ACB-Ts foi em relação à camada mioepitelial. Esta era geralmente pouco perceptível nas LDIs, enquanto que nos ACB-Ts havia mais de uma camada mioepitelial.

Nos ACB-NTs, as estruturas ductais com morfologia semelhante a do ducto intercalado eram ocasionais e, não raro, estavam localizadas na porção tumoral mais superficial (próxima à cápsula). Neste subtipo de ACB, a maioria dos túbulos fazia parte das estruturas túbulo-trabeculares, onde, caracteristicamente, as células mioepiteliais/basais estão dispostas em paliçada na periferia dos cordões e ilhotas tumorais (Figuras 4g, h). Tanto nos ACB-Ts como nos ACB-NTs uma membrana basal PAS positiva, de espessura variável, delimitava os agrupamentos tumorais do estroma (Figuras 6d, g, j).

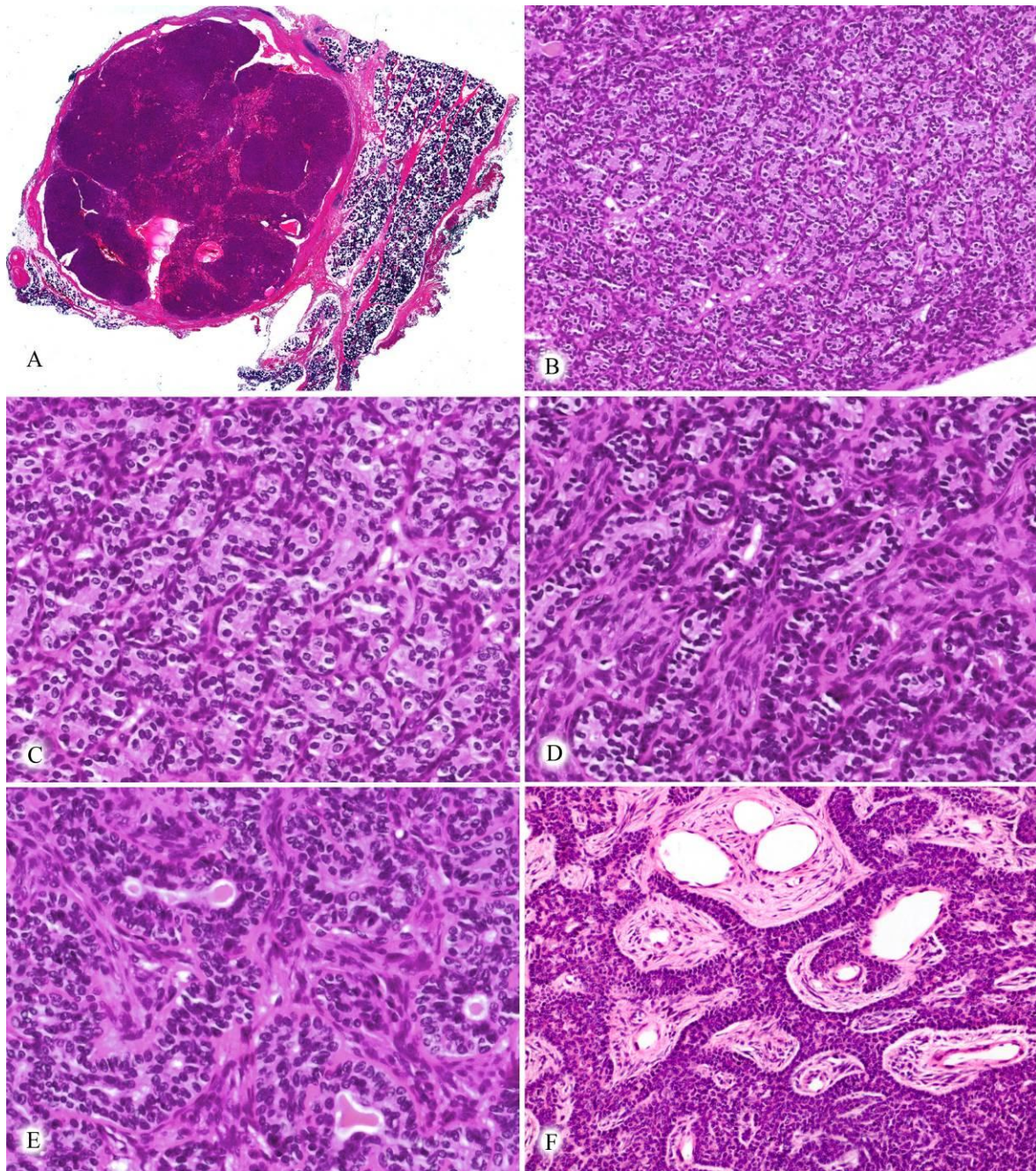


Figura 4 - ACB-T, caso 5 (A B, C, D, E) e ACB-NT (F). No mesmo tumor podem-se notar três tipos de áreas: a) LDI-símile (B,C), b) típicas do ACB-T (C, D) e c) ACB-NT-símile (comparar com as figuras G, H). As áreas típicas do ACB-T (D, E) são as predominantes e nelas as estruturas tubulares, que são semelhantes às das LDIs (comparar com as figuras B, C), estão separadas por células fusocelulares mioepiteliais. ACB-NT, caso 28 (F) notar as estruturas túbulo-trabeculares e a disposição em paliçada das células mioepiteliais/ basais na periferia dos agrupamentos celulares. (100X e 400X, respectivamente).

Achados Histoquímicos e Imuno-histoquímicos

O perfil imuno-histoquímico das células ductais luminares e mioepiteliais do ducto intercalado normal (controle) foi verificado no: a) parênquima salivar normal adjacente aos tumores e b) em sete glândulas parótidas e uma submandibular, cirurgicamente removidas por outros motivos que não neoplasia salivar. No ducto intercalado controle, as células ductais luminares foram difusamente positivas para lisozima (Figura 5b), para CK7 e na porção apical para DOG-1 (Figura 5g,h). Além do ducto intercalado, as células do ducto estriado também apresentaram-se positivas para CK7 (Figura 5d). As células mioepiteliais eram S100, CK14 e α -AML positivas (Figura 5c, e, f). Não se observou positividade para proteína S-100 nas células ductais luminares. Na coloração pelo PAS (Figura 5a), estas células apresentavam pequena quantidade de grânulos positivos na sua porção apical (Figura 5a, detalhe).

A Tabela 4 mostra os achados histoquímicos e imuno-histoquímicos nas LDIs, ACB-Ts e ACB-NTs. Nos casos 3 e 6 das LDIs e nos casos 11, 17, 20, 26, 27 e 28 dos ACBs não foram realizados exames imuno-histoquímicos, por falta de disponibilidade de blocos.

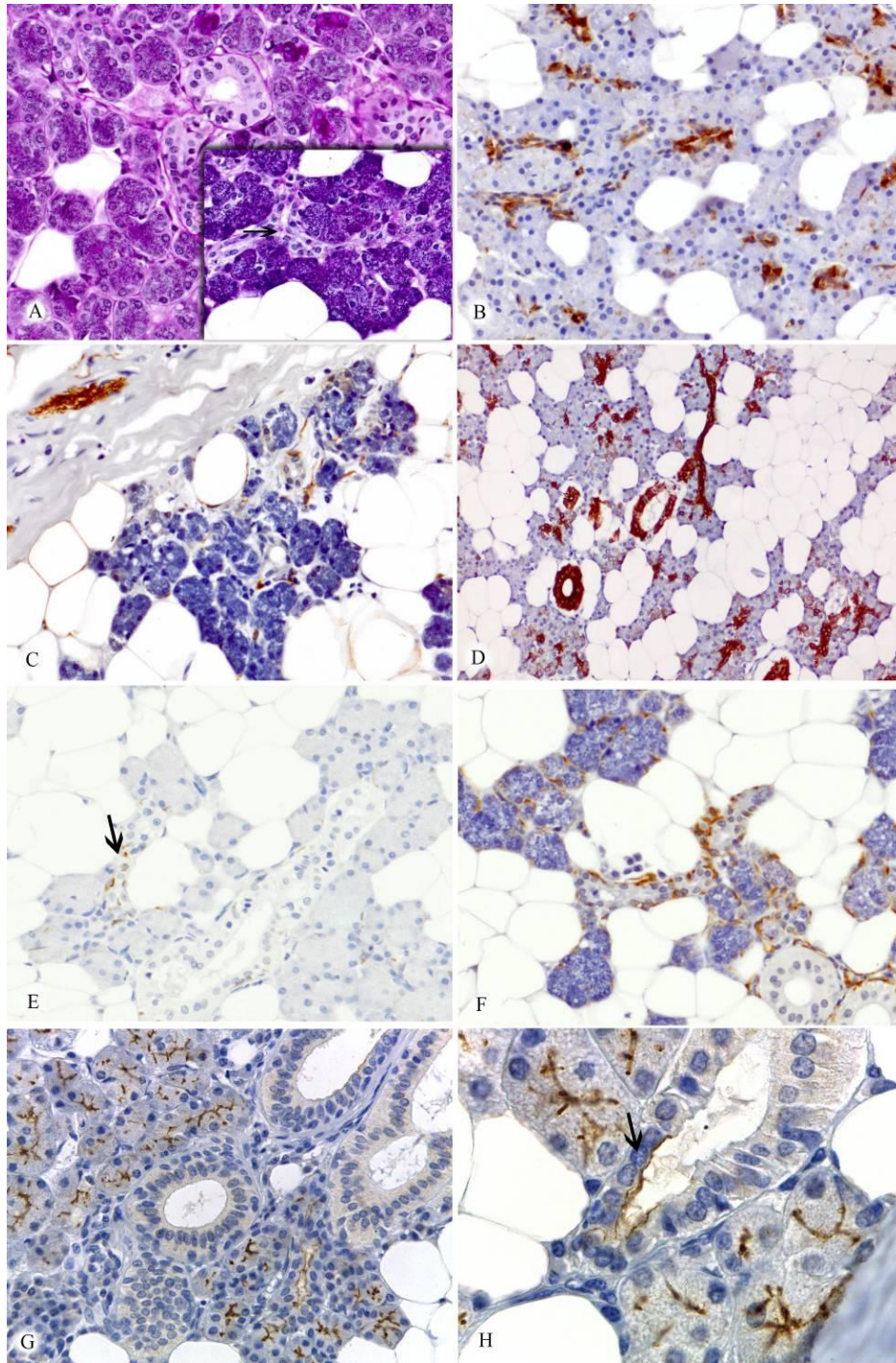


Figura 5 - Aspecto histoquímico e imuno-histoquímicos das glândulas salivares normais. **A. PAS**, Presença de grânulos PAS positivos na porção apical das células ductais (seta no detalhe). **B. Lisozima**. Marcação difusa nas células luminares do ducto intercalado; **D. CK7**, Forte expressão para as células luminares do ducto intercalado e do ducto estriado; **G, H. DOG-1**, Marcação positiva na porção apical das células acinares e nas células luminares do ducto intercalado (seta na figura H) **C, E, F** mostram positividade nas células mioepiteliais para **S-100 (C)**, **CK14 (seta) (E)** e **α -AML (F)**.

Tabela 8 - Achados histoquímicos e imuno-histoquímicos das LDIs e ACBs.

No.	PAS		DOG-1		Lisozima		S100		CK 7		CK 14		α -AML		Calp		P63	
	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M
1 LDI	+	-	++	-	-	-	+	-	++	-	+	++	-	++	-	++	-	++
2 LDI	++	-	++	-	++	-	++	+	++	-	-	++	-	++	-	+	-	++
4 LDI	++	-	++	-	++	-	++	+	++	-	-	++	-	++	-	++	-	++
5 LDI	++	-	N/R	N/R	++	-	++	+	++	-	-	++	-	++	-	++	-	++
7 LDI	++	-	N/R	N/R	N/R	N/R	++	++	++	-	N/R	N/R	-	++	-	+	-	++
8 LDI	+	-	++	-	++	-	++	+	++	-	-	++	-	++	-	++	-	++
1 ACB-T	++	-	++	++	++	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	++	-	++
2 ACB-T	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	++	-	++
3 ACB-T	++	-	+	++	+	-	++	-	++	-	+	++	-	++	-	++	-	++
4 ACB-T	++	-	+	-	+	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	++	-	++
5 ACB-T	++	-	+	++	-	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	++	-	++
6 ACB-T	++	-	N/R	N/R	+	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	++	-	++
7 ACB-T	++	-	++	++	++	-	+	-	++	-	+	++	-	+	-	+	-	++
8 ACB-T	++	-	++	+	+	-	++	-	++	-	-	++	-	++	-	++	-	++
9 ACB-T	++	-	+	++	++	-	++	-	++	-	+	+	-	++	-	++	-	++
10 ACB-NT	+	-	++	++	+	-	+	+	++	-	+	+	-	+	-	N/R	-	++
12 ACB-NT	-	-	N/R	N/R	-	-	+	+	++	-	++	+	-	+	N/R	N/R	-	++
13 ACB-NT	-	-	++	-	-	-	++	-	++	-	++	-	-	+	-	++	-	++
14 ACB-NT	-	-	+	++	-	-	-	+	++	-	++	+	-	+	-	++	-	++
15 ACB-NT	+	-	-	++	+	-	+	-	++	-	+	+	-	+	-	++	-	++
16 ACB-NT	+	-	-	++	+	-	+	+	+	-	++	-	-	+	-	++	-	++
18 ACB-NT	+	-	N/R	N/R	+	-	+	++	++	-	++	+	-	+	-	++	-	++
19 ACB-NT	-	-	N/R	N/R	-	-	+	-	++	-	++	++	-	+	N/R	N/R	-	++
21 ACB-NT	-	-	-	++	-	-	+	++	++	-	+	+	-	+	-	+	-	++
22 ACB-NT	-	-	-	++	-	-	+	++	++	-	++	++	-	+	-	++	-	++
23 ACB-NT	+	-	-	++	-	-	+	++	++	-	++	++	-	+	-	++	-	++
24 ACB-NT	+	-	-	+	+	-	-	-	++	-	++	++	-	+	-	++	-	++
25 ACB-NT	+	-	+	++	+	-	+	++	++	-	++	++	-	+	-	++	-	++

LDI indica Lesão do Ducto Intercalado; **HDI**, Hiperplasia; **ADI**, Adenoma; **ACB**, Adenoma de Células Basais; **ACB-T**, predominantemente tubulares; **ACB-NT**, túbulo/trabeculares e sólidos; **D** indica Células Ductais; **M**, Células mioepiteliais; Imuno-expressão para cada anticorpo foi avaliada separadamente de acordo com os tipos celulares dos tumores: - (0% a 5% de células), + (>5 a 50% de células), ++ (>50% de células). **N/R**, não realizado.

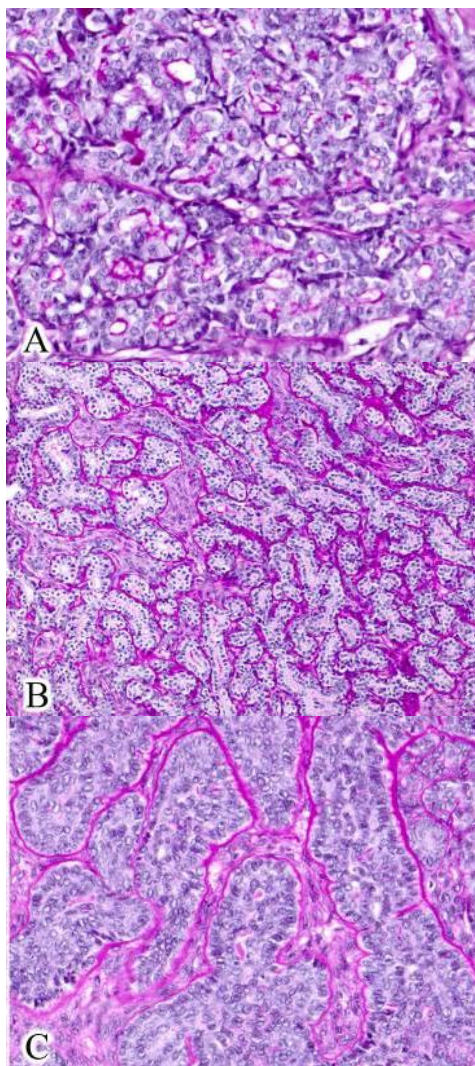


Figura 6 - **PAS com diastase. LDI:** Notam-se grânulos PAS positivos na porção apical das células ductais (A), **ACB-T:** A quantidade de grânulos PAS positivos nas células ductais é semelhante a da LDI (comparar com A) C. **ACB-NT com diminutos focos** (entre setas) semelhantes às LDIs (B) e **ACB-NT:** Notar que apenas a membrana basal é positiva para PAS (C).

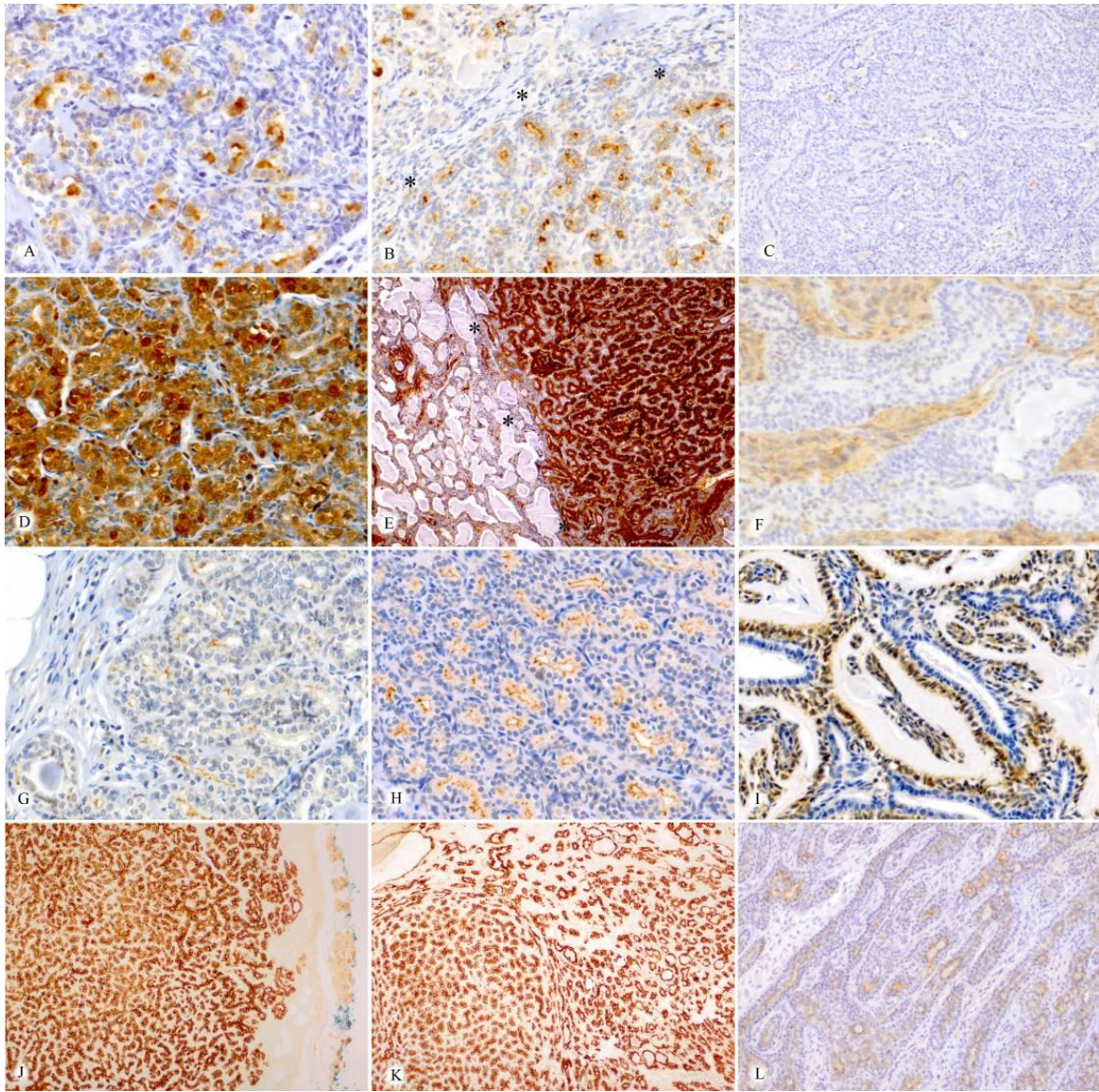


Figura 7 - **LDI:** Expressão difusa de Lisozima (A), S100 (D), DOG-1 (expressão apical, G) e CK7 (J). **ACB-T:** células luminais positivas para Lisozima (B), S100 (E), DOG-1 (expressão apical, H) e CK7 (K). **ACB-NT:** Células luminais negativas para lisozima (C), células fusiformes positivas para S100 (F), células mioepiteliais positivas para DOG-1 (I) e células luminais positivas para CK7 (L).

O perfil imuno-histoquímico das células luminares das estruturas ductais das LDIs e ACB-Ts mostrou marcada semelhança, reforçando a impressão de similaridade já observada na análise morfológica. Em ambos (LDIs e ACB-Ts), as células ductais apresentavam grânulos PAS positivos na sua porção apical e expressões frequentes e geralmente extensas (>50% das células), de DOG-1, de lisozima e proteína S-100 (Tabela 9).

Tabela 9 - Expressões de PAS, Lisozima, Proteína S-100 e CK14 nos casos de LDI, ACB-T e ACB-NT.

Cases	DOG-1				Lisozima				S100				CK14			
	D		M		D		M		D		M		D		M	
	+%	>50%	+%	>50%	+%	>50%	+%	>50%	+%	>50%	+%	>50%	+%	>50%	+%	>50%
LDI	0/4	4/4	0	0 /4	0/5	4/5	0/6	0 /9	1/6	5/6	4/6	1/6	1/5	0/5	0/5	5/5
(6 casos)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)	(80,0)	(0)	(0)	(16,6)	(83,3)	(66,6)	(16,6)	(20,0)	(0)	(0)	(100)
ACB-T	4/8	4/8	1/8	5/8	4/9	4/9	0/9	0 /9	1/9	8/9	0/9 (0)	0/9	3/9	0 /9	1/9	8/9
(9 casos)	(50)	(50)	(12,5)	(62,5)	(44,4)	(44,4)	(0)	(0)	(11,1)	(88,8)	(0)	(0)	(33,3)	(0)	(11,1)	(88,8)
ACB-NT	2/10	2/10	1/10	8/10	6/13	0/13	0/13	0/13	10/13	1/13	4/13	5/13	3/13	10/13	6/13	5/13
(13 casos)	(20)	(20)	(10)	(80)	(46,1)	(0)	(0)	(0)	(76,9)	(7,6)	(30,7)	(38,4)	(23)	(76,9)	(46,1)	(38,4)

LDI indica Lesão do Ducto Intercalado, **ACB-T**, Adenoma de Células Basais predominantemente tubulares; **ACB-NT**, predominantemente túbulo/trabeculares e sólidos; **D** indica Células Ductais; **M**, Células mioepiteliais; Imuno-expressão para cada anticorpo foi avaliada separadamente de acordo com os tipos celulares dos tumores: - (0% a 5% de células), + (>5 a 50% de células), ++ (>50% de células).

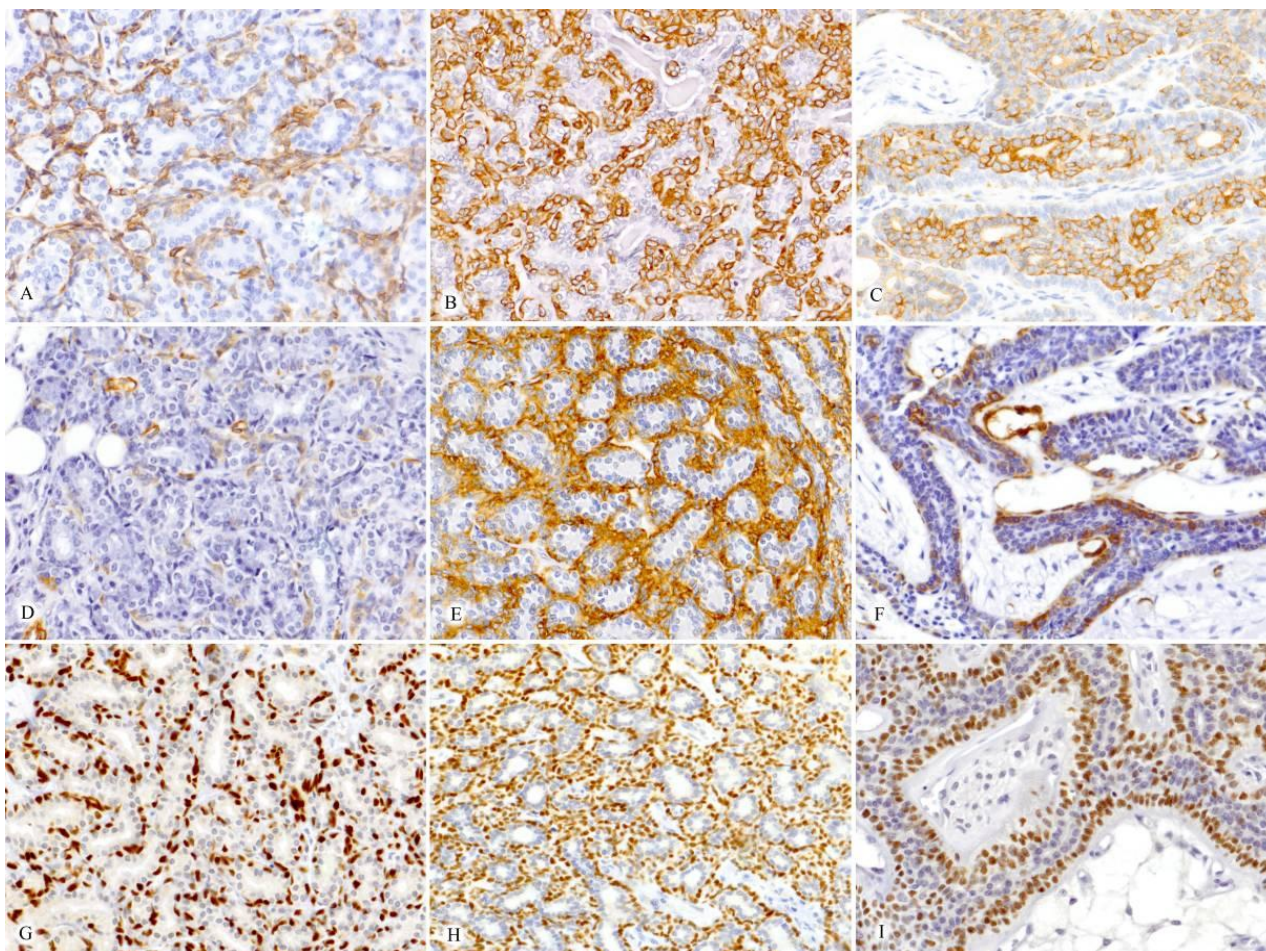


Figura 8 – **LDI**: Apenas as células mioepiteliais, que formam uma camada celular circundando as células ductais, são positivas para CK14 (A), AML (D) e p63 (G). **ACB-T**: CK14. (B), AML (E) e p63 (H) destacam uma maior quantidade de células mioepiteliais que circundam as células luminais. **ACB-NT**: Observar expressão de CK14 nas células ductais e mioepiteliais (C) ; AML (F) e p63 (I) são expressas nas células periféricas em paliçada das estruturas túbulo-trabeculares.

Contrastando com as LDIs e ACB-Ts, nos ACB-NT as células ductais luminares apresentavam um padrão muito focal de positividade para lisozima e proteína S-100 e DOG-1, isto é, uma minoria de túbulos era positiva para esses marcadores e continham grânulos PAS positivos (Tabela 8) (Figura 6c). Outro marcador que apresentou expressão acentuadamente distinta nas LDIs e ACB-Ts quando comparadas com os ACB-NTs foi a citoqueratina 14. Nas LDIs e ACB-Ts, as células ductais foram ocasionalmente positivas para essa citoqueratina, que era expressa quase que exclusivamente nas células mioepiteliais (Figuras 8b, e). Em contraste, nos ACB-NTs, além das células mioepiteliais, as

células ductais dos túbulos expressavam CK14 em todos os casos e de modo difuso (> 50% das células) na maioria deles (Figuras 8c) (Tabela 9). A CK7 não distinguiu LDIs, ACB-Ts e ACB-NTs. Esta citoqueratina foi positiva e com padrão difuso nas células ductais luminares dos túbulos, independentemente da classificação histológica do tumor como LDI ou ACB, em todos os casos (Figuras 7j, k, l).

Em relação às células mioepiteliais, as expressões de α -AML (Figuras 8d, e, f), P63, (Figuras 8g, h, i) foram semelhantes nas LDIs, ACB-Ts e ACB-NTs. Estes marcadores foram fortemente positivos nas células mioepiteliais em todos os casos.

B) Os resultados do segundo objetivo (em cultura de células) são: Morfologia e imunofenótipo Celular (Imunofluorescência Indireta)

Primeiramente avaliamos o comportamento das células mioepiteliais nas diferentes matrizes sem a influência dos fatores de crescimento. Os resultados demonstraram que as células mioepiteliais apresentam *in vitro* morfologia estrelada e poliédrica, independentemente do tipo de matriz (Figura 9). A expressão de vimentina foi homogênea em todas as células mioepiteliais e em todos os grupos. Já a expressão de α -Actina de Músculo Liso manteve-se heterogênea em todas as matrizes estudadas. Apenas algumas células expressavam essa proteína no citoplasma. As células mioepiteliais foram cultivadas sem matrizes e sem fatores de crescimento (Figuras 9a e b) e nas matrizes matrigel (Figura 9 c e d), fibronectina (Figura 9e e f) e colágeno tipo I (Figura 9g e h).

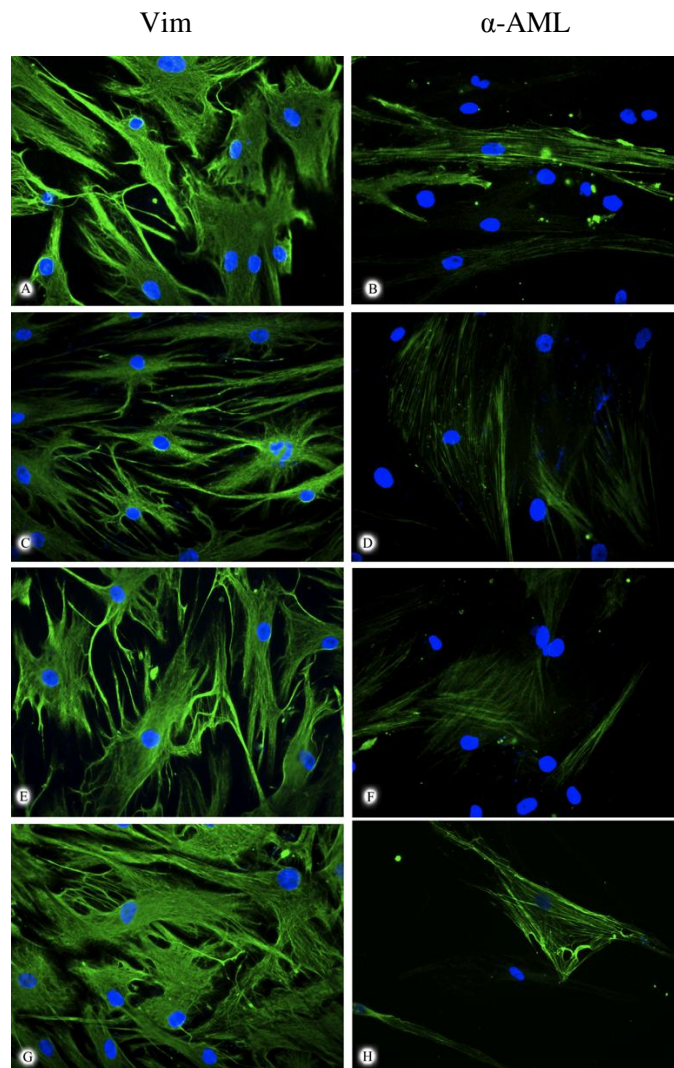


Figura 9 - Imunofluorescência indireta. Aspectos morfológicos (Anti-Vim) **A, C, E, G** e imunofenotípicos (Anti- α -AML) **B, D, F, H** das células mioepiteliais cultivadas em diferentes substratos e sem fatores de crescimento: vidro (controle) (**A, B**); Matrigel (**C, D**); Fibronectina (**E, F**); e Colágeno tipo I (**G e H**). Anti-vimentina (verde) e anti α -AML e marcação para DNA (DAPI, azul). Notar que as células mioepiteliais expressaram de maneira uniforme a expressão de Vimentina e mantiveram o mesmo padrão morfológico e imunofenotípico, independente do tipo de matriz. Em todos os grupos estudados a expressão de α -AML foi de forma heterogênea. Aumento original: 400x.

Quando cultivadas em diferentes substratos e com o fator de crescimento EGF, apenas as células mioepiteliais do grupo sem matriz mudaram seu padrão poliédrico para morfologia fusiforme, a partir da concentração de 20 ng/mL (Figura 10 b). A imunexpressão de anti- α -AML manteve-se heterogênea em todos os grupos estudados (Figura 10 c, f, i, l).

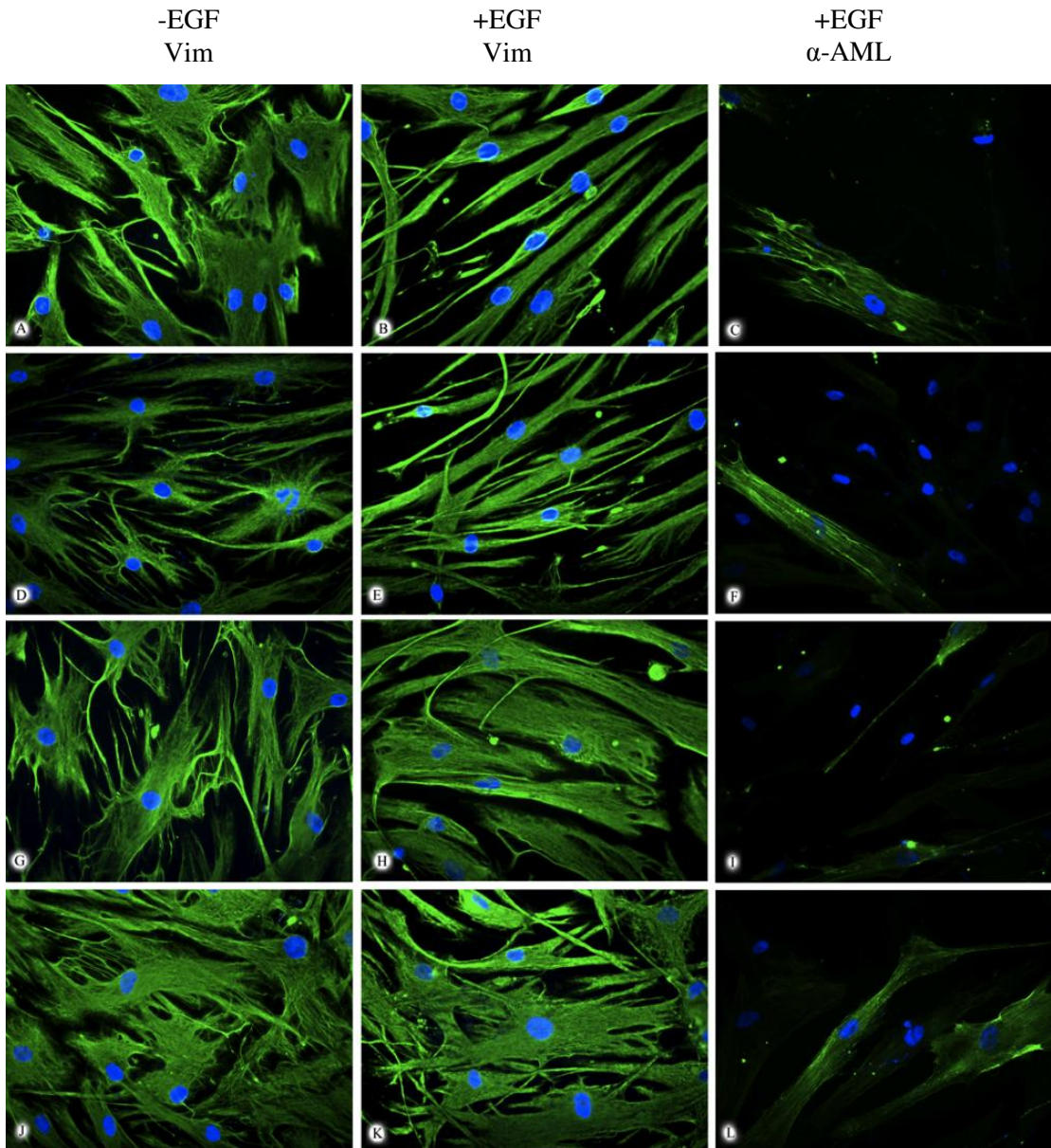


Figura 10 - Imunofluorescência indireta. Aspectos morfológicos e imunofenotípicos das células mioepiteliais cultivadas em diferentes substratos: vidro (controle) (A), matrigel (D), fibronectina (G) e colágeno tipo I (J) e com a adição do EGF (20 ng/mL) (B, E, H, K). Anti-vimentina (verde) e anti α -AML (C, F, I, L) e marcação para DNA (DAPI, azul). Notar que no grupo vidro (controle) e EGF as células mioepiteliais modificaram sua morfologia, tornando-se mais fusiformes. Em todos os grupos estudados a α -AML expressou de forma heterogênea. Aumento original: 400x.

Em relação ao fator de crescimento TGF- β 1, as células mioepiteliais expressaram anti α -AML de forma mais homogênea em comparação aos outros grupos (controle e EGF), a partir da concentração de 5 ng/mL, independente do tipo de matriz (Figura 4C, F, I, L).

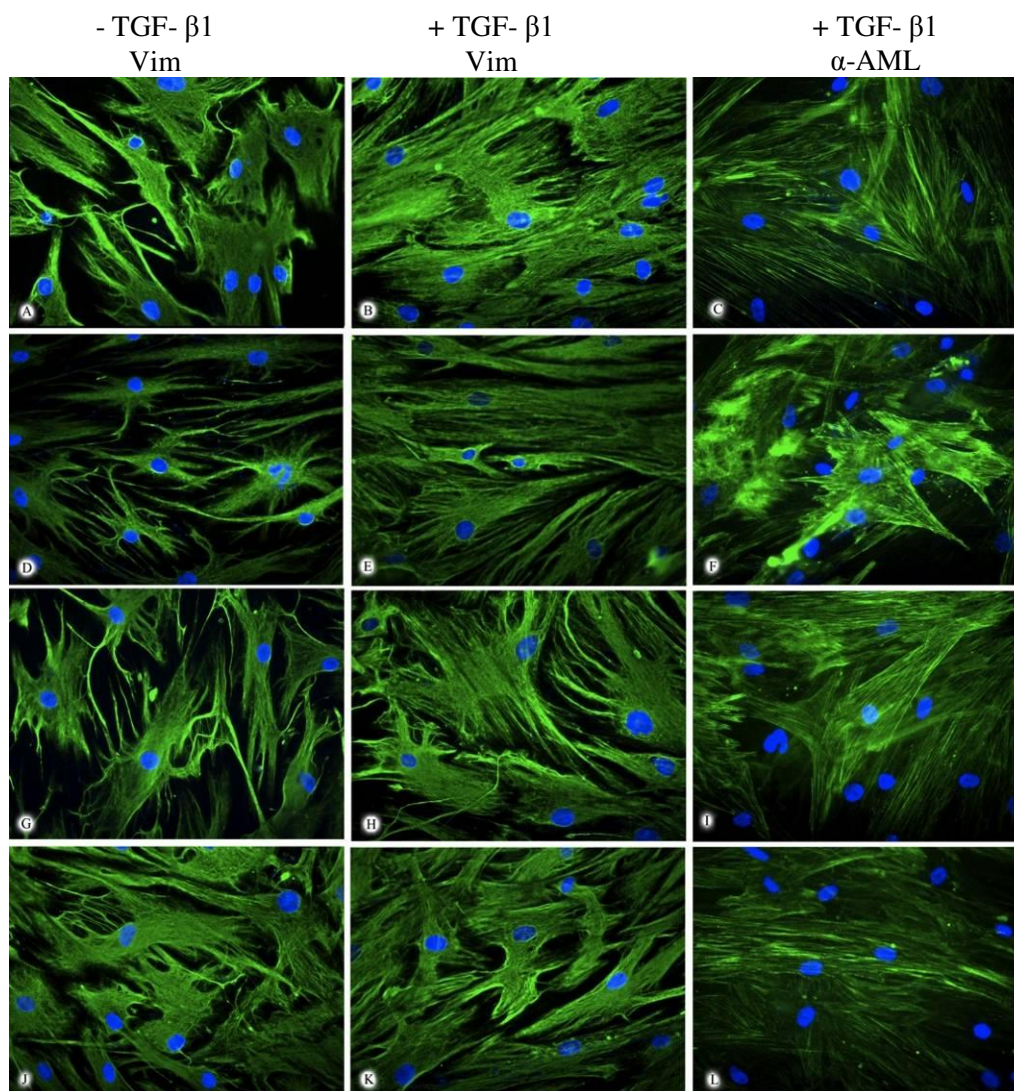


Figura 11 - Imunofluorescência indireta. Aspectos morfológicos e imunofenotípicos das células mioepiteliais cultivadas em diferentes substratos: vidro (controle) (A), matrigel (D), fibronectina (G) e colágeno tipo I (J) e com a adição do TGF- β 1 (20 ng/mL) (B, E, H, K). Anti-vimentina (verde) e anti α -AML (C, F, I, L) e marcação para DNA (DAPI, azul). Notar que em todos os grupos, as células mioepiteliais expressaram anti α -AML de forma mais homogênea em comparação aos outros grupos (controle e EGF). Aumento original: 400x.

Proliferação celular

Os resultados das células mioepiteliais de três doadores foram realizados em triplicata e a média e desvio padrão de cada triplicata foi submetida à análise estatística usando o método *two-way* ANOVA, com nível de significância 5% e analisados com o software GraphPad Prism 5.0.

Primeiramente, quando analisados os dados entre o grupo controle (poliestireno) e as diferentes matrizes, as células mioepiteliais apresentaram o mesmo padrão de proliferação, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os tipos de matrizes estudadas ($p > 0,05$) (Gráfico 3).

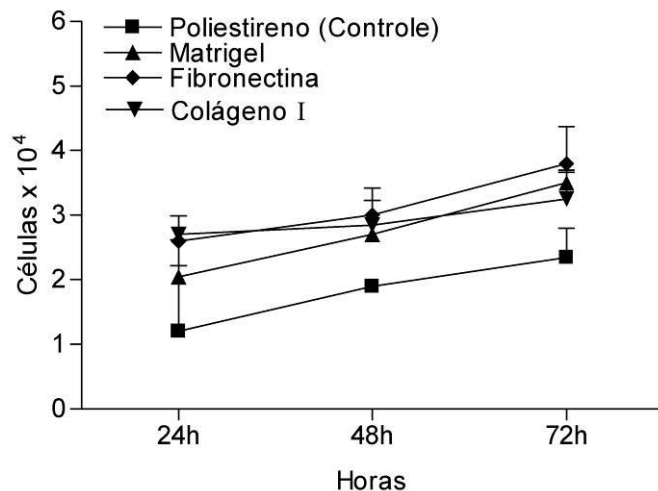


Gráfico 3 - Média \pm DP da triplicata dos grupos nos tempos de 24, 48 e 72h. Os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e as matrizes estudadas (Matrigel, Fibronectina e Colágeno tipo I) ($p > 0,05$). ANOVA *two way* seguido de Bonferroni.

Quanto ao acréscimo de diferentes doses de EGF e TGF- β 1, analisamos se a dose influenciaria na proliferação das células mioepiteliais. Entretanto, apesar de se observar aumento de proliferação com ambos os fatores de crescimento (EGF e TGF- β 1), a diferença estatística não foi significativa ($p > 0,05$) (Gráfico 4A e B).

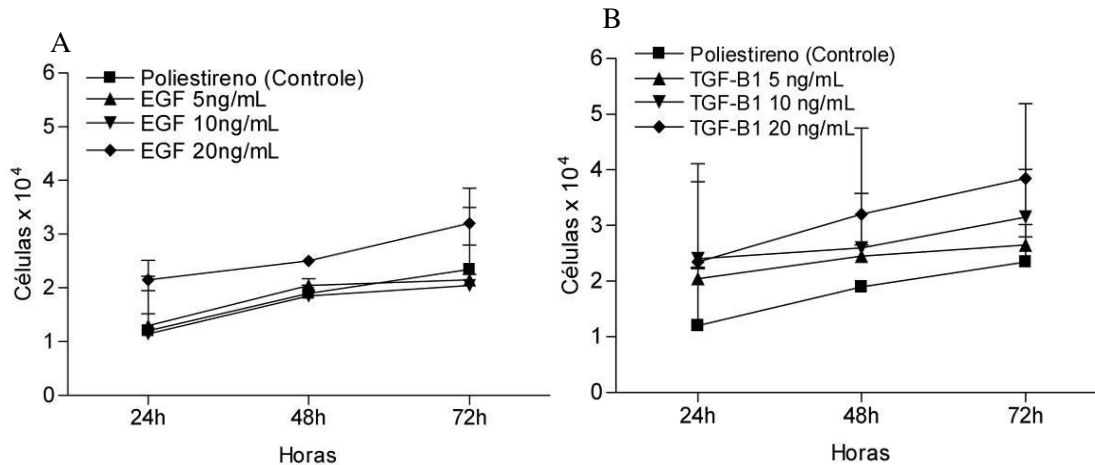


Gráfico 4 - Curva de crescimento das células mioepiteliais nos tempos avaliados: 24, 48 e 72h A) EGF: 5, 10 e 20 ng/mL; B) TGF- β 1: : 5, 10 e 20 ng/mL. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). ANOVA *two-way*, seguido de Bonferroni.

Para analisar o microambiente *in vitro* (célula + Matriz extracelular + fator de crescimento) os dados apresentados são das concentrações mais altas: 20 ng/mL para EGF e 20 ng/mL para TGF- β 1. Nota-se aumento da quantidade de células mioepiteliais após 72h, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (poliestireno sem fator de crescimento) e a matriz Matrigel com EGF (Figura 5a). Também foi observada tendência à maior proliferação com o acréscimo de TGF- β 1, porém, sem diferença estatística ($p > 0,05$) (Gráfico 5b).

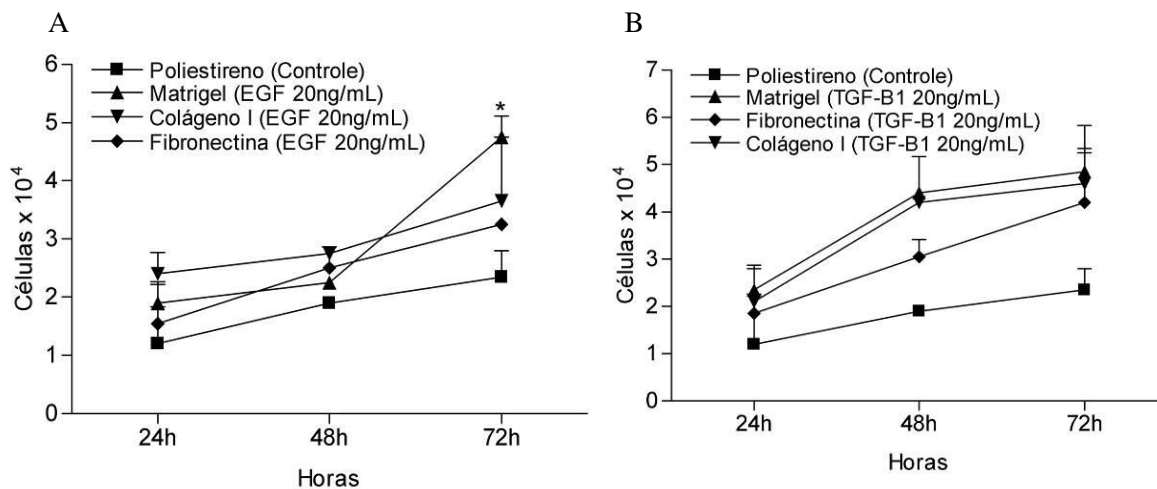


Gráfico 5 - Curva de crescimento das células mioepiteliais cultivadas em poliestireno (controle) e nas matrizes Matrigel, Fibronectina e Colágeno tipo I com o acréscimo de EGF - 20 ng/mL (A) e TGF- β 1 20 ng/mL nos tempos avaliados: 24, 48 e 72h. (*)Diferença estatística significante ($p < 0,05$) no tempo de 72h entre o grupo controle e Matrigel com o fator de crescimento EGF. ANOVA *two-way*, seguido de Bonferroni.

a) Viabilidade celular (MTT)

Utilizando o ensaio MTT nos tempos 24, 48 e 72 horas, as culturas celulares foram plaqueadas sobre as diferentes condições estudadas. Foram realizadas com as três linhagens, cinco repetições de cada amostra, onde foram calculadas a média e desvio padrão de cada grupo e os resultados foram submetidos à análise estatística usando o teste estatístico ANOVA *two-way*, seguido do pós-teste de Bonferroni, com nível de significância 5%.

As células mioepiteliais apresentaram-se viáveis e com comportamento semelhante quando analisadas entre o grupo controle (poliestireno) e as diferentes matrizes, não apresentando diferença estatisticamente significante entre elas ($p > 0,05$) (Gráfico 6).

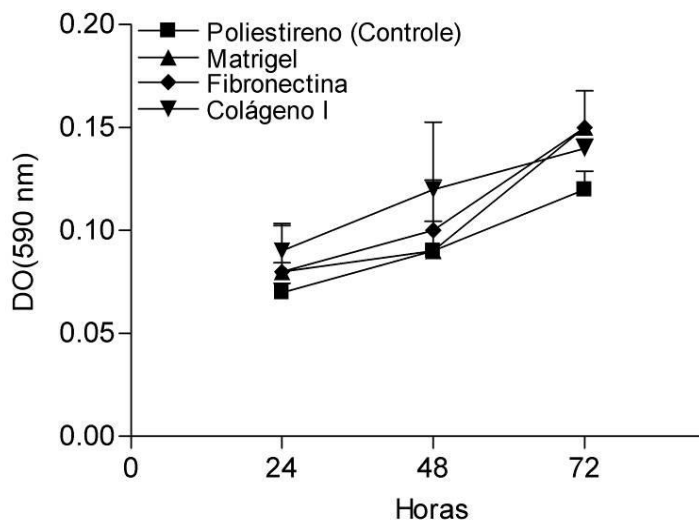


Gráfico 6 - Viabilidade celular com o teste MTT nos tempos de 24, 48 e 72h. Os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e as matrizes estudadas (Matrigel, Colágeno tipo I e Fibronectina) ($p > 0,05$). ANOVA *two way* seguido de Bonferroni.

As diferentes concentrações dos fatores de crescimento estudados não demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparadas com o grupo controle na superfície de poliestireno (Gráfico 7 a e b).

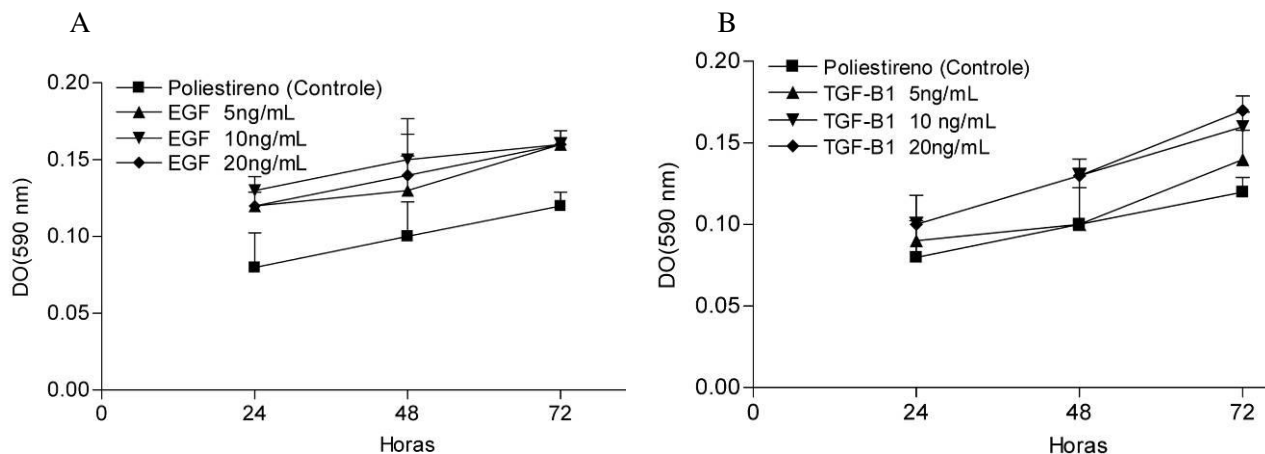


Gráfico 7 – Viabilidade celular com o teste MTT nos tempos avaliados: 24, 48 e 72h A) EGF: 5, 10 e 20 ng/mL; B) TGF- β 1: 5, 10 e 20ng/mL. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, nos diferentes tempos estudados ($p > 0,05$) ANOVA *two-way*, seguido de Bonferroni.

Porém, quando analisados os resultados pelo método do MTT nas diferentes matrizes com o acréscimo dos fatores de crescimento EGF e TGF- β 1, as células mioepiteliais exibiram aumento da viabilidade celular, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Gráfico 8 A). As células cultivadas no Matrigel e com adição de EGF apresentaram diferença no tempo de 96h. Quanto ao TGF- β 1, tal diferença na viabilidade foi observada entre o grupo controle e a fibronectina após 72h de cultivo (Gráfico 8 B).

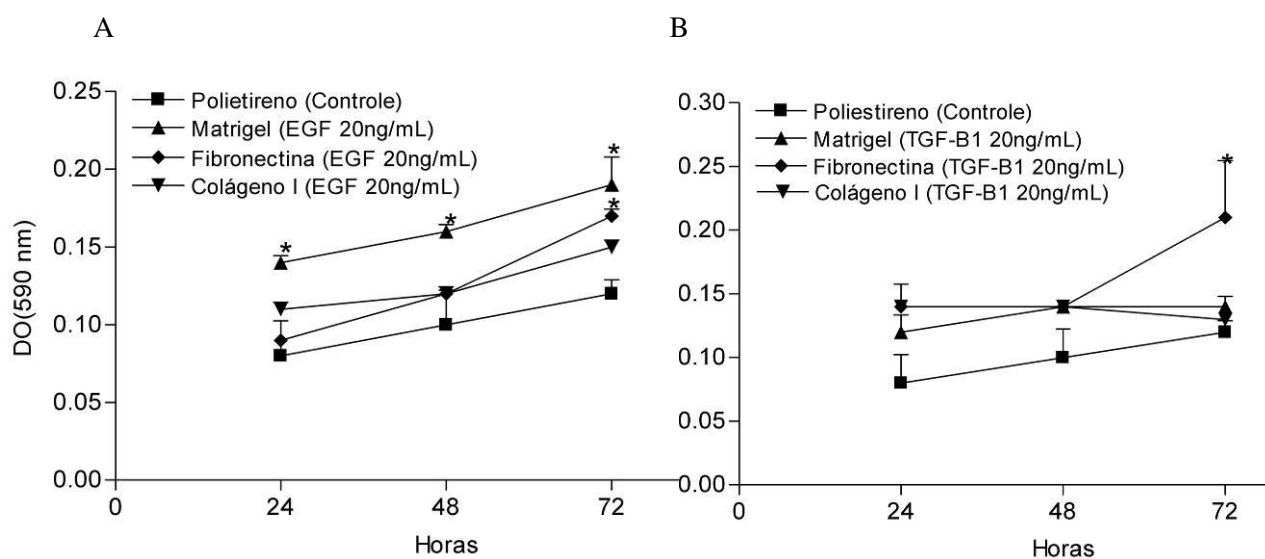


Gráfico 8 – Viabilidade celular com o teste MTT das células mioepiteliais cultivadas em polietireno (controle) e nas matrizes Matrigel, Fibronectina e Colágeno tipo I com o acréscimo de EGF - 20 ng/mL (A) e TGF- β 1 20 ng/mL nos tempos avaliados: 24, 48 e 72h. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no tempo de 72h entre o grupo controle e Matrigel; No grupo TGF- β 1 foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e Fibronectina ($p < 0,05$). ANOVA *two-way*, seguido de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

A – Adenomas de células basais

No presente estudo mostramos que os ACB-Ts apresentavam áreas bem definidas (20-70% do tumor) com características morfológicas e imunofenotípicas semelhantes às das LDIs. Em contraste, no grupo dos ACB-NT essas áreas *LDI-like* eram raras e pequenas. Como a nossa série de ACBs-NT englobou as variantes mais comuns dos ACBs (túbulo-trabecular , trabecular e sólido) esse achado era esperado, visto que os tumores deste grupo apresentam as características habituais dos ACBs, que são distintas das LDIs (Weinreb et al., 2009). No entanto, em relação aos ACBs-T mostramos que a principal diferença entre eles e as LDIs (particularmente a sua variante adenoma-*like*) foi a quantidade de células mioepiteliais que circundavam as células luminais dos ductos. Nos ACBs-T, as áreas *LDI-like* eram compostas por túbulos envoltos por uma camada de células mioepiteliais, os quais se misturavam gradualmente com aqueles que continham mais de uma camada de tal célula. Nas LDIs, a lesão era homogênea, isto é, totalmente formada por ductos revestidos externamente por apenas uma fina camada de células mioepiteliais.

Em relação ao perfil imunofenotípico das células luminais dos ACBs, nos casos de ACB-T este foi semelhante ao da LDI e marcadamente diferente nos ACB-NT. As células luminais de todas as LDIs, ACB-Ts e ACB-NTs foram positivas para CK7, que é uma citoqueratina encontrada em células luminais dos segmentos intralobulares normais da glândula salivar (Draeger et al., 1991). No entanto, a positividade difusa de células luminais por lisozima e DOG1 (expressão membranosa apical), que são marcadores do segmento do ducto intercalado (Martinez-Madrigal; Micheau, 1989; Miyazaki et al., 2001; Chênevert et

al., 2012) foi observada predominantemente nos casos de LDI e ACB-T. Em contraste, na variante ACB-NT, a reatividade das células luminais para tais marcadores era escassa. Nestes tumores, as células luminais eram positivas para CK14, geralmente com um padrão de expressão difusa. Interessantemente, em glândula salivar normal, a proteína CK14 é expressa em células basais/mioepiteliais, ao passo que nos tumores salivares a expressão de CK14 tem sido relatada principalmente nas células luminares (Araújo et al., 2000). Inclusive, em ACB sólido, que é uma variante do ACB-NT, CK14 foi reportada estar presente em células luminais, o que corrobora com nossos achados (Machado de Souza et al., 2001). Na epiderme, CK14 é produzida por células imaturas basais em proliferação, sendo que nas camadas mais externas, que são compostas por células em diferenciação terminal, CK14 deixa de ser expressa (Fuchs; Cleveland, 1998). Fazendo um paralelo entre esse comportamento da expressão de CK14 na epiderme e os nossos achados em ACBs-NT, é provável que a positividade para CK14 nas células luminais de ACBs-NT possa ser devido ao seu fenótipo menos maduro. Considerados em conjunto, os nossos resultados sugerem que as células luminais dos ACBs apresentam um perfil imuno-histoquímico que reflete os vários estágios de diferenciação do tumor. Os ACB-NT seriam os tumores menos diferenciados, visto que suas células luminais ductais exibem um fenótipo *basal-like* (CK14 +). Os ACBs-T seriam as lesões mais diferenciadas, pois como nas LDIs, as células luminais dos ACBs-T recapitulam o imunofenótipo dos ductos intercalares normais (CK7 +, lisozima + e DOG1 +).

Em relação ao perfil imunofenotípico das células mioepiteliais, usando calponina, AML, CK14 e p63 como marcadores, mostramos que as células mioepiteliais das LDIs e ACBs-T preenchem os critérios imunofenotípicos de uma célula mioepitelial clássica. Calponina, AML, CK14 e p63 são expressos em células mioepiteliais normais e na

nossa série de LDIs e ACB-T eles estavam fortemente expressos nestas células. Estes marcadores destacaram que a quantidade de células basais/mioepiteliais envolvendo as luminais era maior no ACB-T do que nas LDIs. No grupo ACB-NT, os nossos achados em relação às células basais/mioepiteliais foram semelhantes aos relatados na literatura para este componente do ACB (Zarbo et al., 2000; Edwards et al., 2004). Nos ACBs-NT, os marcadores CK14, calponina, AML e p63 estavam predominantemente expressos na porção periférica dos ninhos e trabéculas tumorais. Além disso, pela primeira vez na literatura, foi demonstrada a expressão de DOG1 em células basais/mioepiteliais nos ACB. Apenas as células mioepiteliais salivares neoplásicas (transformadas) têm sido reportadas apresentarem expressão de DOG1 (Chênevert et al., 2012). Como esperado, as células basais/mioepiteliais da maioria dos nossos casos de ACBs-T e ACB-NT expressaram DOG1. No entanto, em nossa série de LDIs, essas células foram raramente positivas para DOG1. É provável que a expressão de DOG1 nas células mioepiteliais das LDIs possa ser um fenômeno heterogêneo, visto que Chênevert e colaboradores (2012) relataram ter detectado esta proteína em algumas LDIs (duas de quatro lesões), enquanto que em nossa série de LDIs tal expressão não foi observada. É tentadora a hipótese de que o imunofenótipo das células mioepiteliais poderia mudar gradualmente durante a progressão de LDI para ACB (lesão neoplásica). Conseqüentemente, o fenótipo transformado seria visto na maioria dos ACBs, mas apenas em algumas LDIs.

Quanto à hipótese de que o ACB pode surgir através da LDI, os achados em um dos nossos casos a apoiam. Neste caso, a glândula parótida abrigava múltiplas LDIs (de hiperplásica a adenoma-like), ACBs-T e lesões com características combinadas de ambos. Interessantemente, o ACB membranoso tem sido descrito coexistindo com proliferações multifocais de ductos salivares e microadenomas, permitindo que Herbst & Utz (1984) e

Yu et al. (1998) traçassem a evolução destas lesões para ACB membranoso. Nesses estudos, os dois microadenomas e pequenos nódulos de proliferação ductais já exibiam características de ACBs membranosos, ou seja, amplas membranas basais e ninhos epiteliais sólidos com células periféricas em paliçada. Como as características morfológicas das LDIs (definido por Weinreb et al. 2009 e adotado aqui) diferem daquelas observadas em ACBs membranosos, é razoável acreditar que o perfil da lesão precursora já está comprometido com a variante do ACB. Além disso, as LDIs parecem ter um amplo espectro de transformação, incluindo a progressão para lesões malignas. Além de ACB, as LDIs parecem ser lesões precursoras de alguns carcinomas epiteliais-mioepiteliais (Di Palma, 1994; Chetty, 2000). Como o adenocarcinoma de células basais é a contraparte maligna dos ACBs, seria interessante investigar, no futuro, se o adenocarcinoma de células basais com arquitetura tubular tem também relação com as LDIs.

Em conclusão, as LDI, ACB-T e ACB-NT formam um *continuum* de lesões onde as LDIs estão estreitamente relacionadas com o ACB-T, visto que em ambos o imunofenótipo das células luminiais e mioepiteliais é semelhante àquele observado nos ductos intercalados. A principal diferença entre LDI e ACB-T é a quantidade de células mioepiteliais, que é maior no último. Além disso, nossos resultados indicam que pelo menos alguns ACBs podem surgir via LDI.

B) Cultura de células

Com relação à segunda etapa do nosso trabalho, dentre todos os tumores salivares, o adenoma pleomórfico, a neoplasia mais comum da glândula salivar, é aquele que mostra maior diversidade morfológica e imunofenotípica da célula mioepitelial. Neste tumor, a célula mioepitelial pode apresentar aspecto basaloide, epitelióide, clara, fusiforme e plasmocitoide (Dardick, van Nostrand, 1985; Dardick et al., 1989; Ogawa, 2003; Saverá, Zarbo, 2004). Dessa forma, o adenoma pleomórfico é um excelente modelo para analisar as diferentes características morfológicas e as diferentes modificações fenotípicas das células mioepiteliais no microambiente tumoral. Acredita-se que, possivelmente, sinalizações externas advindas da matriz extracelular ou de fatores de crescimento poderiam modificar o fenótipo desta célula (Saverá et al., 1997).

As células mioepiteliais desempenham papel crítico na morfogênese de vários tumores salivares. Dentre esses estão incluídas neoplasias benignas (adenoma pleomórfico, adenoma de células basais, mioepitelioma e Lesão do Ducto Intercalado) e malignas (carcinoma epitelial-mioepitelial, carcinoma adenoide-cístico e carcinoma mioepitelial).

No presente estudo, usando cultura de células, mostramos que a morfologia da célula mioepitelial advinda do adenoma pleomórfico não se modificou significativamente com a mudança de matriz celular e nem com a adição dos fatores de crescimento EGF e TGF- β 1. A morfologia celular foi avaliada através da expressão de vimentina, que é o maior filamento intermediário insolúvel presente em células eucariotas e tem uma importante função estrutural. Além disso, esta proteína tem sido apontada como um marcador eficiente de células mioepiteliais neoplásicas (Araújo et al., 2000).

No nosso estudo, as células mioepiteliais exibiram padrão morfológico poliédrico, que se manteve em todas as matrizes extracelulares testadas. Estes achados reforçam aqueles reportados recentemente pelo nosso grupo num estudo *in vitro* sobre a influência da matriz extracelular em células mioepiteliais estimuladas por meio condicionado maligno (Martinez et al 2012). As células mioepiteliais mantinham a forma poliédrica sobre os substratos fibronectina e colágeno tipo I, mesmo quando estimuladas pelo meio condicionado maligno. Possivelmente, a forma poliédrica é devido a adesões focais das células mioepiteliais à matriz extracelular, as quais foram detectadas através de estudo ultraestrutural (Martinez et al., 2012). Interessantemente, no nosso presente estudo, a forma poliédrica da célula mioepitelial foi observada inclusive na cultura controle, onde estas cresceram sobre vidro. Este aspecto sugere que essas adesões focais, que possivelmente determinam a morfologia poliédrica, não são estimuladas pela matriz extracelular. Entretanto, é conhecido que no microambiente tecidual, a matriz extracelular exerce várias funções, entre elas funcionando como pontos de fixação, possibilitando a ancoragem celular (Hib, Robertis, 2006).

Para o desenvolvimento do tumor, além das células neoplásicas e estromais e da matriz extracelular, fatores de crescimento (peptídeos que controlam o crescimento e a diferenciação celular) também participam da progressão tumoral. No presente estudo avaliamos o *Epidermal Growth Factor* (EGF) e o *Transforming Growth Factor - β 1* (TGF- β 1). O EGF exerce inúmeras funções mitogênicas e está envolvido em funções antiapoptóticas e morfogênicas. O TGF- β 1 é um polipeptídeo multifuncional que participa de uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, tais como diferenciação, crescimento celular, angiogênese e progressão tumoral, além de participar ativamente na

transição epitélio-mesênquima e contribuir para invasão tumoral (Oyanagi et al., 2012). O TGF- β 1 é um regulador negativo do crescimento das células epiteliais normais, suprime o crescimento de células tumorais nos estágios iniciais da carcinogênese, porém, promove a progressão do tumor em estágios posteriores.

Quando os fatores de crescimento se ligam a um receptor específico, eles ativam uma série de alvos intracelulares (Derynck et al. 2001). Os receptores para EGF são receptores proteicos do tipo tirosina-quinase, que formam uma família de quatro receptores: ErbB-1 (Her-1 ou EGFR), ErbB-2 (Her-2 ou neu), ErbB-3 (Her-3) e ErbB-4 (Her-4) (Casalini et al. 2004). A superexpressão do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e ErbB-2 tem sido demonstrada em tumores de mama (Gschwantler-Kaulich et al. 2005), câncer de próstata (Signoretti et al. 2000) e em tumores de glândulas salivares (Khiavi et al., 2012; Ettl et al., 2012). Já os receptores dos membros da família do TGF- β 1 são proteína-quinases que fosforilam os resíduos de serina e treonina (em vez de tirosina). Dessa forma, o TGF- β 1 pode inibir a proliferação das suas células alvo em um processo fisiológico, enquanto que em um processo neoplásico essa característica pode promover a proliferação celular.

Para avaliar a influência dos fatores crescimento EGF e TGF- β 1 na diferenciação das célula mioepiteliais do adenoma pleomórfico, avaliamos a expressão da α -AML, que durante o desenvolvimento das células mioepiteliais da glândula salivar, surge num estágio posterior ao da vimentina (Ogawa, 2003). A célula mioepitelial tem aspectos tanto de célula epitelial como de muscular. A α -AML é uma proteína, que em conjunto com a miosina e moléculas de ATP, gera contração em todas as células musculares lisas. Os microfilamentos de actina (5-7 nm de diâmetro), além de serem importantes na composição

do citoesqueleto, são considerados marcadores úteis de célula mioepitelial salivar normal e neoplásica (de Araújo et al., 1994; Ogawa, 2003; Furuse et al., 2005).

Nos nossos achados observamos superexpressão de α -AML nas células mioepiteliais quando tratadas com o fator de crescimento TGF- β 1, independentemente do tipo de matriz co-cultivada. Em glândulas salivares normais (maduras e em desenvolvimento), tão bem como nos adenomas pleomórficos, não tem sido encontrada expressão de TGF- β 1 (Kusafuka et al. 2001; Lourenço et al. 2008; Migueta et al. 2010). Este aspecto contrasta com as isoformas TGF- β 2 e TGF- β 3 que são expressas nas células ductais e mioepiteliais, respectivamente, e consideradas importantes para o desenvolvimento e diferenciação da glândula salivar (Lourenço et al., 2008). Entretanto, durante o desenvolvimento da glândula salivar, no seu estágio de canalização, o TGF- β 1 é detectado no mesênquima circunjacente (Lourenço et al. 2008). Este fato, em conjunto com o nosso achado de superexpressão de α -AML nas células mioepiteliais, quando tratadas com o fator de crescimento TGF- β 1, leva-nos a especular que, embora não expresso na célula mioepitelial, esse fator poderia ser importante na indução de expressão de α -AML nesta célula. Em carcinomas ex adenomas pleomórficos, as células mioepiteliais benignas que circundam as luminares malignas, apresentam superexpressão de várias proteínas citoplasmáticas, entre elas a α -AML (de Araújo et al. 2006). É conhecido que as células malignas são autossuficientes na produção de fatores de crescimento (entre eles TGF- β 1). Portanto, baseado nos nossos resultados *in vitro*, TGF- β 1 seria um fator candidato a influenciar a modificação da expressão de α -AML nas células mioepiteliais benignas circundando as malignas, nas fases iniciais do carcinoma ex adenoma pleomórfico.

No presente estudo também investigamos se proteínas da matriz extracelular e os fatores de crescimento EGF e TGF- β 1 teriam influência no comportamento biológico (proliferação e viabilidade) das células mioepiteliais advindas do adenoma pleomórfico. Para análise da viabilidade celular usamos o contador automatizado Vi-Cell, pois este equipamento analisa significativamente mais células do que o tradicional hemocítômetro, proporcionando assim maior confiança estatística. Além disso, a técnica tradicional gera uma inerente variação de operador para operador (Parham et al. 2002). Encontramos aumento gradativo da proliferação e da viabilidade das células mioepiteliais com o tempo (24, 48 e 72 horas) nos experimentos com diferentes matrizes e com adição de EGF e TGF- β 1. Entretanto, a diferença em relação ao controle só foi significativa quanto à viabilidade das células mioepiteliais cultivadas sobre o substrato fibronectina, no qual foi adicionado EGF ou TGF- β 1. Em ambos, a diferença foi significativa, apenas após 72 horas. Em relação ao EGF, mas não ao TGF- β 1, também encontramos maior viabilidade, quando esse fator foi adicionado nas células cultivadas sobre matrigel.

Esses achados sugerem uma resposta limitada quanto à proliferação e viabilidade das células mioepiteliais do adenoma pleomórfico á estímulos do microambiente simulados em nosso estudo *in vitro*. Dentre os estímulos avaliados, os nossos resultados apontam que a associação fibronectina com fator de crescimento teria capacidade de influenciar o comportamento biológico da célula mioepitelial. A fibronectina é uma glicoproteína fibrosa de 440 kDa, constituída por duas subunidades polipeptídicas, que são ligadas entre si por pontes dissulfeto (Hib, Robertis, 2006). Encontra-se no plasma, onde tem função de opsonina, na superfície celular, onde tem o papel de molécula de adesão e, também, como fibrilas da matriz. É produzida por diversos tipos celulares, tais

como macrófagos e fibroblastos (Andrade, 1999) e é considerada como a maior glicoproteína da matriz extracelular, envolvida na adesão célula/matriz e célula/célula, na migração celular, na morfogênese, na diferenciação e na transformação observadas na oncogênese (Ioachim et al., 2002). Interessantemente, no carcinoma ex-adenoma pleomórfico, a fibronectina aparece em quantidade aumentada no fronte invasivo dos carcinomas sem diferenciação mioepitelial e é ausente naqueles com tal diferenciação (de Araújo et al. 2006). Portanto, este aspecto da influência da fibronectina com EGF ou TGF- β 1 sobre o comportamento biológico da célula mioepitelial necessita de mais estudos para o seu entendimento.

7. CONCLUSÕES

A)

As LDI, ACB-T e ACB-NT formam um *continuum* de lesões onde as LDIs estão estreitamente relacionadas com o ACB-T, visto que em ambos o imunofenótipo das células luminiais e mioepiteliais é semelhante àquele observado nos ductos intercalados. A principal diferença entre LDI e ACB-T é a quantidade de células mioepiteliais, que é maior no último. Além disso, nossos resultados indicam que pelo menos alguns ACBs podem surgir via LDI.

B)

- a) As diferentes matrizes celulares não influenciaram a morfologia e diferenciação da célula mioepitelial avaliada através das expressões de vimentina e AML, respectivamente.
- b) Dentre os fatores de crescimento estudados (EGF e TGF- β 1), apenas TGF- β 1 associou-se com aumento da expressão de AML (diferenciação celular)
- c) Os fatores de crescimento e as matrizes celulares não influenciaram a proliferação das células mioepiteliais.
- d) A associação da matriz fibronectina com o fator TGF- β 1 aumentou significativamente a viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

Andrade ZA, Grimaud JA. Tecido conjuntivo – reparo, regeneração e cicatrização. In: Franco M, Montenegro MR, Brito T, Bacchi CE, Almeida PC. Patologia Processos gerais 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.p.159-74.

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

Araújo VC, Demasi AP, Furuse C, Altemani A, Alves VA, Freitas LL, Araújo NS. Collagen type I may influence the expression of E-cadherin and beta-catenin in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009 Jul;17(4):312-8.

Araújo VC. Basal cell adenoma. In: Leon Barnes; John W. Eveson; Peter Reichart; David Sidransky. (Org.). World Health Organization classification of tumors - Pathology & Genetics Head and neck tumors. Lyon - France: IARC Library Cataloguing in Publication Data, 2005, p. 261-262.

Auclair PL, Ellis GL. Atypical features in salivary gland mixed tumors: their relationship to malignant transformation. *Mod Pathol*. 1996 Jun;9(6):652-7.

Barsky SH. Myoepithelial mRNA expression profiling reveals a common tumor-suppressor phenotype. *Exp Mol Pathol* 2003 Apr;74(2):113-22.

BD Biosciences, BD matrigel matrix, frequently asked questions. 2011.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):332-7.

Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001 Oct;1(1):46-54.

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994 Nov 10;331(19):1286-92.

Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science*. 2008 Oct 24;322(5901):590-4.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1990 May 15;265(14):7709-12.

Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E, Ménard S. Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol*. 2004 Sep;200(3):343-50.

Chênevert J, Duvvuri U, Chiosea S, Dacic S, Cieply K, Kim J, Shiwarski D, Seethala RR. DOG1: a novel marker of salivary acinar and intercalated duct differentiation. *Mod Pathol*. 2012 Jul;25(7):919-29.

Chênevert J, Duvvuri U, Chiosea S, Dacic S, Cieply K, Kim J, Shiwarski D, Seethala RR. DOG1: a novel marker of salivary acinar and intercalated duct differentiation. *Mod Pathol*. 2012 Jul;25(7):919-29.

Chetty R. Intercalated duct hyperplasia: possible relationship to epithelial-myoeepithelial carcinoma and hybrid tumours of salivary gland. *Histopathology*. 2000 Sep;37(3):260-3.

Dardick I, Lytwyn A, Bourne AJ, Byard RW. Trabecular and solid-cribriform types of basal cell adenoma. A morphologic study of two cases of an unusual variant of monomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992 Jan;73(1):75-83.

Dardick I, Rippstein P, Sikmning L, Boivin M, Parks W, Dairkee S. Immunohistochemistry and ultrastructure of myoeepithelium and modified myoeepithelium of the ducts of human major salivary glands: histogenetic implications for salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Pathol*. 1987; 64():703-15.

Dardick I, Thomas MJ, van Nostrand AW. Myoeepithelioma--new concepts of histology and classification: a light and electron microscopic study. *Ultrastruct Pathol*. 1989 Mar-Jun;13(2-3):187-224.

Dardick I, van Nostrand AW. Myoeepithelial cells in salivary gland tumors--revisited. *Head Neck Surg*. 1985 May-Jun;7(5):395-408.

Dardick I. Myoeepithelioma: definitions and diagnostic criteria. *Ultrastruct Pathol*. 1995 Sep-Oct;19(5):335-4.

de Araújo VC, Altemani A, Furuse C, Martins MT, de Araújo NS. Immunoprofile of reactive salivary myoeepithelial cells in intraductal areas of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Oral Oncol*. 2006 Nov;42(10):1011-6.

de Araujo VC, Carvalho YR, de Araujo NS. Actin versus vimentin in myoeepithelial cells of salivary gland tumors. A comparative study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Apr;77(4):387-91.

De Wever O, Sobczak-Thépot J, Vercoutter-Edouart AS, Michalski JC, Ouelaa-Benslama R, Stupack DG, Bracke M, Wang JY, Gespach C, Emami S. Priming and potentiation of DNA damage response by fibronectin in human colon cancer cells and tumor-derived myofibroblasts. *Int J Oncol*. 2011 Aug;39(2):393-400.

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 2001 Oct;29(2):117-29.

Di Palma S. Epithelial-myoeepithelial carcinoma with co-existing multifocal intercalated duct hyperplasia of the parotid gland. *Histopathology*. 1994 Nov;25(5):494-6.

Draeger A, Nathrath WB, Lane EB, Sundström BE, Stigbrand TI. Cytokeratins, smooth muscle actin and vimentin in human normal salivary gland and pleomorphic adenomas. Immunohistochemical studies with particular reference to myoeepithelial and basal cells. *APMIS*. 1991 May;99(5):405-15.

Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD. Assessment of p63 expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and basal cell and canalicular adenomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 May;97(5):613-9.

Ettl T, Stiegler C, Zeitler K, Agaimy A, Zenk J, Reichert TE, Gosau M, Kühnel T, Brockhoff G, Schwarz S. EGFR, HER2, survivin, and loss of pSTAT3 characterize high-

grade malignancy in salivary gland cancer with impact on prognosis. *Hum Pathol.* 2012 Jun;43(6):921-31.

Freitas VM, Rangel M, Bisson LF, Jarger RG, Machado- Santelli GM. The Geodiamolide H, derived from Brazilian sponge *Geodia Corticostylifera*, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. *J Cell Physiol* 2008;216:583-94.

Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 1998 Jan 23;279(5350):514-9.

Furuse C, Cury PR, de Araújo NS, de Araújo VC. Application of two different clones of vimentin to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006 Jun;14(2):217-9.

Furuse C, Sousa SO, Nunes FD, Magalhães MH, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *Int J Surg Pathol.* 2005 Jan;13(1):57-65.

Gardner DG, Daley TD. The use of the terms monomorphic adenoma, basal cell adenoma, and canalicular adenoma as applied to salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983 Dec;56(6):608-15.

Gschwantler-Kaulich D, Hudelist G, Koestler WJ, Czerwenka K, Mueller R, Helmy S, Ruecklinger E, Kubista E, Singer CF. EGFR activity in HER-2 over-expressing metastatic breast cancer: evidence for simultaneous phosphorylation of

Gudjonsson T, Adriance MC, Sternlicht MD, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005 Jul;10(3):261-72.

Heino J, Igotz RA, Hemler ME, Crouse C, Massagué J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem.* 1989 Jan 5;264(1):380-8.

Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal.* 2006 Dec;18(12):2089-97.

Herbst EW, Utz W. Multifocal dermal-type basal cell adenomas of parotid glands with co-existing dermal cylindromas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1984;403(1):95-102.

Hib E, Hib J. *Bases da biologia celular e molecular.* 4a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. P. 95-105.

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Oct;17(5):548-58

Hynes RO. Fibronectins. In: Rich A, editor. New York:Springer-Verlag, 1990: 113-175.

Igotz RA, Massagué J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell.* 1987 Oct 23;51(2):189-97.

Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL, Agnantis NJ, Pavlidis N. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer*. 2002 Dec;38(18):2362-70.

Jia D, Yan M, Wang X, Hao X, Liang L, Liu L, Kong H, He X, Li J, Yao M. Development of a highly metastatic model that reveals a crucial role of fibronectin in lung cancer cell migration and invasion. *BMC Cancer*. 2010 Jul 9;10:364.

Jones JL, Shaw JA, Pringle JH, Walker RA. Primary breast myoepithelial cells exert an invasion-suppressor effect on breast cancer cells via paracrine down-regulation of MMP expression in fibroblasts and tumour cells. *J Pathol* 2003; 201(4):562-72.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):31-53.

Jung J, Nam JH, Park HW, Oh U, Yoon JH, Lee MG. Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO₃⁽⁻⁾ permeability by Ca²⁺/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 2;110(1):360-5.

Khiavi MM, Vosoughhosseini S, Saravani S, Halimi M. Immunohistochemical correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 with histopathologic grading of mucoepidermoid carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2012 Oct-Dec;8(4):586-90.

Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Takemura T. Immunohistochemical localization of members of the transforming growth factor (TGF)-beta superfamily in normal human salivary glands and pleomorphic adenomas. *J Oral Pathol Med*. 2001 Aug;30(7):413-20.

Lourenço SV, Uyekita SH, Lima DM, Soares FA. Developing human minor salivary glands: morphological parallel relation between the expression of TGF-beta isoforms and cytoskeletal markers of glandular maturation. *Virchows Arch*. 2008 Apr;452(4):427-34.

Machado de Sousa SO, Soares de Araújo N, Corrêa L, Pires Soubhia AM, Cavalcanti de Araújo V. Immunohistochemical aspects of basal cell adenoma and canalicular adenoma of salivary glands. *Oral Oncol*. 2001 Jun;37(4):365-8.

Mărgăritescu C, Mercuț V, Mogoantă L, Florescu M, Simionescu C, Cionca L, Manea M. Salivary gland Basal cell adenomas--immunohistochemical evaluation of four cases and review of the literature. *Rom J Morphol Embryol*. 2005;46(1):29-40.

Martinez EF, Demasi AP, Miguita L, Altemani A, Araújo NS, Araújo VC. FGF-2 is overexpressed in myoepithelial cells of carcinoma ex-pleomorphic adenoma in situ structures. *Oncol Rep*. 2010 Jul;24(1):155-60.

Martinez EF, Demasi AP, Napimoga MH, Arana-Chavez VE, Altemani A, de Araújo NS, de Araújo VC. In vitro influence of the extracellular matrix in myoepithelial cells stimulated by malignant conditioned medium. *Oral Oncol*. 2012 Feb;48(2):102-9.

Martinez-Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol*. 1989 Oct;13(10):879-99.

- Miguaita L, Martinez EF, de Araújo NS, de Araújo VC. FGF-2, TGFbeta-1, PDGF-A and respective receptors expression in pleomorphic adenoma myoepithelial cells: an in vivo and in vitro study. *J Appl Oral Sci.* 2010 Jan-Feb;18(1):83-91.
- Miyazaki T, Inoue Y, Takano K. Seromucous cells in human sublingual glands: examination by immunocytochemistry of lysozyme. *Arch Histol Cytol.* 2001 Aug;64(3):305-12.
- Ogawa Y. Immunocytochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. *Prog Histochem Cytochem.* 2003;38(4):343-426.
- Oyanagi J, Ogawa T, Sato H, Higashi S, Miyazaki K. Epithelial-mesenchymal transition stimulates human cancer cells to extend microtubule-based invasive protrusions and suppresses cell growth in collagen gel. *PLoS One.* 2012;7(12):e53209.
- Paker I, Yilmazer D, Arikok AT, Saylam G, Hucumenoglu S. Basal cell adenoma with extensive squamous metaplasia and cellular atypia: a case report with cytohistopathological correlation and review of the literature. *Diagn Cytopathol.* 2012 Jan;40(1):48-55.
- Parham DM, Ready R, Stine K, Quiggins C, Becton D, North P. Comparison of manual and automated leukocyte counts for determination of the absolute neutrophil count: application to a pediatric oncology clinic. *Med Pediatr Oncol.* 2002 Mar;38(3):183-6.
- Pulitzer DR, Reed RJ, Megehee JA. Tubuloalveolar adenoma of salivary gland. *Hum Pathol.* 1985 Jun;16(6):641-4.
- Radisky D, Hagios C, Bissell MJ. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol* 2001; 11(2):87-95.
- Redman RS. Myoepithelium of salivary glands. *Microsc Res Tech.* 1994; 27(1):25-45.
- Ritzenthaler JD, Han S, Roman J. Stimulation of lung carcinoma cell growth by fibronectin-integrin signalling. *Mol Biosyst.* 2008 Dec;4(12):1160-9.
- Roberts AB, Thompson NL, Heine U, Flanders C, Sporn MB. Transforming growth factor-beta: possible roles in carcinogenesis. *Br J Cancer.* 1988 Jun;57(6):594-600.
- Savera AT, Gown AM, Zarbo RJ. Immunolocalization of three novel smooth muscle-specific proteins in salivary gland pleomorphic adenoma: assessment of the morphogenetic role of myoepithelium. *Mod Pathol.* 1997 Nov;10(11):1093-100.
- Savera AT, Zarbo RJ. Defining the role of myoepithelium in salivary gland neoplasia. *Adv Anat Pathol.* 2004; 11(2): 69-85.
- Signoretti S, Montironi R, Manola J, Altimari A, Tam C, Bublely G, Balk S, Thomas G, Kaplan I, Hlatky L, Hahnfeldt P, Kantoff P, Loda M. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Dec 6;92(23):1918-25.
- Sternlicht MD, Barsky SH. The myoepithelial defense: a host defense against cancer. *Med Hypotheses* 1997; 48(1):37-46.

Sternlicht MD, Safarians S, Rivera SP, Barsky SH. Characterizations of the extracellular matrix and proteinase inhibitor content of human myoepithelial tumors. *Lab Invest.* 1996 Apr;74(4):781-96.

Takahashi H, Fujita S, Okabe H, Tsuda N, Tezuka F. Immunohistochemical characterization of basal cell adenomas of the salivary gland. *Pathol Res Pract.* 1991 Mar;187(2-3):145-56.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression. *Bull Acad Natl Med.* 2009 Dec;193(9):1969-78.

Tlsty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol* 2001; 11(2):97-104.

Weinreb I, Seethala RR, Hunt JL, Chetty R, Dardick I, Perez-Ordoñez B. Intercalated duct lesions of salivary gland: a morphologic spectrum from hyperplasia to adenoma. *Am J Surg Pathol.* 2009 Sep;33(9):1322-9.

West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, van de Rijn M. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol.* 2004 Jul;165(1):107-13.

Yu GY, Donath K. Adenomatous ductal proliferation of the salivary gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Feb;91(2):215-21.

Yu GY, Ussmueller J, Donath K. Histogenesis and development of membranous basal cell adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Oct;86(4):446-51.

Zarbo RJ, Prasad AR, Regezi JA, Gown AM, Saveria AT. Salivary gland basal cell and canalicular adenomas: immunohistochemical demonstration of myoepithelial cell participation and morphogenetic considerations. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Mar;124(3):401-5.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEP/FCM-UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 07/07/11
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 392/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0336.0.146.146-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DO IMUNOFENÓTIPO DOS ADENOMAS DE CÉLULAS BASAIS (ENFATIZANDO SUA RELAÇÃO COM AS LESÕES DO DUCTO INTERCALADO) E DAS CÉLULAS MIOEPITELIAIS INFLUENCIADAS POR FATORES DO MICROAMBIENTE TUMORAL”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Victor Angelo Martins Montalli

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/05/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 07/07/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS

Analisar a expressão de citoqueratinas, proteína s-100, receptores de estrógeno e progesterona, lisozima, alfa 1 antitripsina, calponina, actina músculo liso, miosina músculo liso, p63 e vimentina nos componentes epitelial e mioepitelial em uma série de lesões do ducto intercalado e adenomas de células basais; comparar a expressão dos marcadores nos diferentes subtipos de ACBs com as dos ductos intercalados normais e LDIs; analisar *in vitro* a ação dos fatores de crescimento sob influência de diferentes proteínas na matriz extracelular, na morfologia, viabilidade e proliferação celular das células mioepiteliais da adenoma pleomórfico.

III – SUMÁRIO

Trata-se de um estudo retrospectivo que utilizará casos de arquivos de biópsias e de peças cirúrgicas de pacientes portadores de neoplasias benignas da glândula salivar (adenomas de células basais e lesões do ducto intercalado).

Esclarece-se que a pesquisa utilizará apenas material disponível no arquivo, não sendo necessário dispor de novas biópsias para confirmação diagnóstica nem experimentação em animais de laboratório. A segunda parte da pesquisa utilizará cultura de células mioepiteliais obtidas de adenomas pleomórficos que já fazem parte do arquivo de cultura de células, tendo aprovação prévia do CEP da faculdade de odontologia São Leopoldo Mandic (protocolo n° 2009/0014). Devido à impossibilidade de obtenção do consentimento informado de todos os pacientes, os pesquisadores solicitam a dispensa do TCLE.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Respostas às pendências na forma de emenda do protocolo original, excluindo as amostras provenientes da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, limitando as amostras do HC/UNICAMP na forma de material armazenado em bloco de para fina. Aprovado com dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP