

**REBECA DE SOUZA AZEVEDO**

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE  
CITOQUERATINAS E ACTINA DE MÚSCULO LISO EM  
CARCINOMAS MUCOEPIDERMÓIDES DE GLÂNDULAS  
SALIVARES EM SUAS DIFERENTES GRADAÇÕES  
HISTOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de mestre em Estomatopatologia, área de concentração em Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ramôa Pires

**PIRACICABA – SP**

**2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Az25e                      Azevedo, Rebeca de Souza.  
Expressão imunohistoquímica de citoqueratinas e actina de músculo liso em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares em suas diferentes gradações histológicas. / Rebeca de Souza Azevedo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Fábio Ramôa Pires.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Histologia. 2. Carcinoma mucoepidermóide. I. Pires, Fábio Ramôa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Immunohistochemical expression of cytokeratins and smooth muscle actin in salivary gland mucoepidermoid carcinomas in its different histologic gradings of malignancy

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Histology. 2. Carcinoma, mucoepidermoid

Área de Concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Abel Silveira Cardoso, Márcio Ajudarte Lopes, Fábio Ramôa Pires

Data da Defesa: 26-02-2007

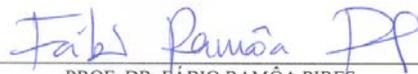
Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata REBECA DE SOUZA AZEVEDO aprovada.



PROF. DR. FÁBIO RAMÔA PIRES



PROF. DR. ABEL SILVEIRA CARDOSO



PROF. DR. MARCIO AJUDARTE LOPES

## DEDICATÓRIA

A **Deus**, o grande responsável pela minha vida. Por me guiar em todas as minhas escolhas e se fazer presente em todos os momentos mesmo quando pareço não senti-LO.

A minha mãe **Sônia Regina Duarte de Souza** e a minha avó **Maria Aparecida Duarte de Souza** pelo amor incondicional. A confiança de vocês me torna gigante para enfrentar qualquer desafio. Devo tudo o que sou à vocês.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu pai **Reynaldo Azevedo Filho** (*in memoriam*) pelo amor e por me ensinar o significado das palavras paixão e intensidade a serem empregadas em tudo o que fazemos. Sinto o seu sorriso a cada etapa conquistada.

Ao meu maninho **Renan Souza Cardoso da Costa** pela torcida, amor e carinho a mim dedicados.

A toda minha **família** pelo carinho, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Cada um de vocês foi fundamental nos degraus que consegui galgar até hoje.

Ao **Prof. Dr. Fábio Ramôa Pires** pela orientação cuidadosa, exigente e atenciosa, e especialmente pela amizade, respeito e carinho com que me trata a todo o momento. Agradeço pela confiança, liberdade e me permitir despertar a curiosidade sempre.

“Despertar a curiosidade, inata ao homem e vivacíssima no menino, eis o primeiro empenho do professor, num método racional. Da curiosidade nasce a atenção; da atenção a percepção e a memória inteligente”

**(Rui Barbosa)**

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao coordenador geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti**.

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**, coordenador do programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. Muito obrigada pela amizade, carinho, confiança e as inúmeras discussões científicas e filosóficas.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida** pelo ansejo de conhecimento diário, exemplo de cientista e simplicidade. Agradeço todas as oportunidades a mim confiadas e desculpo-me por nem sempre atingir todas as expectativas.

Ao **Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes** pelo amor com que dirige a arte de lecionar. O prazer com que o senhor nos é mestre será fundamental na minha construção profissional. Obrigada pela amizade, carinho e orientações.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Colleta** pelo exemplo de dedicação, profissionalismo e competência. Agradeço por todas as palavras de carinho e incentivo, assim como as de repreensão a mim ditas no dia-a-dia.

Aos demais professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Edgard Graner**, **Prof. Dr. Oswaldo Di Hipólito Júnior** e **Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas**. Obrigada pelo carinho, conhecimento e experiências compartilhadas.

Aos professores do Departamento de Patologia e Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, **Prof. Dr<sup>a</sup>. Ellen Brilhante de Albuquerque**, **Prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Grillo Cabral**, **Prof. Dr<sup>a</sup>. Sandra Regina Torres**, **Prof. Dr. Valdir Meirelles Jr** pelo aprendizado e carinho durante toda a graduação e especialização, e em especial ao **Prof. Dr. Abel Silveira Cardoso**, pelo

exemplo de ser humano e profissional e por ser o maior responsável pela minha mudança estomatológica, e à **Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Elisa Rangel Janini**, pela amizade, respeito e por incentivar e acreditar nos meus sonhos.

Aos grandes amigos e amigas deixados no Rio de Janeiro, **Alessandra, Alísia, Danielle, David, Emanuela, Marco, Patricia, Rafael, Sara e Yve**; e conquistados aqui em Piracicaba, **Beatriz, Karime e Maurillo** pela amizade de ontem, hoje e sempre.

Às amigas e companheiras **Lays Martin Sobral, Michele Gassen Kellermann e Sandrine Bitencourt Berger** pelo aprendizado, carinho, gargalhadas e choros compartilhados durante estes dois anos. A nossa convivência foi fundamental para o meu crescimento profissional e pessoal aqui em Piracicaba.

Ao grande amigo **Jorge Esquiche León** pela recepção carinhosa e fraterna. A sua amizade, carinho, respeito, incentivo e exemplo de amor a Patologia serão sempre lembrados por mim. A nossa amizade está apenas começando...

À amiga **Ana Lúcia Ayroza Carrinho Rangel** pelo carinho, conselhos e excelentes dicas na confecção deste trabalho.

Aos demais amigos da Pós-Graduação, **Ademar Takahama Junior, Adriele Ferreira Gouvêa, Alan Roger dos Santos Silva, Ana Carolina de Mesquita Netto Rosales, Andréia Aparecida da Silva, Carolina Cavalcanti Bitu, Danyel Elias da Cruz Perez, Dawton Abranches Pulhez, Eduardo Bäülm Campagnoli, Érica Furquim Soledade das Neves, Fábio Augusto Ito, Fábio Ornellas Prado, Francisco Carlos Amanajás Aguiar Junior, Guillermo Martínéz Matta, Kenia Regina Silva, Lília Alves Rocha, Lucielma Salmito Soares Pinto, Luiz Alcino Monteiro Gueiros, Marco Antonio Carvalho, Maria Fernanda de Souza Setúbal Destro, Mário José Romañach Gonzalez Sobrinho, Marcelo Rodrigues, Michelle Agostini, Mônica Leal Alcure, Patrícia Gemma Strappa Abrahão, Sabrina Daniela da Silva**, pelos momentos científicos e de lazer compartilhados durante todo este período.

Aos funcionários e companheiros do Laboratório de Patologia e do Orocentro da FOP/UNICAMP, **Adriano, Bete, Cida, Dinha, João, Rogério, Rosa, Valéria, Valéria Totti** pelo auxílio nestes dois anos, e em especial à **Ana Cristina do Amaral Godoy**, peça fundamental para a efetivação desta pesquisa.

*A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

“Tenha sempre presente que a pele se enruga, o cabelo embranquece, os dias convertem-se em anos... Mas o que é importante não muda; a tua força e convicção não têm idade. Atrás de cada linha de chegada há uma de partida.

Atrás de cada conquista vem um novo desafio. Enquanto estiveres viva, sente-se viva. Se sentes saudades do que fazias, volta a fazê-lo. Não vivas de fotografias amareladas... Continua, quando todos esperam que desistas.

Não deixes que enferruje o ferro que existe em ti. Faz com que em vez de pena te tenham respeito. Quando não consigas correr atrás dos anos, trota. Quando não consigas trotar, caminha. Quando não consigas caminhar, usa uma bengala. Mas nunca te detenhas!!!”

**(Madre Teresa de Calcutá)**

## RESUMO

O carcinoma mucoepidermóide (CME) é a neoplasia maligna de glândulas salivares mais comum, apresentando grande diversidade de tipos celulares e histogênese incerta e controversa. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão imunohistoquímica de citoqueratinas (CKs) de epitélios simples (CKs 7, 8, 18 e 19) e de epitélios complexos (CKs 6, 13 e 14) e de um marcador de diferenciação mioepitelial (actina de músculo liso - AML) em CMEs de glândulas salivares maiores e menores nas diferentes gradações histológicas, na tentativa de estabelecer correlação entre a imunopositividade das células tumorais e o processo de diferenciação e histogênese. Foram selecionados 80 casos de CMEs de glândulas salivares do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer/A.C. Camargo, São Paulo, entre 1957 e 1997. Os locais mais acometidos foram parótida (47,5%) e palato (26,3%). Do total, 45% dos casos foram classificados como de alto grau, 44% de baixo grau, e somente 11% de grau intermediário de malignidade. Células escamosas estavam presentes em 98% dos casos, intermediárias em 71%, mucosas em 54%, claras em 30%, colunares em 29% e oncócicas em 3%. O padrão de crescimento neoplásico mostrou proporção similar entre os arranjos sólido (89%) e cístico/ductal (81%). A expressão das CKs variou de acordo com o tipo celular: células escamosas apresentaram alta expressão de CKs 6, 7, 8, 14, 18 e 19; células intermediárias de CKs 6, 7 e 8; células mucosas somente de CK7; células claras de CKs 6, 7 e 8; e células colunares de CKs 6, 7, 8 e 18. A CK13 mostrou expressão reduzida em todos os tipos celulares. Diferenciação mioepitelial, embora infreqüente, foi mais observada nas células escamosas e intermediárias. Nas glândulas salivares normais adjacentes, ácinos serosos e mucosos apresentaram alta expressão imunohistoquímica de CK18; ductos intercalados de CKs 6, 7, 18 e 19; ductos estriados de CKs 6, 7, 8, 13, 18 e 19; células ductais excretoras de CKs 6, 7, 8, 18 e 19; células basais excretoras de CK14; e células mioepiteliais de AML e CK14. A grande variedade de tipos celulares associada à expressão imunohistoquímica de diferentes CKs e em menor proporção de AML, similar aos ductos excretores, reforça o conceito de origem do CME a partir de células indiferenciadas pluripotentes localizadas nos ductos excretores das glândulas salivares normais.

**Palavras-chave:** carcinoma mucoepidermóide - histogênese – imunohistoquímica – citoqueratinas – actina de músculo liso

## ABSTRACT

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant salivary gland tumor, composed of several different cell types, with unsettled and controversial histogenesis. The purpose of this study was to analyze the immunohistochemical expression of cytokeratins (CKs) of simple epithelia (7, 8, 18 and 19) and stratified epithelia (6, 13 and 14) and a myoepithelial marker (smooth muscle actin - SMA) – in MECs from major and minor salivary glands in their different histological grading, in order to establish a correlation between tumor cells immunostain and MEC histogenesis and differentiation. Eighty cases of salivary gland MECs retrieved from the Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology/A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil, from 1957 to 1997, were selected. The most common sites were parotid (47,5%) and palate (26,3%). From the total, 45% of the cases were classified as high grade, 44% as low grade, and only 11% as intermediate grade. Squamous cells were present in 98% of the cases, intermediate cells in 71%, mucous cells in 54%, clear cells in 30%, columnar cells in 29% and oncocytic cells in 3%. Tumor organization showed similar amount of solid nests (89%) and cystic structures or duct-like elements (81%). Cytokeratin expression was variable according to the cellular type: squamous cells presented high expression of CKs 6, 7, 8, 14, 18 and 19; intermediate cells of CKs 6, 7 and 8; mucous cells only of CK7; clear cells of CKs 6, 7 and 8; and columnar cells of CKs 6, 7, 8 and 18. CK13 was infrequently expressed in all cell types. Myoepithelial expression, albeit uncommon, was more frequently observed in squamous and intermediate cells. In normal salivary gland tissue found adjacent to the tumors, serous and mucous acini showed high immunohistochemical expression of CK18; intercalated ducts of CKs 6, 7, 18 and 19; striated ducts of CKs 6, 7, 8, 13, 18 and 19; ductal cells of excretory ducts of CKs 6, 7, 8, 18 and 19; basal cells of excretory ducts of CK14; and myoepithelial cells of SMA and CK14. The diversity of cellular types associated to the immunohistochemical expression of different CKs and, in less amount of SMA, similarly to excretory ducts reinforces the concept of MEC origin from pluripotential cells localized at the excretory ducts of normal salivary glands.

**Key-words:** mucoepidermoid carcinoma - histogenesis – immunohistochemistry – cytokeratins – smooth muscle actin

## **SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Glândulas Salivares	3
2.2. Carcinoma Mucoepidermóide	4
2.3. Citoqueratinas: expressão no Epitélio Normal	7
2.4. Citoqueratinas: expressão em Carcinomas Mucoepidermóides	11
2.5. Diferenciação Mioepitelial nos Carcinomas Mucoepidermóides	14
3. PROPOSIÇÃO	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Seleção da Amostra	18
4.2. Análise Histopatológica	18
4.3. Análise Imunohistoquímica	19
5. RESULTADOS	22
5.1. Características Sócio-Demográficas e Clínicas	22
5.2. Características Histopatológicas	23
5.3. Características Imunohistoquímicas	32
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO – Certificação do Comitê de Ética em Pesquisa	73

## 1. INTRODUÇÃO:

O carcinoma mucoepidermóide (CME) é a neoplasia maligna mais comum das glândulas salivares, representando entre 12 e 52% dos tumores malignos e 3 e 15% de todos os tumores de glândulas salivares (Brandwein *et al.*, 2001; Guzzo *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004a; Ito *et al.*, 2005; Otoh *et al.*, 2005; Luna, 2006; Rapidis *et al.*, 2007).

O CME é um tumor de origem epitelial composto por proporções variadas de células escamosas, mucosas, intermediárias, claras e colunares, que podem estar organizadas em um arranjo cístico ou sólido (Dardick, 1996; Ellis & Auclair, 1996; Loyola *et al.*, 1998; Cheuk & Chan, 2000, Foschini *et al.*, 2002; Luna, 2006; Silveira *et al.*, 2006).

Acredita-se que a histogênese do CME deriva de células pluripotentes de reserva presentes no ducto excretor ou na região ductal intercalar-acinar das glândulas salivares (Dardick *et al.*, 1984; Loyola *et al.*, 1998; Pires *et al.*, 2004a, Yook *et al.*, 2004). Alguns autores demonstraram alguma evidência imunohistoquímica ou ultraestrutural de diferenciação mioepitelial em CME (Dardick *et al.*, 1984; Kahn *et al.*, 1985; Chaudhry *et al.*, 1989; Hassanin *et al.*, 1989; Regezi *et al.*, 1991; Yook *et al.*, 2004), enquanto outros não encontraram nenhuma imunomarcacão mioepitelial em CME (Loyola *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 1999; Foschini *et al.*, 2002). Assim, pela grande diversidade dos seus componentes celulares, sua histogênese permanece ainda incompletamente determinada e controversa (Chaudhry *et al.*, 1989; Loyola *et al.*, 1998; Yook *et al.*, 2004; Luna, 2006).

Alguns estudos têm sido realizados a fim de se determinar um painel imunohistoquímico para o CME, e assim esclarecer sua histogênese (Hassanin *et al.*, 1989; Araujo *et al.*, 1991; Regezi *et al.*, 1991; Loyola *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2000; Foschini *et al.*, 2002; Sobral *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004b; Silveira *et al.*, 2006). Foi identificada uma ampla variedade na expressão de citoqueratinas (CKs) por diferentes autores (Regezi *et al.*, 1991; Loyola *et al.*, 1998; Foschini *et al.*, 2002; Sobral *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004b; Silveira *et al.*, 2006), no entanto, a co-expressão de outros filamentos intermediários, como vimentina, desmina, proteína fibrilar acídica glial e neurofilamentos, não foi característica evidente (Regezi *et al.*, 1991).

A despeito destes achados da literatura, existem ainda poucos estudos relativos à expressão de CKs e marcadores de diferenciação mioepitelial nas diferentes localizações e gradações histológicas de CMEs de glândulas salivares avaliando grandes séries de casos, reforçando a relevância do presente estudo, realizado na tentativa de se obter o perfil imunohistoquímico de CKs e do grau de diferenciação mioepitelial em 80 CMEs de glândulas salivares maiores e menores, em seus diferentes graus histológicos de malignidade.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA:**

### **2.1. Glândulas Salivares**

O sistema de glândulas salivares é constituído de três grandes pares de agregados de tecido glandular exócrino, as glândulas salivares maiores, e inúmeros agregados pequenos de tecido glandular distribuídos pela mucosa oral, as glândulas salivares menores (Ellis & Auclair, 1996).

As glândulas salivares originam-se de um broto epitelial derivado da cavidade oral primitiva, que prolifera em direção ao ectomesênquima formando estruturas cordonais e uma porção mais dilatada terminal chamada bulbo. Ocorre luminização e diferenciação celular dos cordões epiteliais e estruturas bulbares, sendo que a porção proximal origina os ductos excretor e principal, a porção distal os ductos estriados, e o bulbo terminal os ductos intercalados e ácinos. O epitélio do bulbo terminal antes da diferenciação é composto por duas camadas celulares, a mais interna se diferencia nos ductos intercalados e nas células acinares e a mais externa nas células mioepiteliais (Eversole, 1971; Batsakis, 1980; Dale, 1994; Ellis & Auclair, 1996).

As glândulas salivares são constituídas por um parênquima com inúmeros ductos que confluem para as porções secretoras terminais. As células secretoras podem ser serosas, mucosas ou mistas, e são denominadas ácinos. O sistema de ductos das glândulas salivares se inicia com a formação dos ductos intercalados em continuidade com as células acinares. São ductos de pequeno diâmetro revestidos por células cuboidais com núcleo central (Eversole, 1971; Dardick *et al.*, 1987; Dale, 1994). As células mioepiteliais encontram-se entre as células ductais e a membrana basal dos ductos intercalados e ácinos (Eversole, 1971; Dardick *et al.*, 1987; Morinaga *et al.*, 1987; Dale, 1994). Em continuidade com os ductos intercalados encontram-se os ductos estriados revestidos por células cilíndricas com núcleo central (Eversole, 1971; Dale, 1994). A saliva é secretada para a cavidade oral através dos ductos excretores, que se apresentam com revestimento pseudo-estratificado de células cilíndricas altas e células basais pequenas na proximidade com o

ducto estriado, e com revestimento estratificado de células cilíndricas luminais e basais não-luminais quando se aproximam da cavidade oral (Eversole, 1971; Dardick *et al.*, 1987; Dale, 1994).

O processo de histogênese responsável pelo desenvolvimento da grande variedade histológica dos tumores de glândulas salivares permanece incompletamente elucidado (Prasad *et al.*, 1999; Yook *et al.*, 2004). Em termos histológicos, as características arquiteturais das neoplasias de glândulas salivares, como os tipos celulares, seus arranjos e inter-relação, refletem similaridade com o tecido glandular normal. O reconhecimento dos diferentes tipos celulares em determinados tumores de glândulas salivares é, portanto, uma peça importante para a obtenção de seu correto diagnóstico microscópico (Dardick, 1996).

## **2.2. Carcinoma Mucoepidermóide (CME)**

O CME foi descrito pela primeira vez como entidade distinta por Stewart *et al.* (1945), que o denominaram tumor mucoepidermóide, neoplasia composta de células mucosecretoras e escamosas com origem no ducto das glândulas salivares.

Os CMEs são considerados os tumores malignos mais freqüentes das glândulas salivares maiores e menores (Spiro *et al.*, 1978; Lopes *et al.*, 1999; Brandwein *et al.*, 2001; Guzzo *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2002; Yih *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2006; Luna, 2006; Pires *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004a; Ito *et al.*, 2005; Otoh *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2006; Rapidis *et al.*, 2007), podendo representar de 3 a 15% de todos os tumores de glândulas salivares e de 12 a 52% dentre os malignos (Brandwein *et al.*, 2001; Guzzo *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004a; Ito *et al.*, 2005; Otoh *et al.*, 2005; Luna, 2006; Rapidis *et al.*, 2007).

O CME pode ocorrer em uma ampla faixa etária, que se estende da primeira a nona décadas de vida, com pico de prevalência entre a quarta e quinta décadas. Acomete igualmente ambos os sexos, com localização preferencial em parótida e glândulas salivares menores, principalmente palato. É usualmente caracterizado como uma massa firme,

indolor, de crescimento lento, embora eventualmente possa estar associado a dor, paralisia facial e ulceração superficial (Spiro *et al.*, 1978; Ellis & Auclair, 1996; Pires *et al.*, 2002; Otoh *et al.*, 2005; Rapidis *et al.*, 2007).

Histologicamente, o CME é constituído basicamente por três diferentes tipos celulares: células mucosas, escamosas e intermediárias. As células mucosas podem ser colunares ou poligonais com citoplasma abundante contendo mucina, determinando uma aparência clara e eosinofílica, similar às células mucosas acinares. As células escamosas possuem freqüentemente uma forma poliédrica, podendo ser arredondadas ou ovóides, ou como uma célula escamosa madura com citoplasma eosinofílico abundante. As células intermediárias são caracterizadas usualmente pela perda do aspecto poligonal das células escamosas, de tamanho menor e menos coesas, podendo apresentar-se com halo claro perinuclear correspondendo ao citoplasma escasso. Alguns tumores podem apresentar também número variável de células claras, com morfologia grande e poligonal, possuindo membrana celular discreta, núcleo pequeno central, e abundante citoplasma claro ou eosinofílico contendo glicogênio, e que ocasionalmente podem constituir uma porção considerável do tumor. Também podem estar presentes, com menor freqüência, células colunares, as quais usualmente encontram-se revestindo estruturas ductais e císticas, com aspecto poligonal grande e núcleo deslocado para a basal. Todos estes tipos celulares podem encontrar-se organizados em dois padrões distintos: cístico, em que há formação de estruturas císticas e glandulares ductais, e sólido, com formação de ilhas tumorais, em meio a um estroma colageinizado (Dardick, 1996; Ellis & Auclair, 1996; Cheuk & Chan, 2000; Gnepp *et al.*, 2001; Rosai, 2004; Luna, 2006). A organização histológica do CME lembra a do ducto excretor das glândulas salivares, ao qual tem sido atribuída a sua origem (Dardick, 1996; Loyola & Araujo, 1996).

A gradação histológica do CME é baseada principalmente no grau de desenvolvimento cístico e sólido do tumor, na celularidade resultante da diferenciação das células escamosas e intermediárias, no padrão de invasão tumoral, presença de necrose e grau de maturação celular. Nos tumores considerados de baixo grau de malignidade, a organização proeminente é de estruturas císticas com predomínio de células mucosas, com mínimo pleomorfismo celular, raras mitoses, e freqüente extravasamento de mucina, que

pode levar à formação de um estroma fibroso com esclerose e apresentar células inflamatórias crônicas. Nos de grau intermediário de malignidade, a formação cística se torna menos proeminente, dispersa entre ilhas de células escamosas, com predomínio de células intermediárias, pleomorfismo celular entre brando e moderado, presença de mitoses ocasionais, uma infiltração não circunscrita e presença de infiltrado inflamatório crônico perifericamente. Já nos tumores de alto grau de malignidade, o predomínio é de ilhas sólidas de células escamosas e intermediárias pobremente diferenciadas, com acentuado pleomorfismo celular, mitoses freqüentes, com invasão subjacente e reduzido infiltrado inflamatório crônico, podendo muitas vezes ser indistinguível de um carcinoma de células escamosas (Dardick, 1996; Ellis & Auclair, 1996; Goode *et al.*, 1998; Cheuk & Chan, 2000; Sobral *et al.*, 2002, Luna, 2006).

A grande diversidade de neoplasias de glândulas salivares levou ao desenvolvimento de diferentes teorias especulativas quanto a sua histogênese. Inicialmente acreditava-se em uma origem mesenquimal, enquanto a idéia de origem epitelial foi sendo gradativamente aceita (Gustafsson *et al.*, 1988). As células de reserva do sistema de ductos das glândulas salivares têm sido consideradas como responsáveis pelo desenvolvimento neoplásico em vários tumores, e encontram-se praticamente em todo o epitélio dos ductos intercalado e excretor (Eversole, 1971; Batsakis, 1980). As células progenitoras do ducto excretor seriam responsáveis pela formação de células escamosas, mucosas e colunares, enquanto que as do ducto intercalado pelas acinares, dos ductos intercalado e estriado, e provavelmente das células mioepiteliais (Eversole, 1971). Dessa forma, acredita-se que o CME seja derivado das células de reserva dos ductos excretores (Eversole, 1971; Batsakis, 1980; Loyola *et al.*, 1998), no entanto, como a maior capacidade regenerativa da unidade ductal das glândulas salivares encontra-se na junção entre o ducto intercalado e o ácino, sua histogênese não pode ser completamente aplicada apenas a esta hipótese (Batsakis, 1980).

A variante central do CME é menos comumente observada, representando somente entre 1 e 4% de todos os CMEs (Pires *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2004b). O desenvolvimento do CME no interior dos ossos gnáticos é controverso, e foi descrito como possivelmente originado através da metaplasia do epitélio de cistos odontogênicos; do aprisionamento de tecido de glândula salivar durante embriogênese; do aprisionamento

iatrogênico de glândulas salivares menores; do epitélio do seio maxilar; ou dos remanescentes da lâmina dentária (Bouquot *et al.*, 2000; Pires *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2004b). Entretanto, apesar da origem controversa o CME que se desenvolve no interior da mandíbula ou da maxila é uma entidade bem aceita (Pires *et al.*, 2003) e a mais comum das neoplasias de glândulas salivares desta localização (Bouquot *et al.*, 200).

O amplo espectro histológico e a variedade de tipos celulares presentes nos CMEs pode ser resultado da diferenciação das células tumorais baseada em uma organização semelhante à unidade ductal-acinar normal. As células luminais podem potencialmente se diferenciar em células claras, colunares e escamosas, enquanto que as não-luminais em células mucosas, intermediárias, escamosas e claras (Dardick, 1996).

### **2.3. Citoqueratinas (CKs): expressão no Epitélio Normal**

O citoesqueleto intracitoplasmático é formado por três subunidades protéicas diferentes: os microfilamentos de actina, os microtúbulos de tubulina, e os filamentos intermediários, constituídos por um grupo de proteínas fibrosas heterogêneas (Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Silveira *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2004). Os microfilamentos apresentam de 4 a 6 nm de diâmetro e peso molecular em torno de 43 kD e os microtúbulos diâmetro entre 22 e 25 nm e peso molecular de cerca de 60 kD. Os filamentos intermediários apresentam diâmetro intermediário entre 7 e 11 nm, mas peso molecular extremamente variável, entre 40 e 200 kD (Moll *et al.*, 1982; Berkovitz & Barret, 1998; Silveira *et al.*, 2002).

Os filamentos intermediários são constituintes celulares presentes em quase todas as células eucarióticas, com estrutura semelhante a um cordão, e função primária de fornecer resistência mecânica (Gustafsson *et al.*, 1988; Chu & Weiss, 2002; Alberts *et al.*, 2004). Suas proteínas associadas são as citoqueratinas (CKs - tipos I e II), desmina, vimentina, proteína fibrilar acídica glial e neurofilamentos (Berkovitz & Barret, 1998; Alberts *et al.*, 2004).

As CKs representam, em humanos, cerca de 75% de todos os filamentos intermediários do citoesqueleto protéico, a maior parte das proteínas estruturais epiteliais, e são essenciais ao desenvolvimento e diferenciação das células epiteliais (Sawaf *et al.*, 1991; Coulombe & Omary, 2002; Silveira *et al.*, 2002; Kirfel *et al.*, 2003; Alberts *et al.*, 2004). Os filamentos de CKs estendem-se do limite nuclear à periferia celular, formando uma rede complexa e extensa que interage com a membrana plasmática, relacionando-se com desmossomos e hemidesmossomos (Chu & Weiss, 2002; Alberts *et al.*, 2004). Existem 20 subtipos diferentes de CKs, que são classificadas de acordo com o seu peso molecular, que varia entre 40 e 70 kD; sua composição acídica ou básica, com pH variando entre 4,9 e 7,8; e seu ponto isoelétrico (Moll *et al.*, 1982, Sun *et al.*, 1985; Sawaf *et al.*, 1991; Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Silveira *et al.*, 2002). Assim, de acordo com o peso molecular, o pH e a presença de determinantes antigênicos, as CKs são divididas em dois tipos: ácidas ou tipo I, que são numeradas de 10 a 20; e neutras ou básicas ou tipo II, numeradas de 1 a 9 (Sawaf *et al.*, 1991; Berkovitz & Barret, 1998; Silveira *et al.*, 2002; Kirfel *et al.*, 2003).

Na maioria dos casos, uma subunidade de CK de baixo peso molecular se pareia com uma de alto peso molecular, assim como uma subunidade acídica irá se parear com uma básica; o componente básico de cada par é sempre cerca de 8 kD maior que o acídico, com relação molar de 1:1 (Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Silveira *et al.*, 2002). Os pares são assim organizados: CKs 1/10, CKs 3/12, CKs 4/13, CKs 5/14, CKs 6/16 ou 6/17, CKs 7/19 e CKs 8/18 (Moll *et al.*, 1982). Ao menos, um par de cada subfamília é co-expresso em um determinado tecido epitelial (Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Kirfel *et al.*, 2003).

As CKs constituem o grupo de filamentos intermediários de maior diversidade e mais expressos nas células epiteliais (Coulombe & Omary, 2002; Kirfel *et al.*, 2003; Alberts *et al.*, 2004). Uma única célula epitelial é capaz de sintetizar uma grande variedade de CKs que podem copolimerizar a fim de formar um único sistema de filamentos (Moll *et al.*, 1982; Alberts *et al.*, 2004).

A expressão de CKs varia entre os epitélios em seus diferentes estágios de desenvolvimento e durante o seu curso terminal de diferenciação e, eventualmente, pode ser

característica para diferentes tecidos epiteliais, podendo funcionar como forma de classificação epitelial (Moll *et al.*, 1982; Sawaf *et al.*, 1991; Pelissier *et al.*, 1992, Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Silveira *et al.*, 2002). Ainda, durante a transformação maligna do tecido epitelial, o padrão de expressão das CKs costuma ser mantido, podendo ser de utilidade diagnóstica (Moll *et al.*, 1982; Chu & Weiss, 2002; Nikitakis *et al.*, 2004). A maioria das diferenças encontradas pode ser explicada pela composição celular mais complexa da lesão maligna (Moll *et al.*, 1982; Chu & Weiss, 2002).

Dessa forma, a análise imunohistoquímica da expressão de CKs pode ser considerada uma ferramenta útil na identificação e diferenciação dos diferentes tipos epiteliais e suas origens, assim como na distinção de diferentes tipos celulares dentro de um mesmo tecido (Berkovitz & Barret, 1998; Silveira *et al.*, 2002; Nikitakis *et al.*, 2004; Pires *et al.*, 2004b).

Com relação aos tecidos bucais, o epitélio pavimentoso estratificado da cavidade bucal pode ser dividido em tipo I, que corresponde à mucosa superficial ou de revestimento não-queratinizada, ou tipo II, da mucosa mastigatória queratinizada do palato duro e gengiva, e tipo III, da mucosa especializada da superfície dorsal da língua em seus 2/3 anteriores (Sawaf *et al.*, 1991; Berkovitz & Barret, 1998; Silveira *et al.*, 2002). A mucosa estratificada não-queratinizada expressa as CKs 4 e 13, respeitando a expressão encontrada em outros epitélios semelhantes. As áreas de epitélio queratinizado adicionam a expressão das CKs 1, 10 e 11. A camada basal de todos os queratinócitos expressa as CKs 5 e 14, e em menor proporção a CK19. As CKs de epitélio simples, 7, 8, 18 e 19, usualmente não são expressas neste epitélio (Sawaf *et al.*, 1991; Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Silveira *et al.*, 2002).

O resumo do padrão de expressão de CKs no epitélio da cavidade bucal, assim como a sua distribuição, encontra-se descrito na tabela 1. A expressão de CKs no epitélio glandular é mais complexa e variável de acordo com o tipo de estrutura epitelial presente, e usualmente mescla a expressão de epitélio simples e complexo, encontrando-se resumida na tabela 2.

**Tabela 1** - Expressão de citoqueratinas (CKs) no epitélio oral por subtipo.

<i>CKs</i>	<i>Tipo de epitélio</i>	<i>Localização</i>
CK1	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva.
CK2	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva.
CK3	Epitélio estratificado queratinizado (camada córnea)	Ausente na cavidade oral.
CK4	Epitélio estratificado não-queratinizado (queratinócitos suprabasais)	Epitélio sulcular e mucosa jugal.
CK5	Epitélio estratificado queratinizado e não-queratinizado	Camada basal de todos os queratinócitos.
CK6	Epitélio estratificado não-queratinizado (alta renovação)	Papilas filiformes, mucosa oral e glândulas salivares.
CK7	Epitélio simples	Células de Merkel, botões gustatórios e glândulas salivares.
CK8	Epitélio simples	Palato mole, células de Merkel, botões gustatórios e glândulas salivares.
CK9	Epitélio estratificado queratinizado	Ausente na cavidade oral.
CK10	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva.
CK11	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva.
CK12	Epitélio estratificado queratinizado (camada córnea)	Ausente na cavidade oral.
CK13	Epitélio estratificado não-queratinizado (queratinócitos suprabasais)	Epitélio sulcular, mucosa jugal e glândulas salivares.
CK14	Epitélio estratificado queratinizado e não-queratinizado	Camada basal de todos os queratinócitos e glândulas salivares.
CK15	Epitélio escamoso estratificado	Inconstante na cavidade oral.
CK16	Epitélio estratificado não-queratinizado (alta renovação)	Glândulas salivares.
CK17	Epitélio estratificado não-queratinizado (alta renovação)	Glândulas salivares.
CK18	Epitélio simples	Palato mole, células de Merkel e glândulas salivares.
CK19	Epitélio simples (principalmente) e camada basal de epitélio estratificado não-queratinizado	Palato mole, células de Merkel, botões gustatórios e glândulas salivares.
CK20	Epitélio simples	Células de Merkel e botões gustatórios.

Fontes: Moll *et al.*, 1982; Sawaf *et al.*, 1991; Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Coulombe & Omary 2002; Silveira *et al.*, 2002; Kirfel *et al.*, 2003.

**Tabela 2** - Expressão de citoqueratinas (CKs) no epitélio de glândulas salivares normais.

<i>Epitélio glandular</i>	<i>Expressão positiva</i>
Ácinos	CKs 8 e 18
Células basais	CKs 7, 14 e 19
Células mioepiteliais	CKs 4, 5, 6, 13, 14, 16, 17 e 19
Ductos intercalados e estriados	CKs 7, 8, 18 e 19
Ductos excretores	CKs 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 16, 17, 18 e 19

Fontes: Moll *et al.*, 1982; Gustafsson *et al.*, 1988; Sawaf *et al.*, 1991; Araujo & Sousa, 1996; Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002.

#### **2.4. Citoqueratinas (CKs): expressão em Carcinomas Mucoepidermóides**

A expressão de CKs nos carcinomas mantêm similaridade com o tecido originário da lesão maligna na maioria dos casos (Gustafsson *et al.*, 1988; Chu & Weiss, 2002; Silveira *et al.*, 2002), embora algumas CKs sejam exclusivas do tumor e outras características apenas do tecido normal (Moll *et al.*, 1982). Tais diferenças são mais significativas quanto maior a complexidade do tecido de origem e é provável que essas divergências de expressão ocorram por um processo de seleção de tipos celulares que não são quantitativamente predominantes no tecido total para comparação, ou pela heterogeneidade tissular (Moll *et al.*, 1982).

Os estudos iniciais nos CMEs concentraram-se na descrição dos tipos celulares que o compõem, a fim de definir melhor a organização celular do tecido tumoral e entender os processos histogênicos envolvidos no seu desenvolvimento (Dardick *et al.*, 1984; Chaudhry *et al.*, 1989). De forma similar a outras malignidades de glândula salivar, o CME consiste em uma unidade acinar-ductal, na qual a multiplicidade de fenótipos neoplásicos está relacionada ao potencial de diferenciação das células epiteliais luminais e mioepiteliais não-luminais (Chen, 1979; Dardick *et al.*, 1987; Loyola *et al.*, 1998). Poucos estudos têm sido realizados na tentativa de se estabelecer um perfil imunohistoquímico para o CME, que pudesse esclarecer sua histogênese, e assim, que pudesse ser útil em seu diagnóstico diferencial (Hassanin *et al.*, 1989; Araujo *et al.*, 1991; Regezi *et al.*, 1991; Loyola *et al.*,

1998; Araujo *et al.*, 2000; Foschini *et al.*, 2002; Sobral *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004b; Silveira *et al.*, 2006).

O padrão de expressão de CKs em CMEs apresenta positividade para as CKs 5, 6, 7, 13, 17 e 18; negatividade para a CK 20; e expressividade variável para as CKs 8, 14 e 19. Foi encontrado um padrão de expressão para CMEs de glândulas salivares maiores de alto grau de CKs 7, 8, 13, 14 e 19, que foi idêntica ao padrão encontrado nos tumores de baixo grau. A CK 7 foi encontrada em praticamente todas as células, enquanto que as CKs 8, 14 e 19 foram visualizadas em apenas algumas células dispersas, e a CK 13 apenas nas células luminais dos espaços císticos e nas células escamosas (Araujo *et al.*, 2000; Chu & Weiss, 2002; Sobral *et al.*, 2002).

Análise imunohistoquímica para as CKs 7, 8, 14, 17, 19 e 20 realizada em CMEs de baixo grau de malignidade encontrou a expressão de quase todas as CKs estudadas com variações em grau, a exceção da CK 20 que foi negativa na maioria dos casos, em que cada tipo celular individualmente apresentou um padrão específico. As células basais apresentaram positividade para as CKs 14 e 17, e focalmente para a CK 8. As células intermediárias, na maioria das vezes o maior componente celular das lesões de CME, apresentaram uma ampla variedade de expressão com positividade para as CKs 7, 8, 17 e 19, focalmente para a CK 14, e raramente para a CK 20. As células escamosas apresentaram positividade apenas para as CKs consideradas de alto peso molecular, 14 e 17, enquanto que as células mucosas apenas a apresentaram para as CKs de baixo peso molecular, 7, 8 e 19. As células colunares mostraram positividade semelhante às intermediárias, ou seja, para as CKs de alto e baixo peso molecular, CKs 7, 8, 17 e 19, focalmente para a CK14 e raramente para a CK20 (Foschini *et al.*, 2002).

Em estudo realizado por Silveira *et al.* (2006), avaliando a expressão das CKs 7, 8, 10, 13 e 14 em onze casos de CMEs, de graus baixo, intermediário e alto de malignidade, o perfil encontrado foi similar. As células escamosas apresentaram positividade de forte a moderada para as CKs de alto e baixo peso molecular, 7, 10, 13 e 14; assim como as células intermediárias que apresentaram positividade para as CKs 7, 8, 10 e 14; enquanto que as células mucosas apenas apresentaram imunomarcção forte para

as CKs de baixo peso molecular, 7 e 8. Já as células claras apresentaram somente positividade moderada para a CK7.

A expressão imunohistoquímica das CKs 7 e 20 foi avaliada em 26 casos de CMEs de glândulas salivares e apresentou positividade difusa para a CK7 em 24 casos (92,3%) e focal em 2 casos (7,7%). A CK20 apresentou imunopositividade fraca e focal em somente 2 casos (7,7%), classificados como de graus baixo e intermediário de malignidade (Nikitakis *et al.*, 2004).

De acordo com Foschini & Eusebi (2004), o perfil imunohistoquímico de CKs nos CME varia de acordo com os tipos celulares, e conseqüentemente com o padrão de crescimento neoplásico. A CK14 é expressa preferencialmente na porção externa dos cistos e ninhos tumorais, enquanto que a CK7 na porção central.

O resumo do padrão imunohistoquímico de expressão de CKs em CMEs descrito na literatura encontra-se nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3** - Perfil imunohistoquímico de citoqueratinas (CKs) em carcinomas mucoepidermóides descrito na literatura.

<i>Autor</i>	<i>Ano</i>	<i>Nº de casos</i>	<i>CKs</i>
Regezi <i>et al.</i>	1991	42	1, 5, 8, 10 e 14
Loyola <i>et al.</i>	1998	17	7, 8, 13, 14, 18 e 19
Araujo <i>et al.</i>	2000	20	7, 8, 13, 14 e 19
Foschini <i>et al.</i>	2002	10	7, 8, 14, 17 e 19
Sobral <i>et al.</i>	2002	5	7, 8, 13, 14 e 19
Pires <i>et al.</i>	2004b	23	1, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 e 19
Silveira <i>et al.</i>	2006	11	7, 8, 10, 13 e 14

**Tabela 4** - Perfil imunohistoquímico de citoqueratinas (CKs) de acordo com os tipos celulares em carcinomas mucoepidermóides descrito na literatura.

<i>Autor, ano (CKs)</i>	<i>Nº de casos</i>	<i>CE</i>	<i>CMU</i>	<i>CI</i>	<i>CCL</i>	<i>CCOL</i>
Loyola <i>et al.</i> , 1998 (CKs 7, 8, 10, 13, 14, 18 e 19)	17	CKs 13 e 14	CKs 7, 8 e 18	CKs 7, 8, 13, 14, 18 e 19	Negativas	CKs 7, 8, 13, 18 e 19
Araujo <i>et al.</i> , 2000 (CKs, 7, 8, 13, 14 e 19)	20	CKs 7, 8, 13, 14 e 19	CKs 7, 8 e 19	CKs 7 e 8	NC	NC
Foschini <i>et al.</i> , 2002 (CKs 7, 8, 14, 17, 18, 19 e 20)	10	CKs 14 e 17	CKs 7, 8 e 19	CKs 7, 8, 14, 17, 18 e 19	NC	CKs 7, 8, 17 e 19
Silveira <i>et al.</i> , 2006 (CKs 7, 8, 10, 13 e 14)	11	CKs 10, 13 e 14	CKs 7 e 8	CKs 7, 8, 10 e 14	CK 7	NC

(CE – células escamosas; CMU – células mucosas; CI – células intermediárias; CCL – células claras; CCOL – células colunares; NC – não classificadas).

## 2.5. Diferenciação Mioepitelial nos Carcinomas Mucoepidermóides

As células mioepiteliais (CM) apresentam fenótipo epitelial e muscular liso, e constituem a camada externa de glândulas exócrinas normais, como as glândulas salivares, mamárias e sudoríparas (Morinaga *et al.*, 1987; Foschini *et al.*, 2000). São células alongadas de aparência estrelada, citoplasma estendendo-se em processos dendríticos, e localizadas entre a membrana basal e as células epiteliais, dificilmente visualizadas nas colorações de rotina em Hematoxilina & Eosina (Kahn *et al.*, 1985; Foschini *et al.*, 2000). No entanto, são facilmente observadas através de microscopia eletrônica pela presença dos desmosomos intercelulares e filamentos intracitoplasmáticos (Kahn *et al.*, 1985; Morinaga

*et al.*, 1987; Foschini *et al.*, 2000). Na microscopia de luz, são melhor evidenciadas através de técnicas de imunohistoquímica (Kahn *et al.*, 1985; Foschini *et al.*, 2000).

Em mama, glândulas sudoríparas e salivares normais as CMs já foram demonstradas em imunohistoquímica através de anticorpos contra algumas CKs, 5,14 e 17, proteína S100, actina, actina de músculo liso (AML), miosina de músculo liso de cadeia pesada, caldesmonina e calponina (Kahn *et al.*, 1985; Morinaga *et al.*, 1987; Hassanin *et al.*, 1989; Prasad *et al.*, 1999; Foschini *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 2005; Furuse *et al.*, 2005). Análise ultraestrutural das células basais em todos os níveis do sistema ductal em glândulas salivares normais demonstrou que essas células representam uma combinação de CMs, tipo-mioepiteliais e células aparentemente indiferenciadas, que podem ser importantes na determinação histogênica dos tumores de glândulas salivares (Dardick *et al.* 1987).

O papel das CMs no desenvolvimento dos tumores de glândulas salivares é controverso, e já foi explorado em diferentes estudos de análise ultraestrutural, imunofluorescência, imunohistoquímica e cultura de tecidos (Kahn *et al.*, 1985; Dardick *et al.*, 1987; Prasad *et al.*, 1999; Furuse *et al.*, 2005). Acredita-se que as neoplasias de glândulas salivares podem ser subdivididas em duas classes: as que derivam das células de reserva dos ductos intercalados, que apresentam CMs mais facilmente identificadas no seu desenvolvimento, e as que apresentam origem associada ao ducto excretor, que não apresentam e não se originam das CMs, onde provavelmente encontra-se o CME (Eversole, 1971; Dardick *et al.*, 1987). Entretanto, pelo fato das CMs terem sido descritas na base dos ductos excretores, e pelo fato de em alguns casos, existir positividade imunohistoquímica para alguns antígenos associados às mesmas em CMEs, sugeriu-se um papel destas células no desenvolvimento destes tumores (Dardick *et al.*, 1987; Regezi *et al.*, 1991).

Kahn *et al.* (1985) demonstraram imunopositividade para a proteína S100 em algumas células neoplásicas de CME, reforçando os achados de Dardick *et al.* (1984) que observaram a presença de células epiteliais e mioepiteliais nestes tumores através de microscopia eletrônica de transmissão. Estudo imunohistoquímico realizado por Hassanin *et al.* (1989) com 16 casos de CME de glândulas salivares maiores e menores demonstrou positividade para a proteína S100 nas células escamosas variando de leve a intensa, nas

intermediárias de leve a moderada em alguns casos, e nas claras de forma leve em raros casos.

No entanto, estudos mais recentes baseados em análise imunohistoquímica realizada em CME de glândulas salivares maiores e menores têm mostrado que a diferenciação mioepitelial parece ser mínima ou ausente nas lesões de CME, que parece ser constituído basicamente de células epiteliais (Regezi *et al.*, 1991; Loyola *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 1999; Araujo *et al.*, 2000; Foschini *et al.*, 2002; Foschini & Eusebi, 2004; Yook *et al.*, 2004).

O CME apresenta um amplo espectro morfológico e a tendência a se desenvolver com mais frequência nos tecidos contendo CMs, como glândulas salivares, mama e pulmão (Dardick *et al.*, 1990; Pia-Foschini *et al.*, 2003; Tomaso *et al.*, 2004). Dessa forma, ainda são necessários estudos comparativos descritivos para que se confirme ou exclua o papel das CMs nos CMEs.

### **3. PROPOSIÇÃO:**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão imunohistoquímica de diferentes tipos de citoqueratinas e de um marcador de diferenciação mioepitelial, a actina de músculo liso, em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares em suas diferentes localizações em glândulas maiores e menores, e em suas diferentes gradações histológicas, na tentativa de estabelecer um imunofenótipo das células tumorais, buscando auxiliar o esclarecimento de seu processo de diferenciação e histogênese.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS:**

### **4.1. Seleção da Amostra**

Foram selecionados 80 casos de CME de glândulas salivares maiores e menores oriundos dos arquivos do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo da Fundação Antonio Prudente em São Paulo/SP atendidos no período entre 1957 e 1997, base comum de trabalhos realizados por Pires *et al.* (2002, 2004a).

Os critérios de inclusão estabelecidos foram: disponibilidade de no mínimo cortes de 5 lâminas de 5 µm de espessura e 15 lâminas silanizadas de 3 µm de espessura; material representativo proveniente de peça cirúrgica; e número equivalente de glândulas salivares maiores e menores.

As informações sócio-demográficas e clínicas foram obtidas a partir dos prontuários médicos dos pacientes.

### **4.2. Análise Histopatológica**

Foram selecionadas lâminas de cortes de 5 µm de espessura, que foram coradas com Hematoxilina & Eosina, Ácido Periódico de Schiff e Mucicarmim. Todos os casos foram revisados, e o diagnóstico histopatológico confirmado avaliando-se os cortes corados nas três colorações. O diagnóstico histopatológico, assim como a gradação dos tumores em graus de malignidade obedeceu aos critérios sugeridos pela Organização Mundial de Saúde e pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas dos Estados Unidos (Batsakis & Luna, 1990; Auclair *et al.*, 1992; Dardick, 1996; Ellis & Auclair, 1996; Cheuk & Chan, 2000; Gnepp *et al.*, 2001; Rosai, 2004; Barnes *et al.*, 2005). Os critérios utilizados para a gradação histológica dos CMEs encontram-se resumidos na tabela 5. Os tumores também foram classificados quanto aos tipos celulares presentes - células escamosas, mucosas, intermediárias, claras e colunares; ao percentual de formação ductal/cística e/ou sólida; e a

presença de glândula salivar normal e de suas estruturas adjacentes – ácinos serosos e mucosos, ductos intercalado, estriado e excretor, e células mioepiteliais. Ambas as classificações foram realizadas por 2 profissionais separadamente, e os casos nos quais não houve concordância, foram re-analisados até que se obtivesse um consenso.

**Tabela 5** - Critérios de gradação histológica dos carcinomas mucoepidermóides.

<i>Parâmetro histológico</i>	<i>Pontuação</i>
Componente intracístico < 20%	+2
Presença de invasão neural	+2
Presença de necrose	+3
Mitoses (4 ou mais por 10 campos de maior aumento)	+3
Anaplasia	+4
<i>Grau histológico</i>	<i>Pontuação</i>
Baixo grau de malignidade	0 a 4
Grau intermediário de malignidade	5 ou 6
Alto grau de malignidade	7 ou mais

Baseado em: Batsakis & Luna, 1990; Auclair *et al.*, 1992; Dardick, 1996; Ellis & Auclair, 1996; Cheuk & Chan, 2000; Gnepp *et al.*, 2001; Rosai, 2004; Barnes *et al.*, 2005.

#### **4.3. Análise Imunohistoquímica**

Cortes histológicos de 3 µm em lâminas silanizadas foram desparafinizados com duas seqüências de xilol por 10 minutos cada em temperatura ambiente, hidratados em solução de etanol em concentrações decrescentes (100%, 90%, 70% e 50%), e lavados em água corrente e destilada. Foram lavados com peróxido de hidrogênio a 10% por 25 minutos através de 5 banhos de 5 minutos cada para inibir a ação da peroxidase endógena, e novamente lavados em água corrente e água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com uma solução de ácido cítrico monohidratado (10mM) em água destilada em pH 6,0 a 25°C e incubados com albumina bovina sérica a 1% (BSA: bovine serum albumin) em dois ciclos de 12 minutos aquecidos

em forno de microondas (Panasonic – modelo NN7809BH) em potência alta (750W), para inibir a ligação inespecífica de anticorpos.

Após resfriamento do líquido, em torno de 2 horas em temperatura ambiente, os cortes foram lavados com água corrente e destilada, e solução salina tamponada com fosfato pH7,4 (PBS: phosphate-buffered saline).

Os cortes foram incubados com os anticorpos primários, diluídos em BSA a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS, em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Os anticorpos primários, as especificações e as titulações empregadas encontram-se descritos na tabela 6.

**Tabela 6** - Anticorpos primários, clones, fabricantes e diluições empregados na análise imunohistoquímica dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides.

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Clone</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Diluição</i>
CK6	LHK6B	Novocastra	1:200
CK7	OV-TL 12/30	Dako	1:400
CK8	35H11	Dako	1:200
CK13	KS-1A3	Novocastra	1:400
CK14	LL002	Novocastra	1:200
CK18	DC10	Dako	1:400
CK19	RCK108	Dako	1:400
$\alpha$ - actina músculo liso específica	1A4	Dako	1:400

Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados em PBS (3 trocas), e o anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi então adicionado (Strept AB Complex/HRP Duet, Mouse/ Rabbit, Dako, 1/500) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente os cortes foram novamente lavados em PBS (3 trocas) e expostos ao sistema estreptavidina-biotina-peroxidase (Strept AB Complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, Dako, 1:500) por mais 30 minutos. A revelação foi feita com 120mg de substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma) misturando-se em 200ml de PBS, 2ml de peróxido de hidrogênio (20 volumes) e 2ml de dimetilsulfóxido (DMSO), e incubando-

se em câmara seca a 37°C durante 5 minutos. Terminada esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente e destilada, contra-coradas com Hematoxilina de Carrazi durante 5 minutos, desidratadas através de 2 banhos em solução de etanol a 100%, diafanizadas em xilol com 2 trocas de 10 minutos cada, e montadas em Bálamo do Canadá. Preparados histológicos controles foram usados em todas as reações.

A expressão das CKs e da AML foi classificada baseada na média de células coradas em 10 campos de grande aumento (400x) de cada espécime sob microscópio óptico, não levando em consideração a intensidade. Os critérios de classificação estabelecidos para a expressão imunohistoquímica foram: negativo (incluindo até 5% de positividade das células neoplásicas), e positivo para acima de 5% de positividade das células neoplásicas.

A positividade foi avaliada independentemente:

1. Em cada um dos grupos celulares componentes dos CMEs – células escamosas, mucosas, intermediárias, claras e colunares, buscando determinar a expressão das CKs e sua quantificação em cada grupo celular;
2. Em cada um dos padrões de organização neoplásico – ductal/cístico e sólido, a fim de se obter um imunofenótipo de CKs nas diferentes formas de arquitetura presentes nos CME;
3. Em cada uma das estruturas das glândulas salivares normais, maiores e menores, quando presentes como controle interno – ácinos serosos e mucosos, ductos intercalado, estriado e excretor (células ductais e basais), e células mioepiteliais, buscando determinar o perfil imunohistoquímico do tecido normal e comparar com as células neoplásicas na tentativa de se obter uma correlação histogênica.

Essa análise foi realizada por 2 profissionais separadamente, e os casos nos quais não houve concordância, foram re-analisados até que se obtivesse um consenso.

*A presente pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e aprovada. O certificado da resolução está anexado ao final desta dissertação.*

## **5. RESULTADOS:**

### **5.1. Características Sócio-Demográficas e Clínicas**

Do total de 80 casos analisados, 40 (50%) acometiam as glândulas salivares maiores, sendo que 38 (47,5%) a parótida e 2 (2,5%) a sublingual. Não houve casos envolvendo a glândula submandibular. Dos 40 (50%) casos envolvendo as glândulas salivares menores, 21 (26%) localizavam-se no palato, 6 (7,5%) na mucosa jugal, 6 (7,5%) na língua, 4 (5%) no rebordo alveolar e 3 (4%) no assoalho de boca. Com relação ao gênero, 41 casos (51%) foram encontrados no gênero masculino e 39 (49%) no feminino, gerando uma proporção de 1,05:1. O intervalo de idade dos pacientes no momento do diagnóstico variou entre 6 e 96 anos, com uma média de 46 anos. A maioria dos pacientes estava na faixa etária entre 41 e 79 anos, sendo que 13 (16%) na 5ª, 14 (17%) na 6ª e 15 (19%) na 7ª década de vida. O resumo da distribuição dos 80 casos de CME de glândulas salivares de acordo com localização, gênero idade encontra-se descrito na tabela 7.

**Tabela 7** - Distribuição dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares de acordo com localização, gênero e idade.

<i>Informações clínicas</i>		<i>Número de casos</i>	<i>(%)</i>
<b><i>Localização</i></b>			
Glândulas maiores	Parótida	38	47,5
	Sublingual	2	2,5
Glândulas menores	Palato	21	26
	Língua	6	7,5
	Mucosa jugal	6	7,5
	Rebordo alveolar	4	5
	Assoalho de boca	3	4
<b><i>Gênero</i></b>			
Masculino		41	51
Feminino		39	49
<b><i>Idade</i></b>			
1ª década		3	4
2ª década		7	9
3ª década		12	15
4ª década		8	10
5ª década		13	16
6ª década		14	17
7ª década		15	19
Acima da 8ª década		8	10
<b>TOTAL</b>		<b>80</b>	<b>100</b>

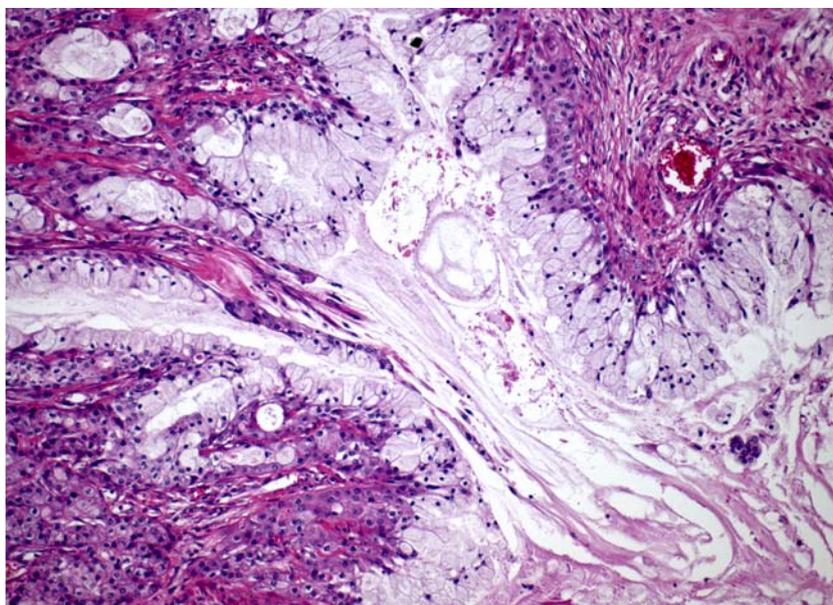
## **5.2. Características Histopatológicas**

A coloração de HE associada às técnicas histoquímicas de PAS sem diástase, com diástase e mucicarmim positivas confirmaram o diagnóstico de CME nos 80 casos. De

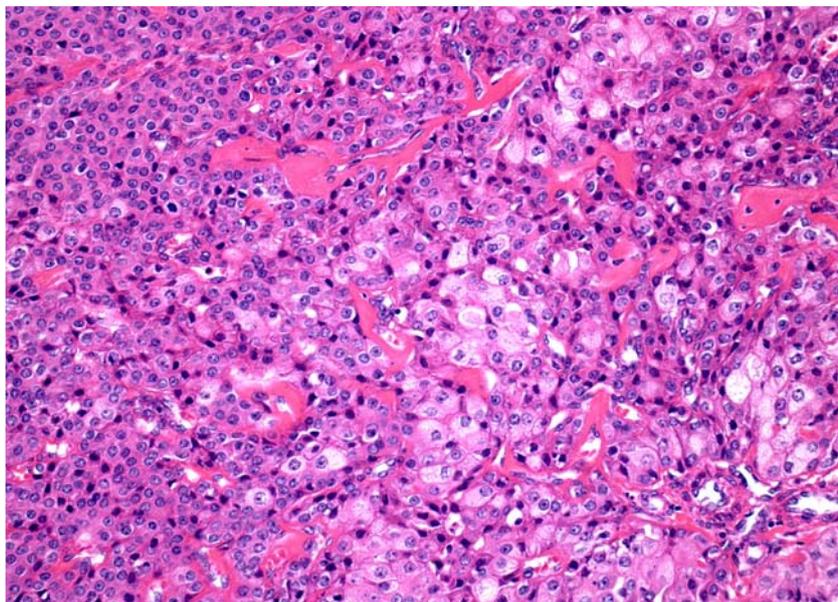
acordo com o grau de malignidade, 36 casos (45%) foram classificados como de alto grau e 35 (44%) como de baixo grau. Os tumores de grau intermediário representaram a menor proporção totalizando 9 casos (11%) (figuras 1, 2 e 3).

Com relação aos tipos celulares observados, 78 casos apresentavam células escamosas (98%), 57 intermediárias (71%) e 43 mucosas (54%). Os tipos celulares verificados com menor frequência foram as células claras e as colunares, encontradas em 24 (30%) e 23 (29%) casos, respectivamente. Em 2 casos foram observadas células oncocíticas (figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Alguns tumores apresentavam todos os tipos celulares, enquanto em outros havia predominância de um único tipo celular. A neoplasia organizava-se em arranjos lobulares sólidos (71 casos – 89%) e/ou cístico/ductal (65 casos – 81%), entremeados por tecido conjuntivo fibroso, em alguns casos hialino ou entremeado por infiltrado inflamatório mononuclear (figuras 10 e 11).

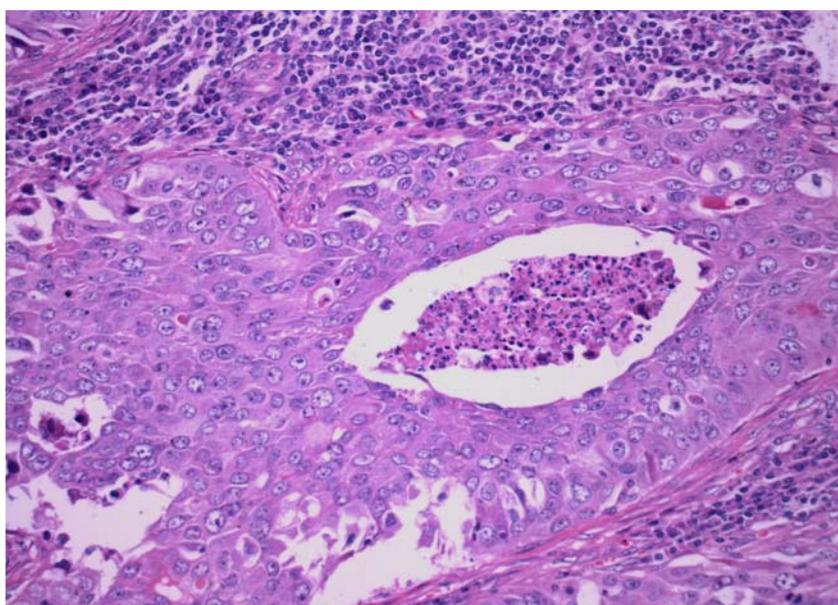
O resumo da distribuição dos 80 casos de CME de glândulas salivares de acordo com o grau de malignidade, os tipos celulares e o padrão de organização encontra-se descrito na tabela 8.



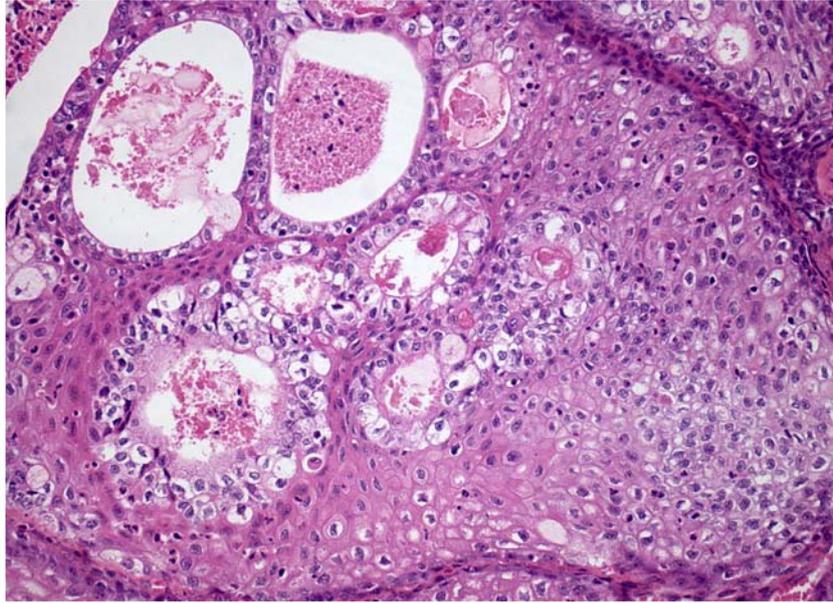
**Figura 1** - Área tumoral mostrando cavidade revestida por células mucosas e escamosas em carcinoma mucoepidermóide de baixo grau histológico de malignidade (H&E, aumento original 10x).



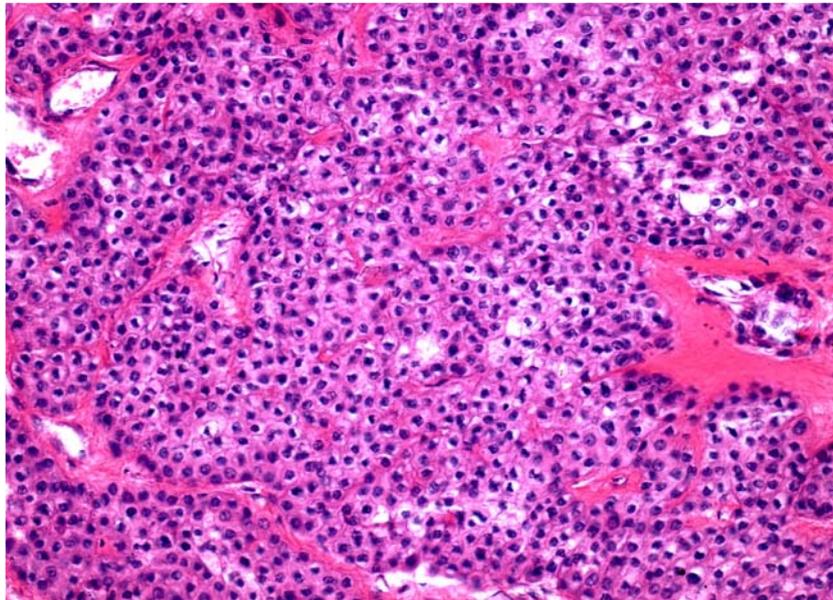
**Figura 2** - Lençol de células intermediárias e mucosas encontrado em carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário de malignidade (H&E, aumento original 20x).



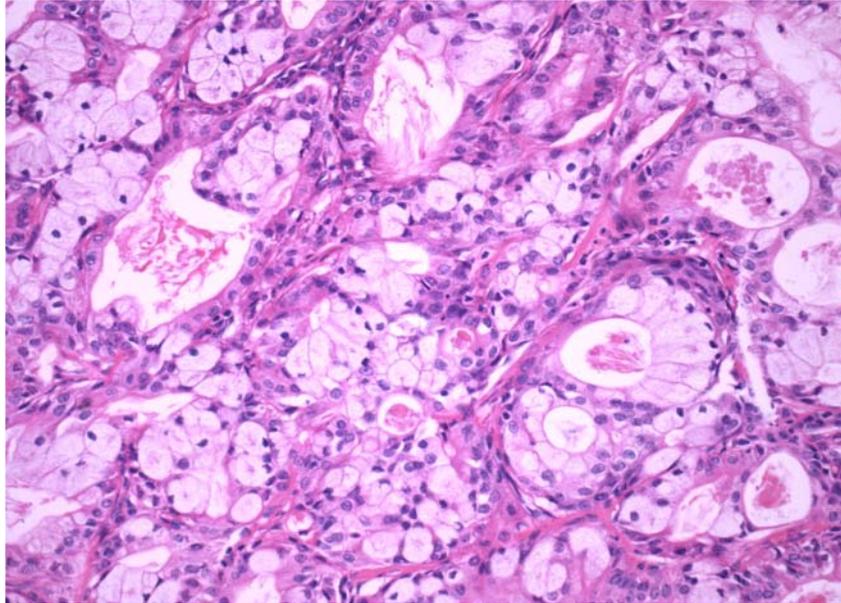
**Figura 3** - Proliferação de células escamosas com área de necrose em carcinoma mucoepidermóide de alto grau histológico de malignidade (H&E, aumento original 20x).



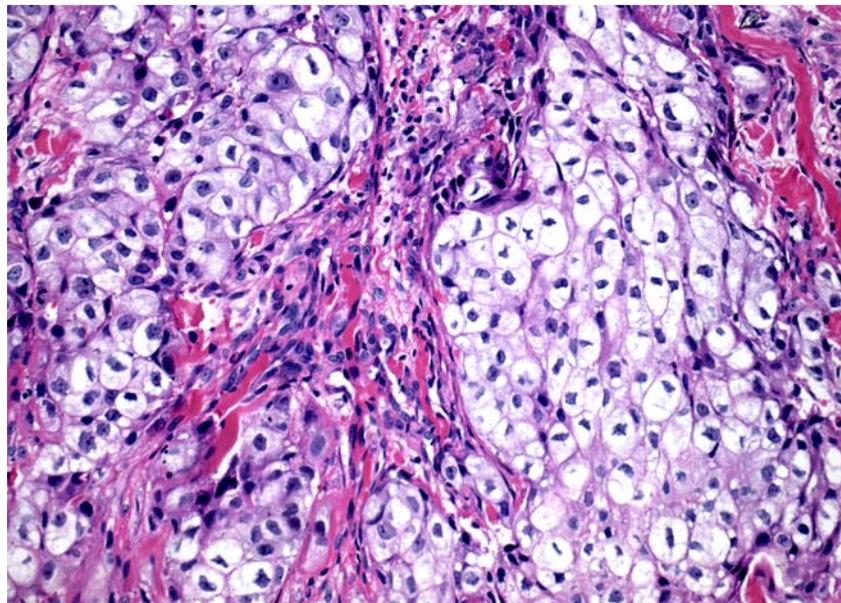
**Figura 4** - Células escamosas encontradas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (H&E, aumento original 20x).



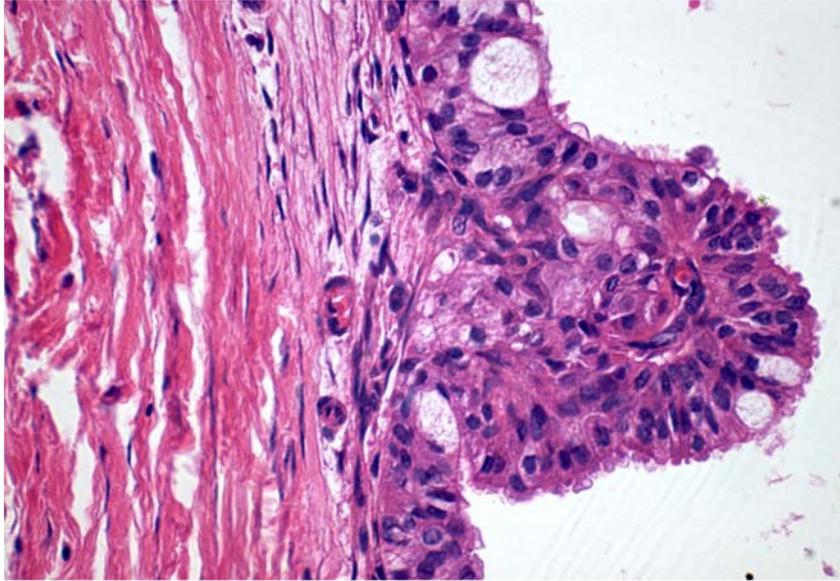
**Figura 5** - Células intermediárias encontradas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (H&E, aumento original 20x).



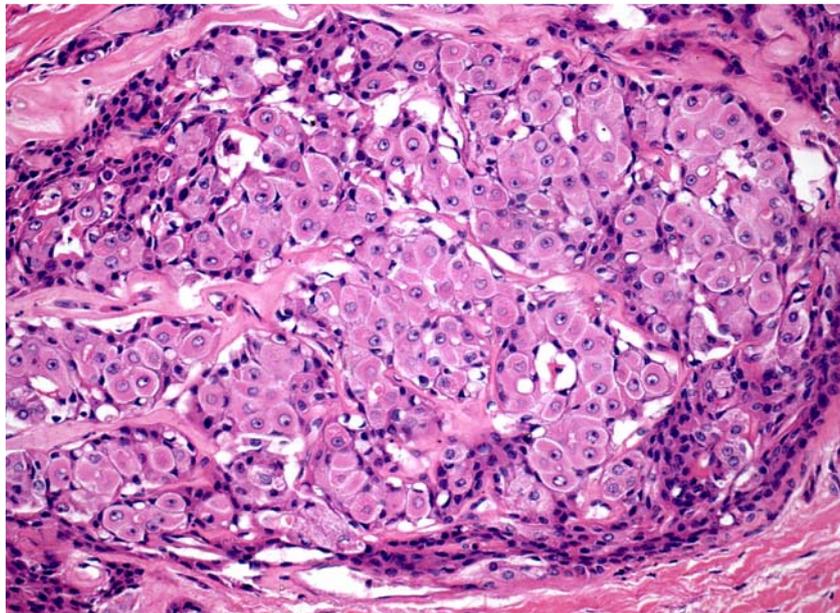
**Figura 6** - Células mucosas encontradas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (H&E, aumento original 20x).



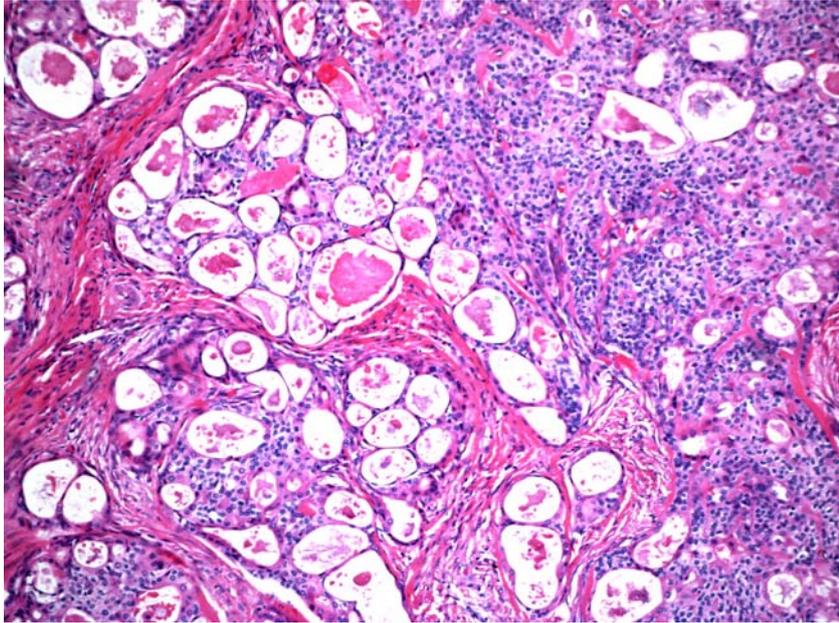
**Figura 7** - Células claras encontradas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (H&E, aumento original 20x).



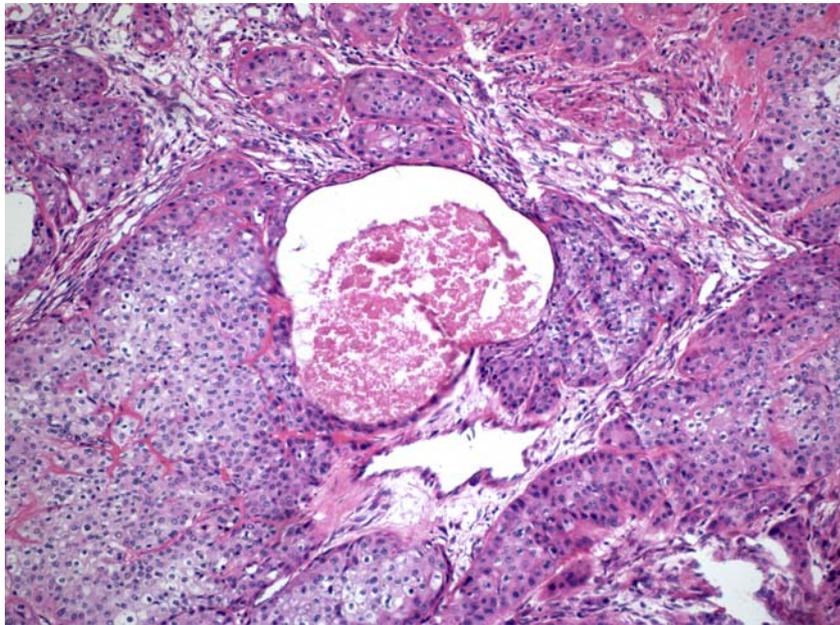
**Figura 8** - Células colunares encontradas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (H&E, aumento original 40x).



**Figura 9** - Células oncocíticas encontradas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (H&E, aumento original 20x).



**Figura 10** - Padrão de crescimento cístico/ductal encontrado nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (H&E, aumento original 10x).



**Figura 11** - Padrão de crescimento sólido encontrado nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (H&E, aumento original 10x).

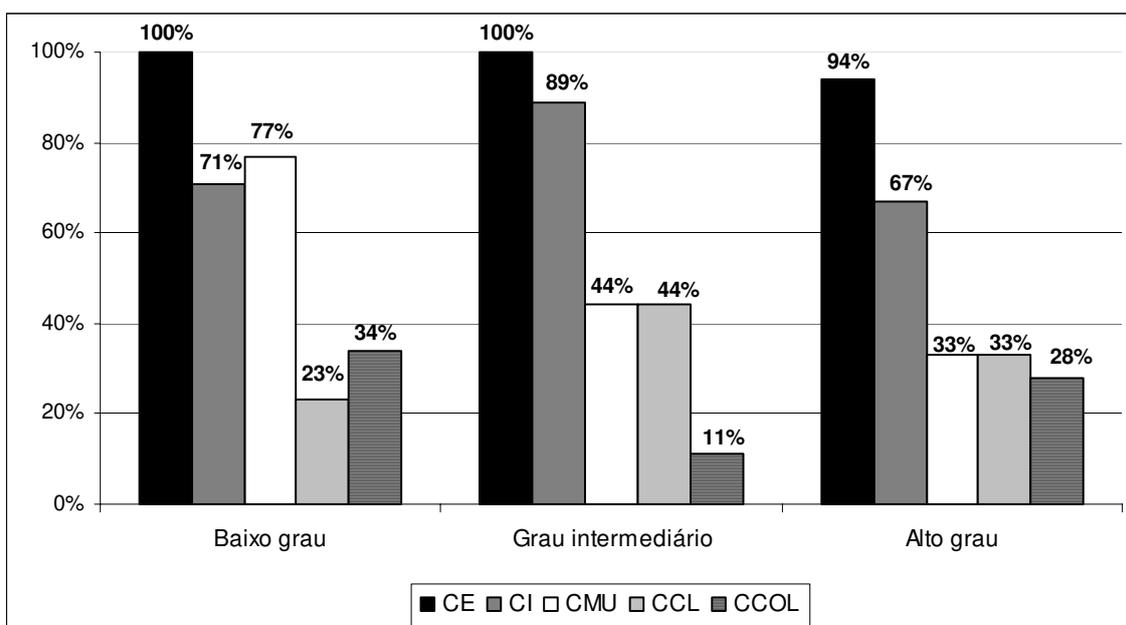
**Tabela 8** - Distribuição dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de acordo com o grau de malignidade, os tipos celulares e o padrão morfológico.

<i>Variáveis histológicas</i>	<i>Número de casos</i>	<i>(%)</i>
<b><i>Tipos celulares</i></b>		
Células escamosas	78	98
Células intermediárias	57	71
Células mucosas	43	54
Células claras	24	30
Células colunares	23	29
Células oncócicas	2	3
<b><i>Morfologia neoplásica</i></b>		
Cística/ductal	65	81
Sólida	71	89
<b><i>Grau de malignidade</i></b>		
Baixo grau	35	44
Grau intermediário	9	11
Alto grau	36	45

A identificação dos diferentes tipos celulares variou de acordo com o grau histológico de malignidade: os tumores de alto grau apresentaram predomínio de células escamosas (34 casos – 94,4%) e intermediárias (24 casos – 66,7%). Os tumores de grau intermediário também apresentaram maior número de células escamosas e intermediárias, 9 (100%) e 8 (88,9%) casos, respectivamente. No entanto, os tumores de baixo grau apresentaram melhor distribuição dos principais tipos celulares, 35 casos (100%) com escamosas, 25 (71,4%) com intermediárias e 27 (77,1%) com mucosas. A presença de células claras e colunares foi menos comum em todos os graus histológicos de malignidade, variando de 11,1% a 44,4% dos casos (tabela 9 e figura 12).

**Tabela 9** - Distribuição dos tipos celulares nos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de acordo com o grau histológico de malignidade.

Tipos celulares	Graus histológicos de malignidade		
	Baixo grau (n=35)	Grau intermediário (n=9)	Alto grau (n=36)
Células escamosas	35 (100%)	9 (100%)	34 (94,4%)
Células intermediárias	25 (71,4%)	8 (88,9%)	24 (66,7%)
Células mucosas	27 (77,1%)	4 (44,4%)	12 (33,3%)
Células claras	8 (22,9%)	4 (44,4%)	12 (33,3%)
Células colunares	12 (34,3%)	1 (11,1%)	10 (27,8%)



**Figura 12** - Distribuição dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares correlacionando os tipos celulares (CE – células escamosas; CI – células intermediárias; CMU – células mucosas; CCL – células claras; CCOL – células colunares) com o grau histológico de malignidade.

Dentre os 80 casos de CME, 40 (50%) apresentavam glândula salivar normal adjacente, 21 (52,5%) eram de parótida, 9 (22,5%) de palato, 3 (7,5%) de língua, 2 (5%) de assoalho de boca, 2 (5%) de mucosa jugal, 2 (5%) de sublingual e somente 1 (2,5%) de

rebordo alveolar. Nestes 40 casos, pudemos observar 28 (70%) casos com ácinos serosos e 19 (47,5%) com mucosos, 28 (70%) com ductos intercalados, 38 (95%) com ductos estriados e 31 (77,5%) com ductos excretores. As células mioepiteliais não foram identificadas através de técnicas de histoquímica.

### **5.3. Características Imunohistoquímicas**

Em geral, a maioria dos casos de CME apresentou alguma positividade para as diferentes CKs. No entanto, somente 17 casos (21,3%) apresentaram imunopositividade para o marcador imunohistoquímico de diferenciação mioepitelial (AML). A expressão imunohistoquímica das CKs e da AML foi variável de acordo com o tipo celular.

As células escamosas, observadas em 78 casos, apresentaram expressão imunohistoquímica para as CKs de epitélio simples, com 65 casos (83,3%) para a CK7, 58 casos (74,4%) para a CK8, 44 casos (56,4%) para a CK18 e 42 casos (53,9%) para a CK19 (figuras 13, 14, 15 e 16). A expressão das CKs de epitélio complexo nas células escamosas foi mais variada, com 54 casos (69,2%) positivos para a CK6, 43 casos (55,1%) para a CK14 e somente 26 casos (33,3%) para a CK13 (figuras 17 e 18). A diferenciação mioepitelial foi verificada em apenas 15 casos (19,2%) das células escamosas.

As células intermediárias, presentes em 57 casos, apresentaram expressão imunohistoquímica positiva das CKs 6, 7 e 8 com 23 (40,4%), 35 (61,4%) e 27 (47,4%) casos, respectivamente (figuras 19, 20 e 21). As CKs menos expressas nas células intermediárias foram as CKs 13, 14, 18 e 19 com 5 (8,8%), 10 (17,5%), 20 (35,1%) e 13 (22,8%) casos, respectivamente. A expressão de AML foi encontrada somente em 10 casos (17,5%) das células intermediárias.

A expressão imunohistoquímica nas células mucosas, presentes em 43 casos, foi menos observada para a maioria dos marcadores imunohistoquímicos, com somente 3 (7%) casos positivos para a CK6, 4 casos (9,3%) para a CK8, 6 casos (14%) para a CK18, 4 casos (9,3%) para a CK19 e 1 caso (2,3%) para a CK13. A expressão da CK7 foi a única

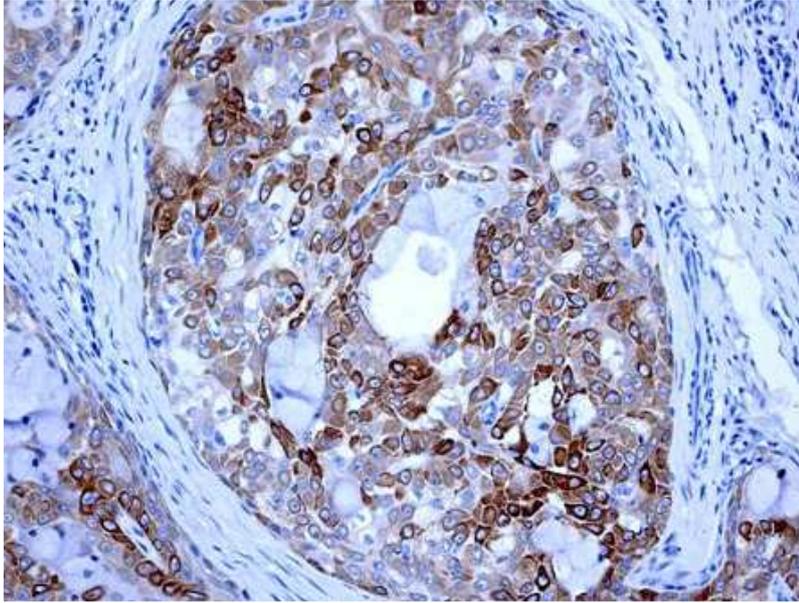
exceção com 20 casos (46,5%) positivos (figura 22). A expressão da CK14 não foi observada neste tipo celular, e a de AML foi visualizada em somente 1 caso (2,3%).

As células claras, presentes em 24 casos, apresentaram expressão imunohistoquímica positiva das CKs 6, 7 e 8, com 15 (62,5%), 14 (58,3%) e 14 (58,3%) casos, respectivamente, apresentando imunopositividade menos comum das CKs 13, 14, 18 e 19, com somente 7 (29,2%) , 3 (12,5%), 4 (16,7%) e 7 (29,2%) casos, respectivamente (figuras 23, 24 e 25). A diferenciação mioepitelial foi verificada nas células claras em apenas 1 caso (4,2%).

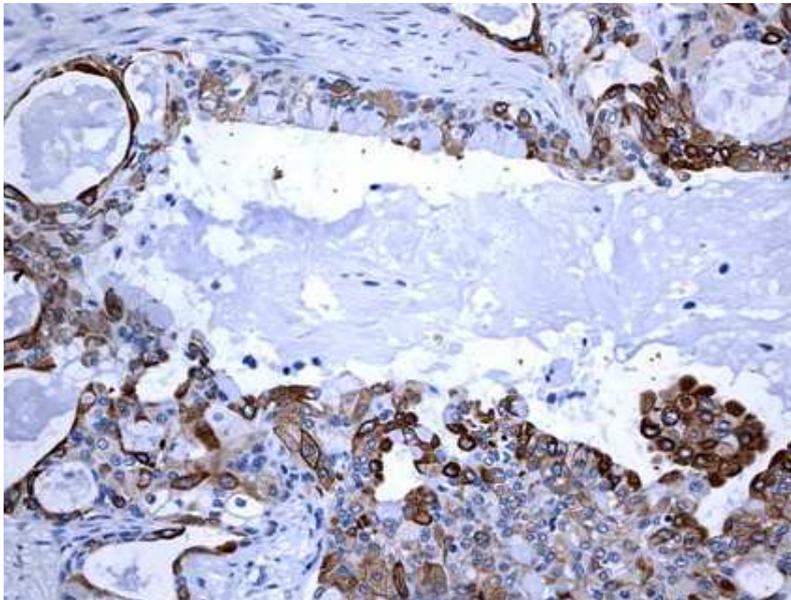
A expressão imunohistoquímica nas células colunares, presentes em 23 casos, foi mais observada para as CKs 6, 7, 8 e 18 com 12 (52,2%), 17 (73,9%), 13 (56,5%) e 12 (67,1%) casos, respectivamente, e menos observada para as CKs 13, 14 e 19 com 4 (17,4%), 1 (4,4%) e 7 (30,4%) casos, respectivamente (figuras 26, 27, 28 e 29). A imunoexpressão de AML também quase não foi observada nas células colunares totalizando apenas 2 casos (8,7%).

Dos 2 casos que apresentaram células oncocíticas, a imunomarcação foi positiva para as CKs 6, 7, 8, 18 e 19 em apenas 1 dos casos (figuras 30, 31, 32, 33 e 34).

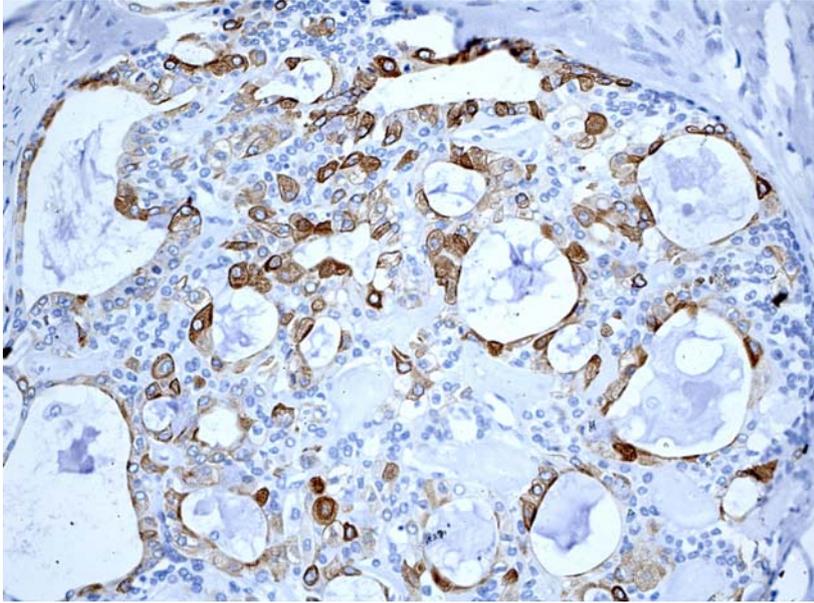
O painel imunohistoquímico de CKs e de diferenciação mioepitelial de acordo com o tipo celular encontra-se descrito na tabela 11 e figuras 35, 36, 37 e 38.



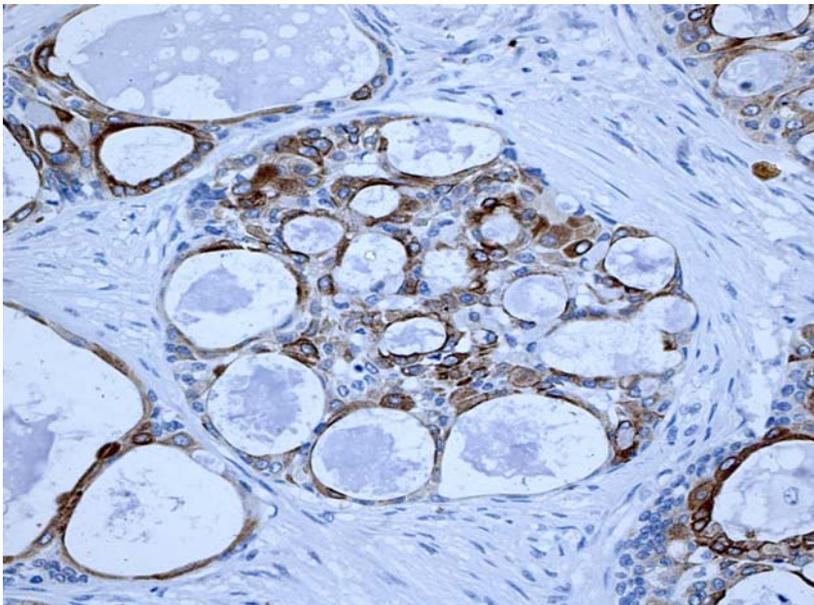
**Figura 13** - Imunopositividade para CK7 nas células escamosas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



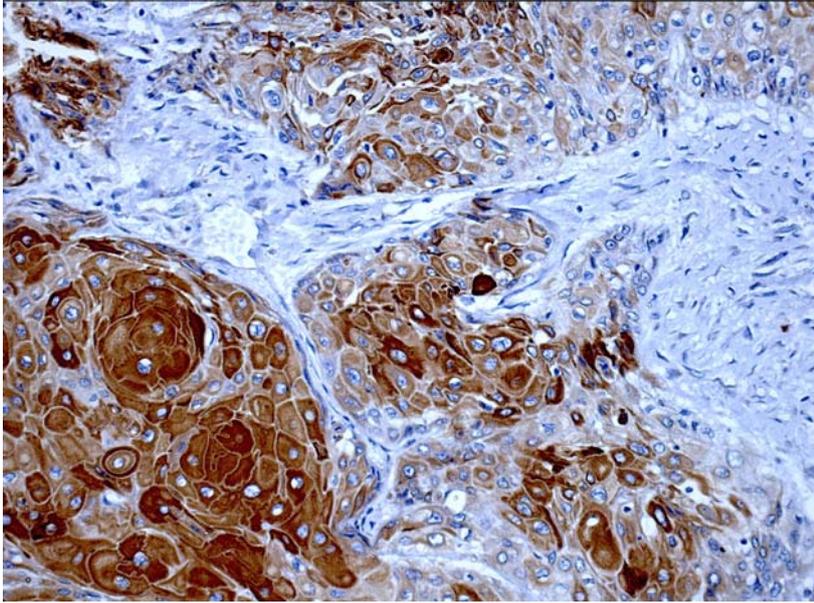
**Figura 14** - Imunopositividade para CK8 nas células escamosas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



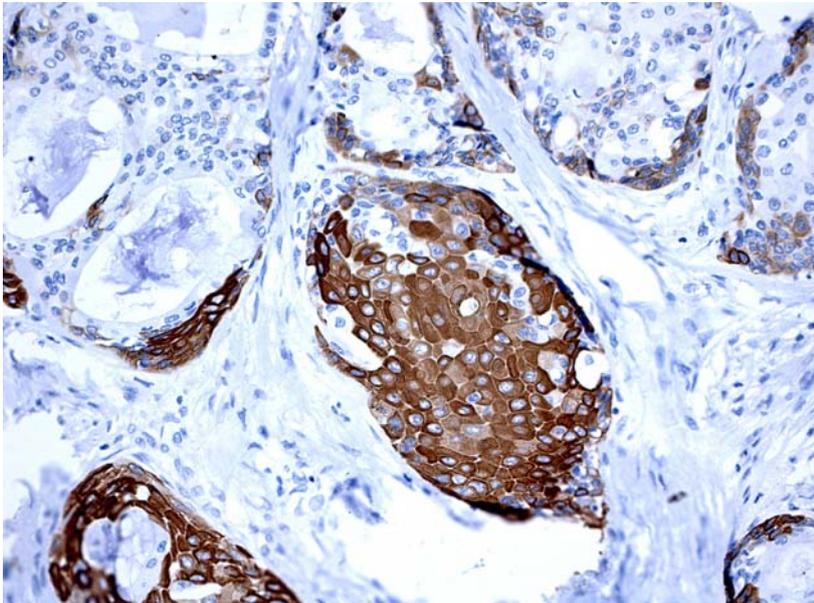
**Figura 15** - Imunopositividade para CK18 nas células escamosas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



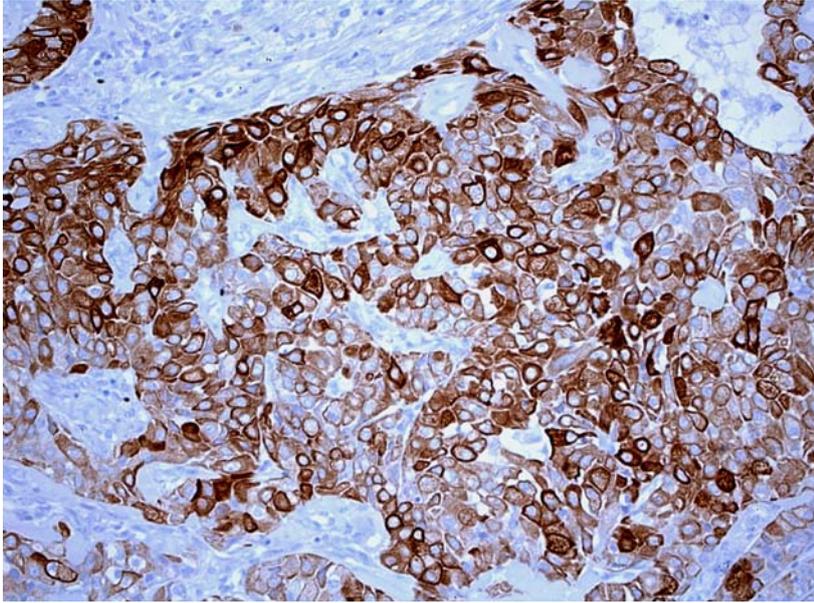
**Figura 16** - Imunopositividade para CK19 nas células escamosas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



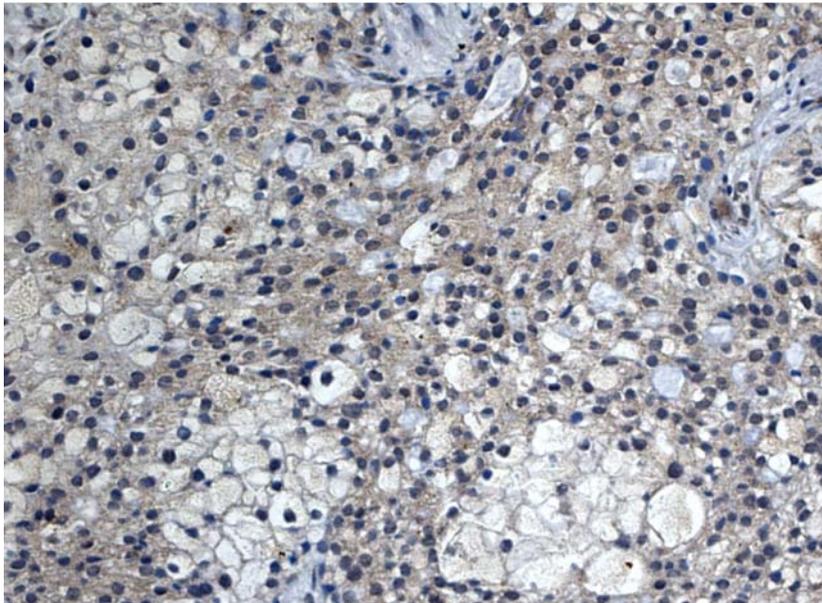
**Figura 17** - Imunopositividade para CK6 nas células escamosas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



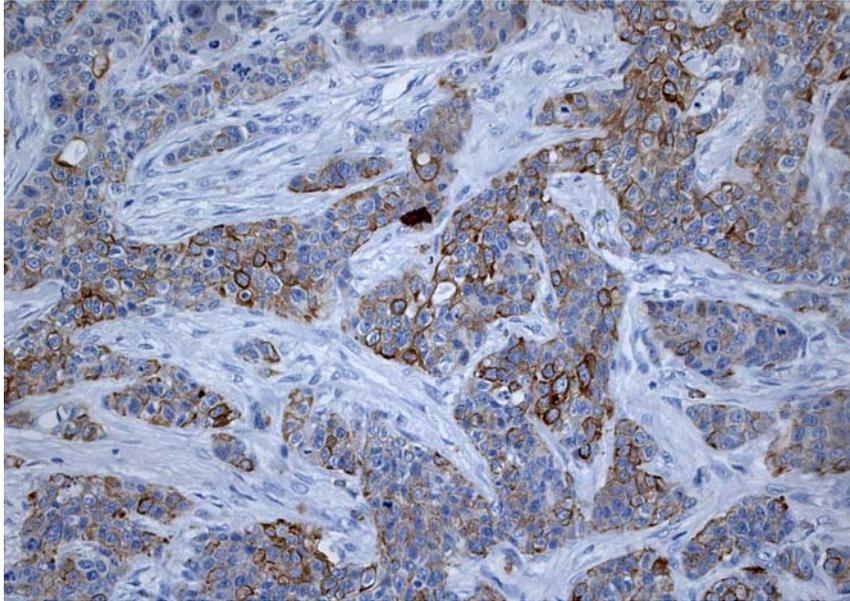
**Figura 18** - Imunopositividade para CK14 nas células escamosas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



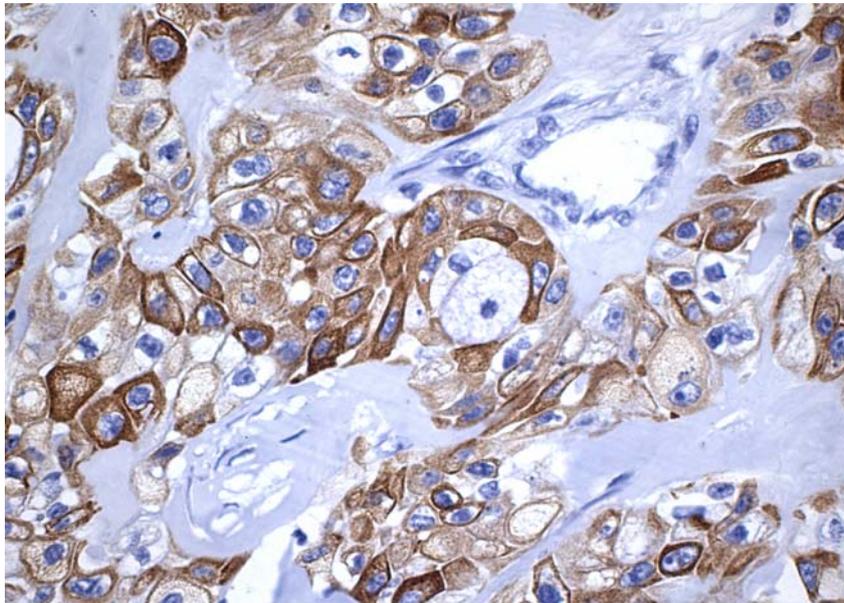
**Figura 19** - Imunopositividade para CK7 nas células intermediárias nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



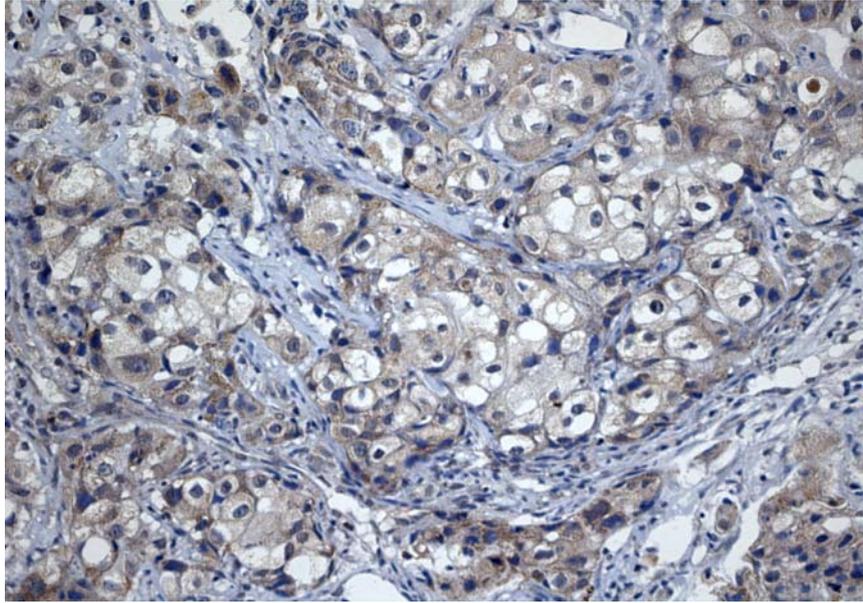
**Figura 20** - Imunopositividade para CK6 nas células intermediárias nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



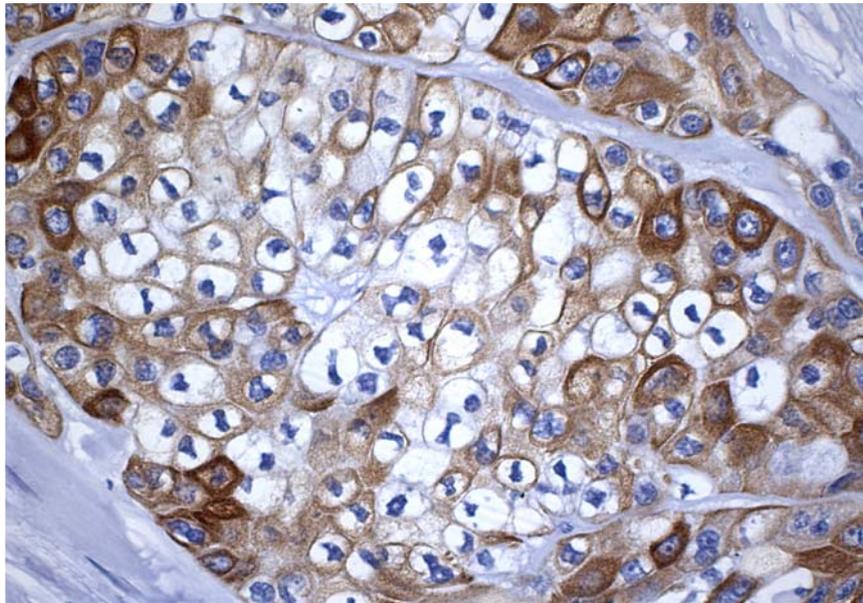
**Figura 21** - Imunopositividade para CK8 nas células intermediárias nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



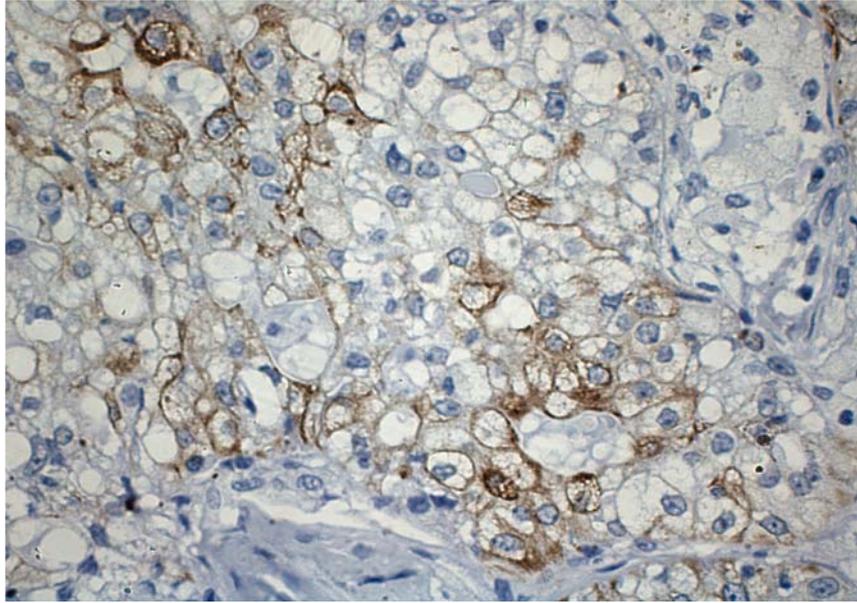
**Figura 22** - Imunopositividade para CK7 em algumas células mucosas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



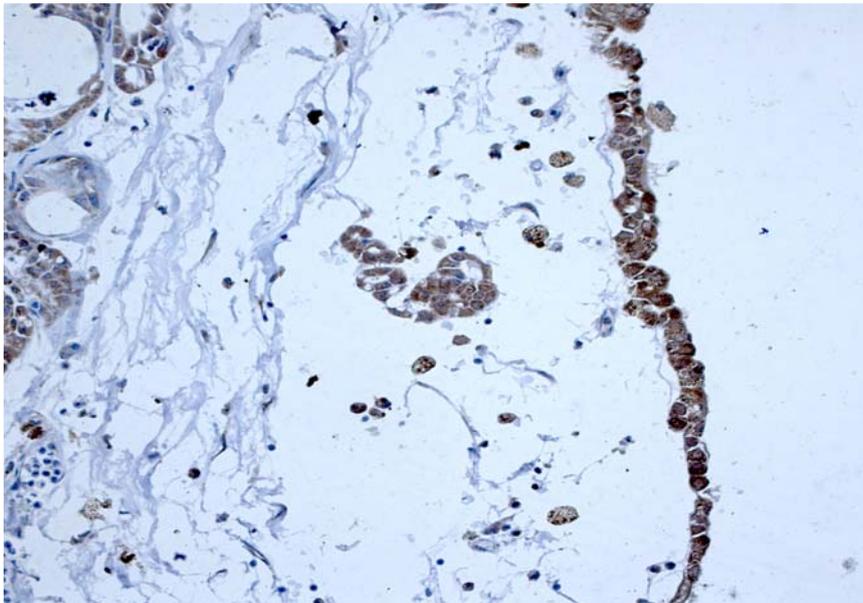
**Figura 23** - Imunopositividade para CK6 nas células claras nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



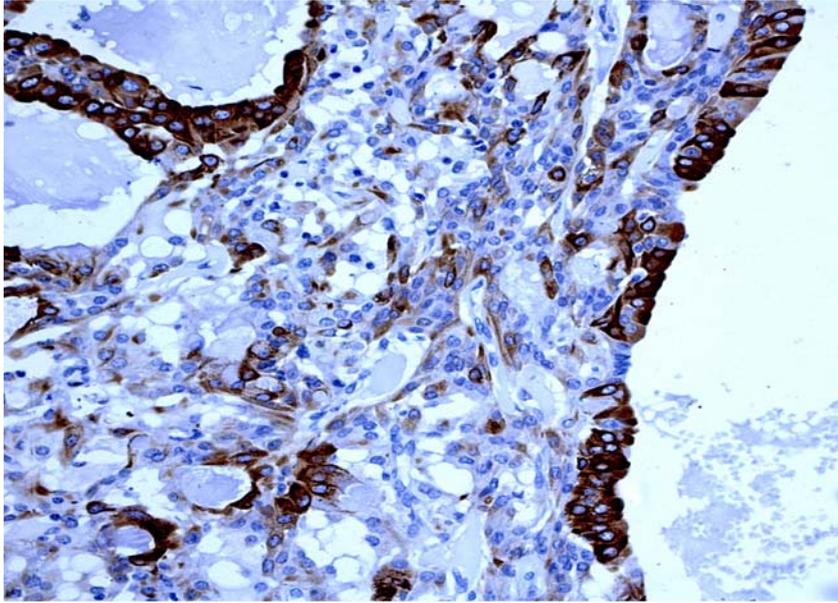
**Figura 24** - Imunopositividade para CK7 nas células claras nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



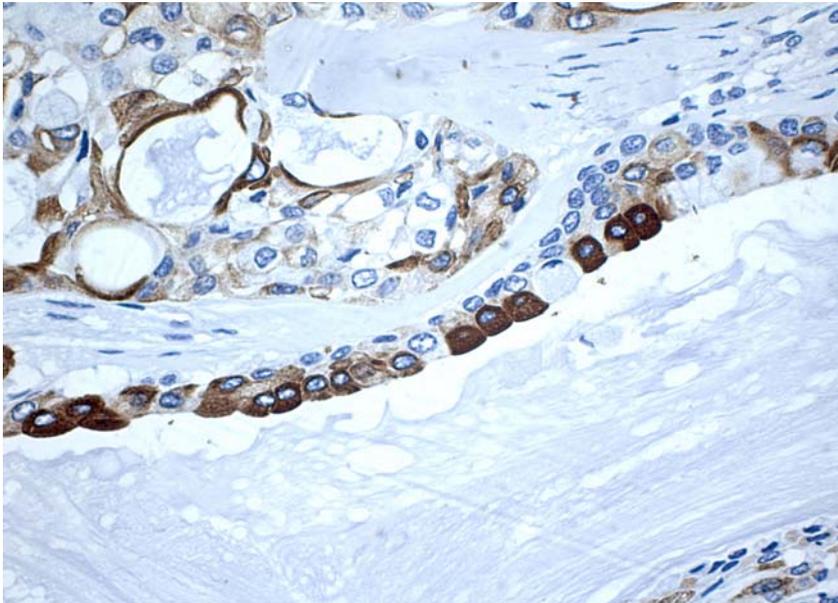
**Figura 25** - Imunopositividade para CK8 em algumas células claras nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



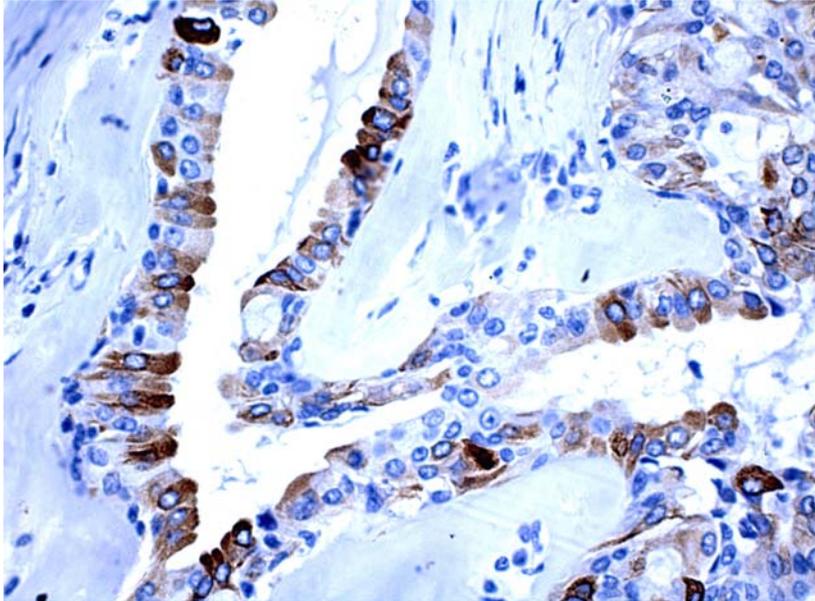
**Figura 26** - Imunopositividade para CK6 nas células colunares nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



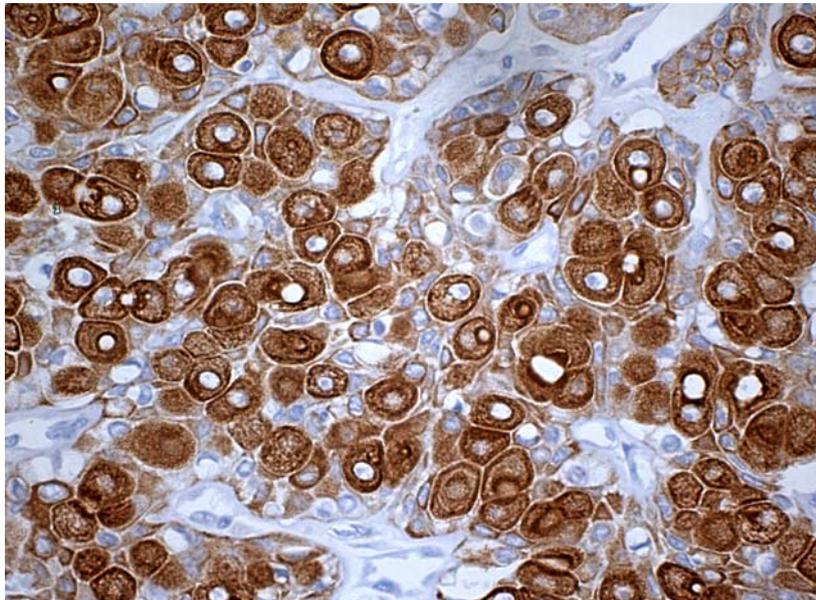
**Figura 27** - Imunopositividade para CK7 nas células colunares nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



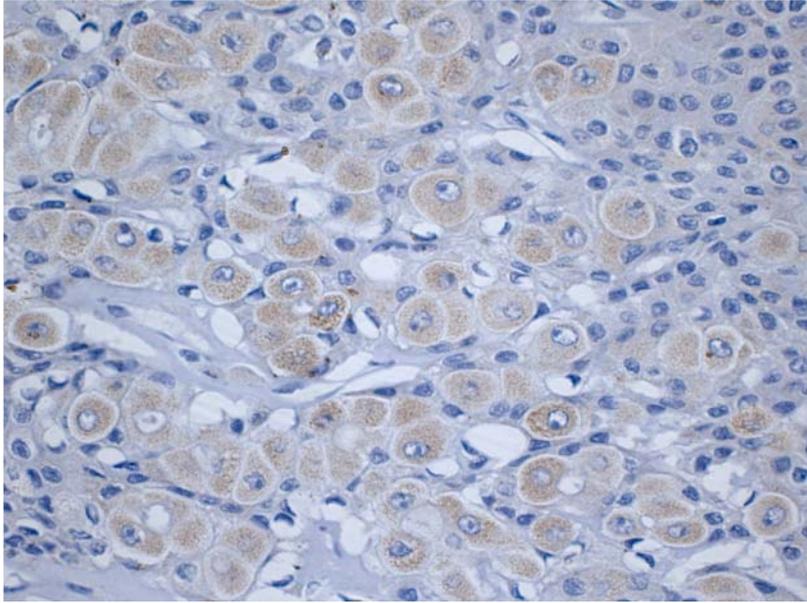
**Figura 28** - Imunopositividade para CK8 nas células colunares nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



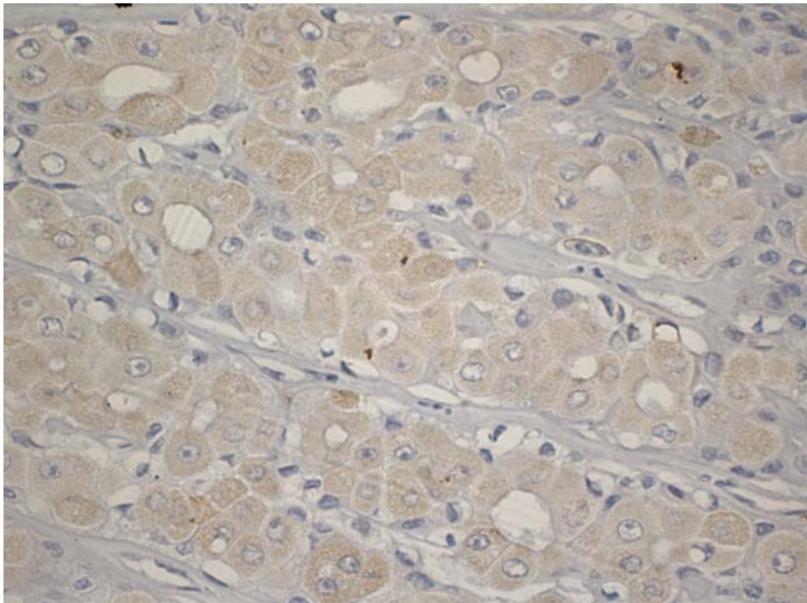
**Figura 29** - Imunopositividade para CK18 nas células colunares nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



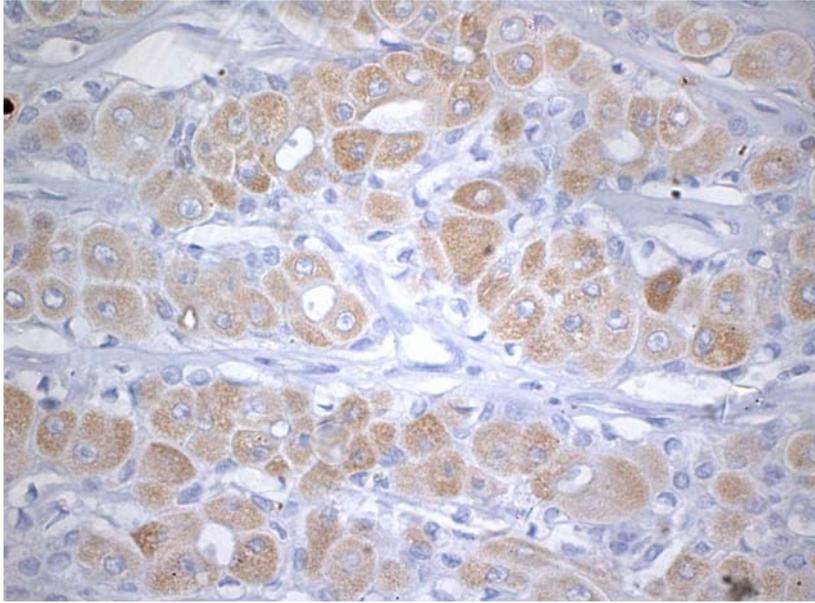
**Figura 30** - Imunopositividade para CK7 nas células oncocíticas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



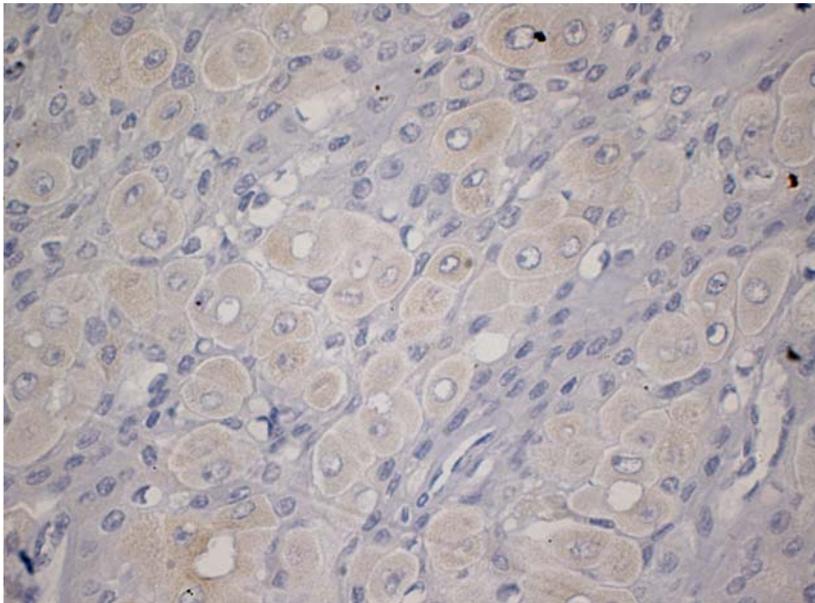
**Figura 31** - Imunopositividade para CK6 nas células oncocíticas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



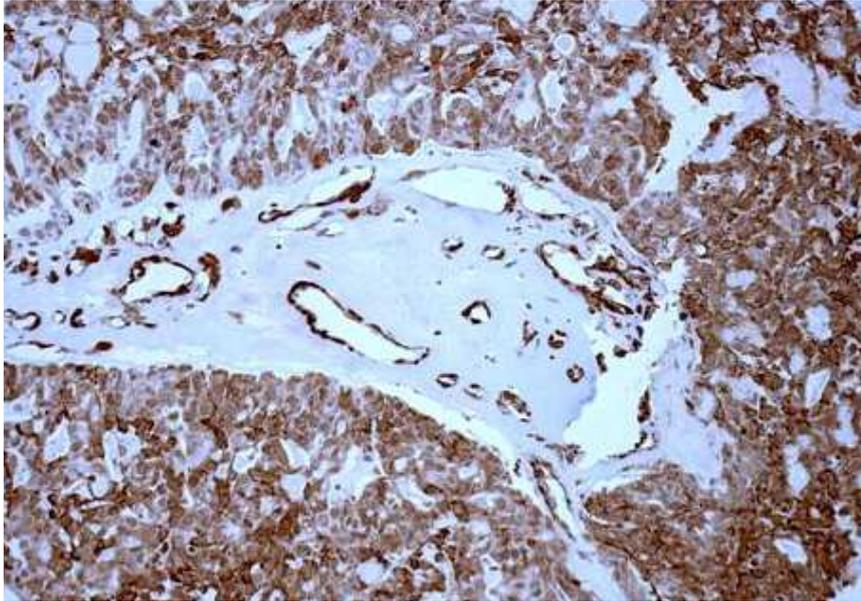
**Figura 32** - Imunopositividade para CK8 nas células oncocíticas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



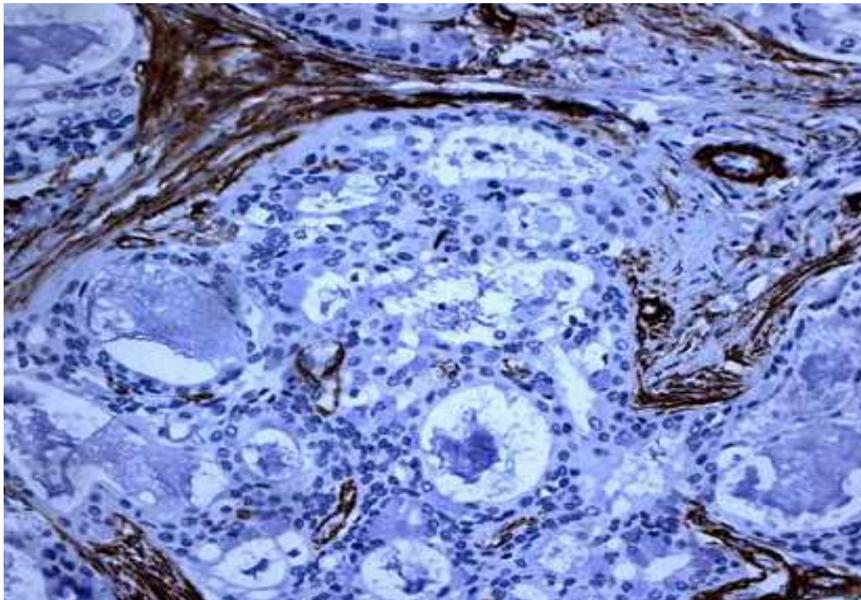
**Figura 33** - Imunopositividade para CK18 nas células oncocíticas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



**Figura 34** - Imunopositividade para CK19 nas células oncocíticas nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 40x).



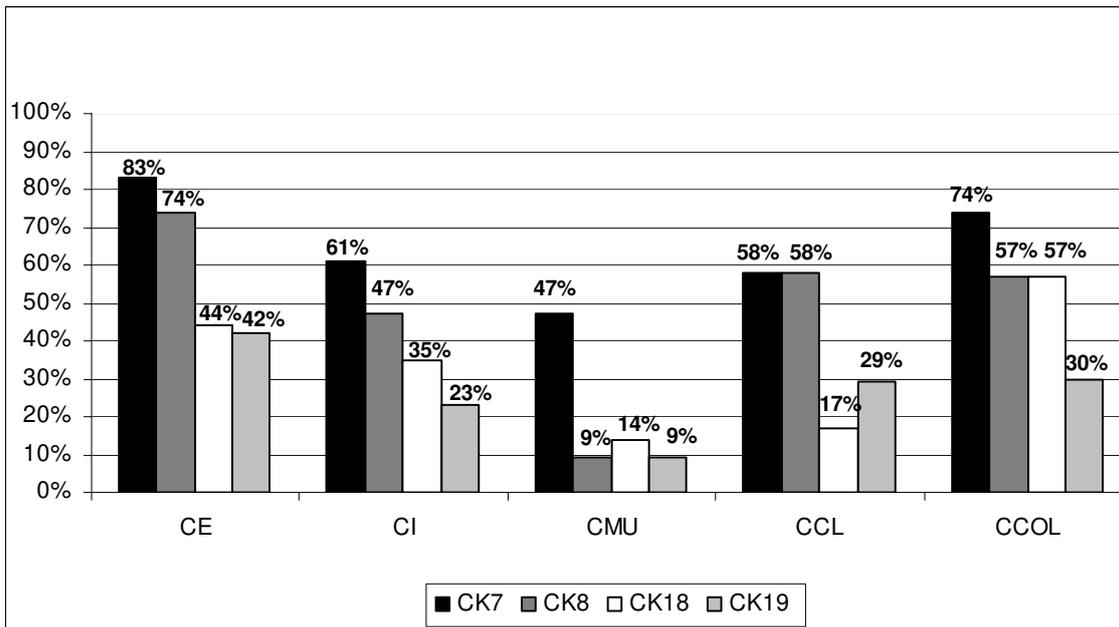
**Figura 35** - Expressão imunohistoquímica de AML nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



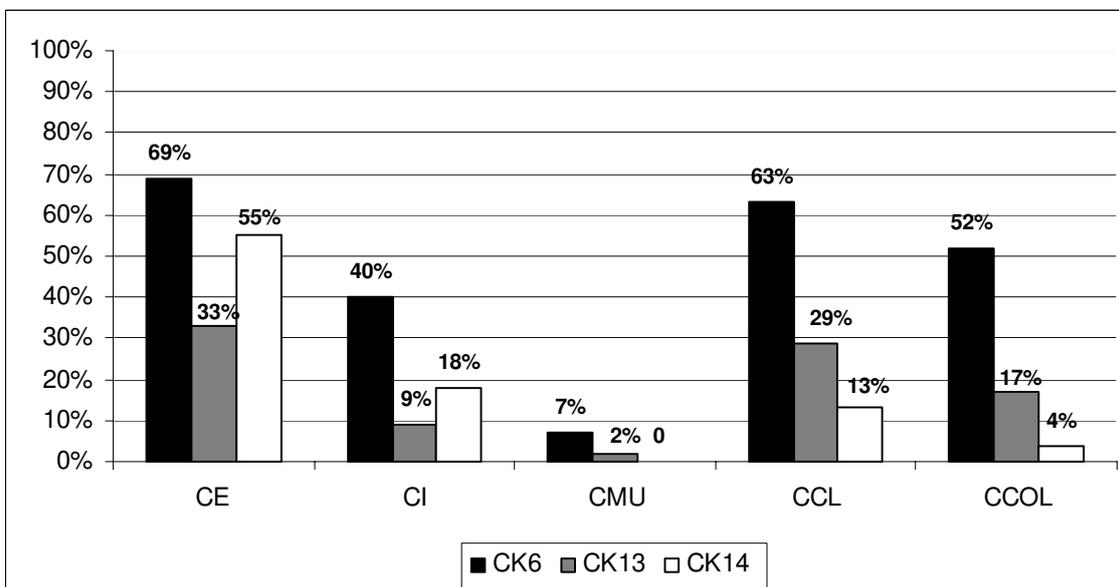
**Figura 36** - Ausência de expressão imunohistoquímica de AML nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares, em contraste com o controle positivo interno da reação (Aumento original 20x).

**Tabela 11** - Distribuição dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares de acordo com a expressão imunohistoquímica de citoqueratinas (CKs) e actina de músculo liso (AML) por tipo celular.

<i>Painel imunohistoquímico</i>	<i>Tipos Celulares</i>				
	<i>Células escamosas (n = 78)</i>	<i>Células intermediárias (n = 57)</i>	<i>Células mucosas (n = 43)</i>	<i>Células claras (n = 24)</i>	<i>Células colunares (n = 23)</i>
<i>Citoqueratinas de epitélio simples</i>					
CK7	65 (83,3%)	35 (61,4%)	20 (46,5%)	14 (58,3%)	17 (73,9%)
CK8	58 (74,4%)	27 (47,4%)	4 (9,3%)	14 (58,3%)	13 (56,5%)
CK18	44 (56,4%)	20 (35,1%)	6 (14%)	4 (16,7%)	12 (57,1%)
CK19	42 (53,9%)	13 (22,8%)	4 (9,3%)	7 (29,2%)	7 (30,4%)
<i>Citoqueratinas de epitélio complexo</i>					
CK6	54 (69,2%)	23 (40,4%)	3 (7%)	15 (62,5%)	12 (52,2%)
CK13	26 (33,3%)	5 (8,8%)	1 (2,3%)	7 (29,2%)	4 (17,4%)
CK14	43 (55,1%)	10 (17,5%)	0	3 (12,5%)	1 (4,4%)
<i>Diferenciação mioepitelial</i>					
AML	15 (19,2%)	10 (17,5%)	1 (2,3%)	1 (4,2%)	2 (8,7%)



**Figura 37** - Distribuição dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares de acordo com a expressão imunohistoquímica de citoquertinas (CKs) de epitélio simples por tipo celular (CE – células escamosas; CI – células intermediárias; CMU – células mucosas; CCL – células claras; CCOL – células colunares).

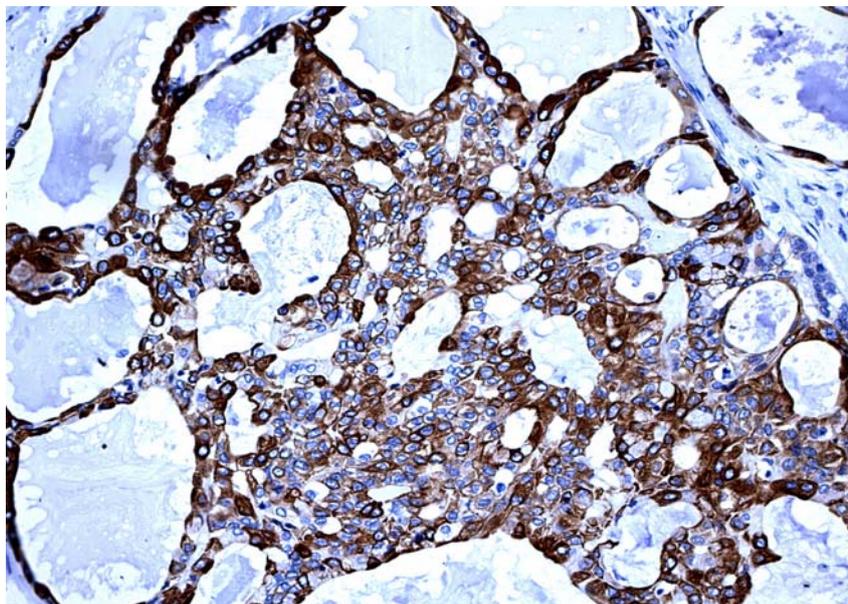


**Figura 38** - Distribuição dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares de acordo com a expressão imunohistoquímica de citoqueratinas (CKs) de epitélio complexo por tipo celular (CE – células escamosas; CI – células intermediárias; CMU – células mucosas; CCL – células claras; CCOL – células colunares).

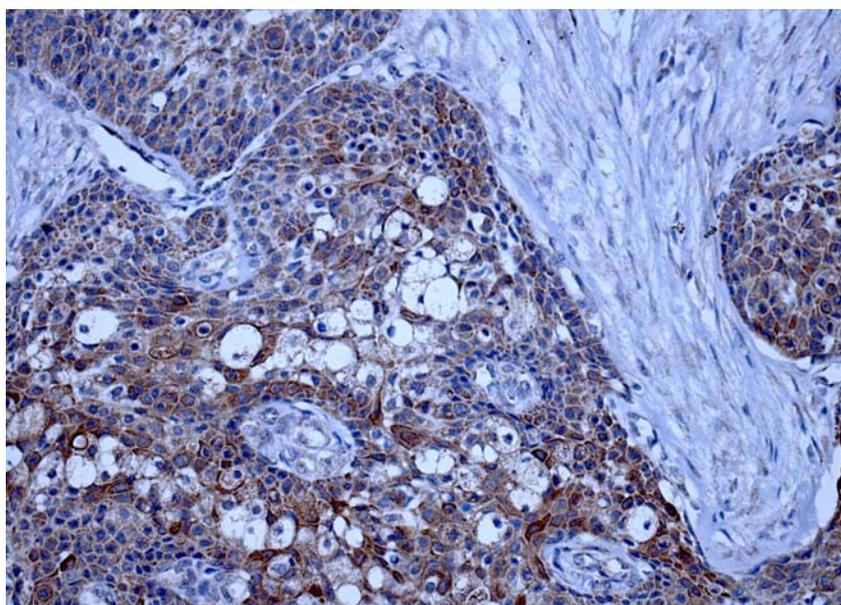
Com relação ao padrão morfológico de organização, a arquitetura cística/ductal apresentou imunopositividade para todas as CKs, em que as CKs mais comumente expressas foram as CKs 7, 8 e 18, positivas em 50 (76,9%), 27 (41,5%) e 28 (43,1%) dos 65 casos, respectivamente. Dos 71 casos com padrão sólido também se observou positividade para todas as CKs, que foi mais observada na expressão das CKs 6, 7, 8 e 18 com 38 (53,5%), 46 (64,8%), 34 (47,9%) e 30 (42,3%) casos, respectivamente (tabela 12 e figuras 39, 40 e 41).

**Tabela 12.** Distribuição dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares de acordo com a expressão imunohistoquímica de citoqueratinas (CKs) por padrão morfológico.

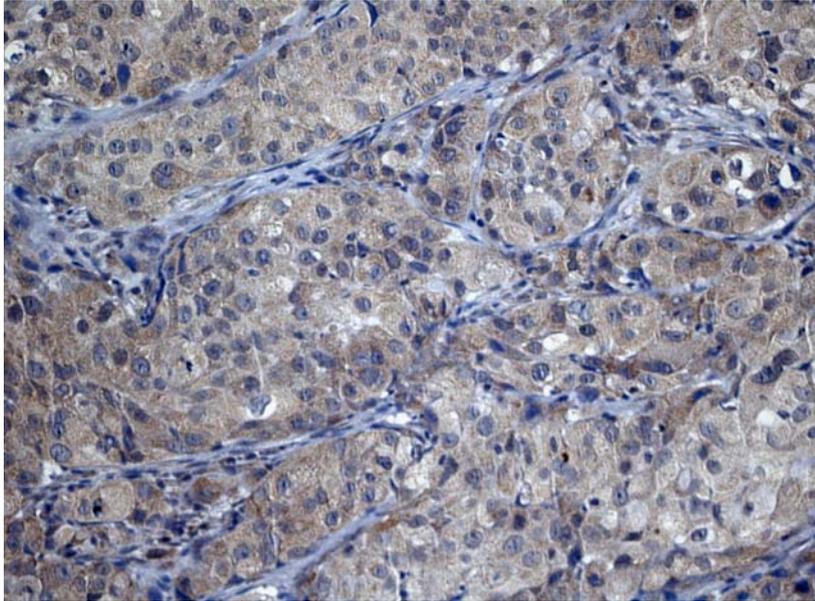
<i>Marcadores imunohistoquímicos</i>	<i>Arquitetura</i>	
	<i>Cística/Ductal (n=65)</i>	<i>Sólido (n=71)</i>
CK6	20 (30,8%)	38 (53,5%)
CK7	50 (76,9%)	46 (64,8%)
CK8	27 (41,5%)	34 (47,9%)
CK13	5 (7,7%)	14 (19,7%)
CK14	10 (15,4%)	25 (35,2%)
CK18	28 (43,1%)	30 (42,3%)
CK19	20 (30,8%)	25 (35,2%)



**Figura 39** - Imunopositividade para CK7 no padrão de crescimento cístico/ductal nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



**Figura 40** - Imunopositividade para CK7 no padrão de crescimento sólido nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).



**Figura 41** - Imunopositividade para CK6 no padrão de crescimento sólido nos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares (Aumento original 20x).

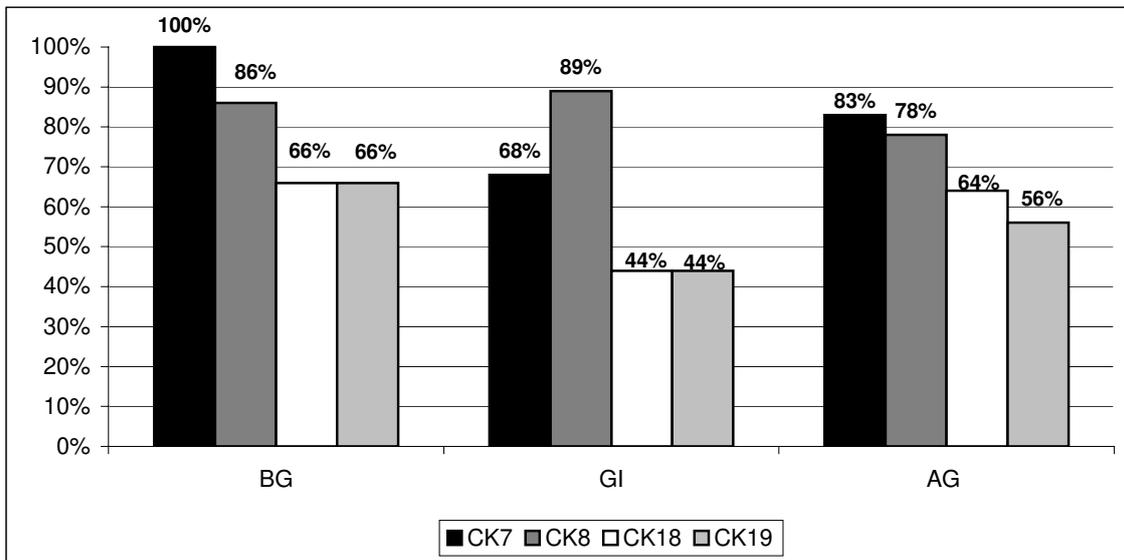
Em geral, a maioria dos casos de CME apresentou positividade para as CKs de epitélio simples e complexo. A CK7 foi expressa em todos os tumores de baixo grau, e a CK8 em 85,7% dos casos de tumores deste grau de malignidade. Os tumores de alto grau apresentaram expressão elevada para as CKs 6, 7 e 8 com 72,2%, 77,8% e 83,3% dos casos imunopositivos, respectivamente. Os tumores de grau intermediário apresentaram a expressão mais elevada das CKs 6 e 8 com 86,9% dos casos em cada uma das CKs. A CK13 apresentou expressão reduzida abaixo de 50% em todos os graus histológicos de malignidade.

Dentre os 17 casos (21,3%) que apresentaram diferenciação mioepitelial, 10 (58,8%) eram de alto grau, 3 (17,7%) de grau intermediário e 4 (23,5%) de baixo grau.

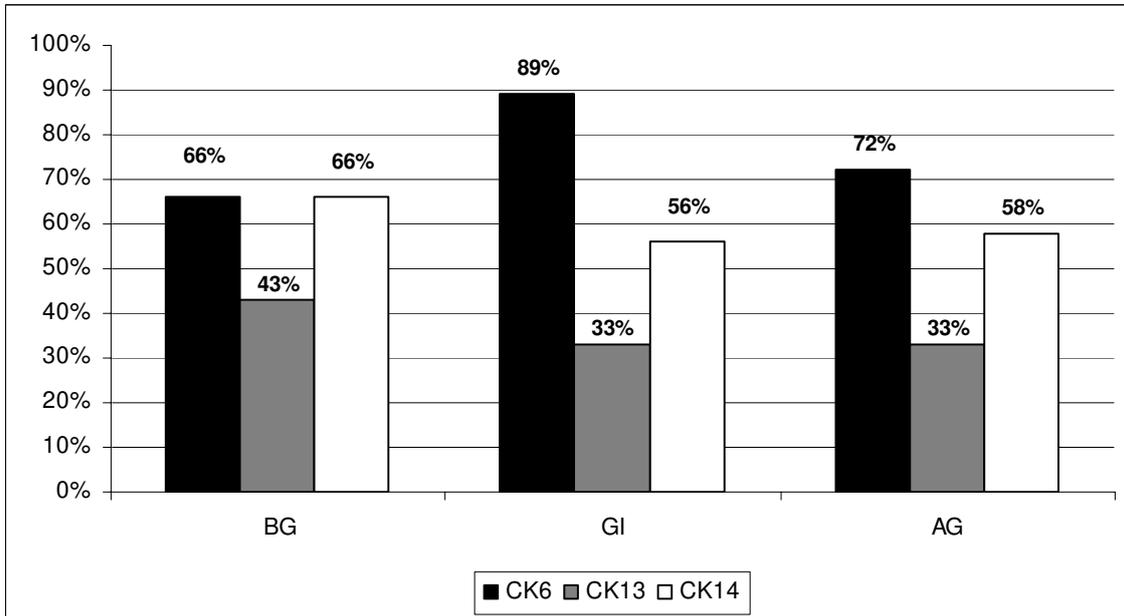
O resumo do painel imunohistoquímico de CKs e de diferenciação mioepitelial segundo o grau histológico de malignidade encontra-se descrito na tabela 13 e figuras 42 e 43.

**Tabela 13** - Distribuição dos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares de acordo com a expressão imunohistoquímica de citoqueratinas (CKs) e actina de músculo liso (AML) por grau histológico de malignidade.

<i>Marcadores Imunohistoquímicos</i>	<i>Graus histológicos de malignidade</i>		
	<i>Baixo grau (n=35)</i>	<i>Grau intermediário (n=9)</i>	<i>Alto grau (n=36)</i>
<i>Citoqueratinas de epitélio simples</i>			
CK7	35 (100%)	6 (67,7%)	30 (83,3%)
CK8	30 (85,7%)	8 (88,9%)	28 (77,8%)
CK18	23 (65,7%)	4 (44,4%)	23 (63,9%)
CK19	23 (65,7%)	4 (44,4%)	20 (55,6%)
<i>Citoqueratinas de epitélio complexo</i>			
CK6	23 (65,7%)	8 (88,9%)	26 (72,2%)
CK13	15 (42,9%)	3 (33,3%)	12 (33,3%)
CK14	23 (65,7%)	5 (55,6%)	21 (58,3%)
<i>Diferenciação mioepitelial</i>			
AML	4 (11,4%)	3 (33,3%)	10 (27,8%)



**Figura 42** - Distribuição dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares de acordo com a expressão imunohistoquímica de citoqueratinas (CKs) de epitélio simples por grau histológico de malignidade (BG – baixo grau; GI – grau intermediário; AG – alto grau).



**Figura 43** - Distribuição dos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares de acordo com a expressão imunohistoquímica de citoqueratinas (CKs) de epitélio complexo por grau histológico de malignidade (BG – baixo grau; GI – grau intermediário; AG – alto grau).

O tecido glandular salivar normal adjacente também mostrou perfil imunohistoquímico variável. Dentre os ácinos mucosos, observou-se imunopositividade somente para as CKs 7 (26,3%), 8 (10,5%) e 18 (36,8%). Nos casos envolvendo os ácinos serosos, a imunopositividade foi observada para as CKs 6, 7, 8, 14, 18 e 19, sendo que a CK18 foi a mais expressa (60,7%).

Os ductos intercalados apresentaram graus variáveis de imunopositividade para todas as CKs, especialmente para as CKs 6, 7, 18 e 19, que totalizaram 67,9%, 89,3%, 75% e 67,9% dos casos, respectivamente. Os ductos estriados também foram imunopositivos para todo o grupo de CKs, apresentando expressão pronunciada em todos os casos, exceto para a CK14 que representou 39,5% dos casos.

Os ductos excretores apresentaram imunoexpressão diferenciada dependente da localização luminal ou ductal e não-luminal ou basal. As células ductais apresentaram imunopositividade mais evidenciada para as CKs 6, 7, 8, 18 e 19, sendo todas acima de 65% dos casos. Nas células basais verificou-se imunopositividade mais proeminente somente para a CK14 com 80,7% dos casos.

As células mioepiteliais foram observadas somente através da técnica de imunohistoquímica, principalmente através dos marcadores AML (95%) e CK14 (32,5%).

O resumo do perfil imunohistoquímico de CKs e AML nos 40 casos de glândula salivar normal está descrito na tabela 14.

**Tabela 14** - Distribuição dos 40 casos de glândulas salivares normais adjacentes aos carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares de acordo com a expressão imunohistoquímica de citoqueratinas (CKs) e de diferenciação mioepitelial.

<i>Glândula salivar normal</i>	<i>Marcadores imunohistoquímicos</i>							
	<i>CKs de epitélio simples</i>				<i>CKs de epitélio complexo</i>			<i>Mioepitelial</i>
	<i>CK7</i>	<i>CK8</i>	<i>CK18</i>	<i>CK19</i>	<i>CK6</i>	<i>CK13</i>	<i>CK14</i>	<i>AML</i>
Ácinos mucosos (n=19)	5 (26,3%)	2 (10,5%)	7 (36,8%)	0	0	0	0	0
Ácinos serosos (n=28)	8 (28,6%)	7 (25%)	17 (60,7%)	2 (7,1%)	2 (7,1%)	0	1 (3,6%)	0
Ductos intercalados (n=28)	25 (89,3%)	12 (42,9%)	21 (75%)	19 (67,9%)	19 (67,9%)	7 (25%)	5 (17,9%)	0
Ductos estriados (n=38)	35 (92,1%)	36 (94,7%)	36 (94,7%)	35 (92,1%)	30 (79%)	21 (55,3%)	15 (39,5%)	0
Ductos excretores células ductais (n=31)	30 (96,8%)	29 (93,6%)	22 (71%)	27 (87,1%)	21 (67,7%)	11 (35,5%)	5 (16,1%)	0
Ductos excretores células basais (n=31)	11 (35,5%)	10 (32,3%)	7 (22,6%)	12 (38,7%)	14 (45,2%)	1 (3,2%)	25 (80,7%)	0
Células mioepiteliais (n=40)	4 (10%)	2 (5%)	5 (12,5%)	0	1 (2,5%)	0	13 (32,5%)	38 (95%)

De forma resumida, os CMEs apresentaram imunopositividade pronunciada da maioria das CKs estudadas, CKs 6, 7, 8, 14, 18 e 19, resultado similar ao observado nos ductos excretores, que apresentaram também expressão imunohistoquímica pronunciada das CKs 6, 7, 8, 14, 18 e 19 e imunoexpressão menos pronunciada da CK13 e AML. As células acinares apresentaram maior expressão da CK18; os ductos intercalados das CKs 6, 7, 18 e 19; e os ductos estriados das CKs 6, 7, 8, 13, 18 e 19 (tabela 15).

**Tabela 15** - Distribuição do padrão de expressão imunohistoquímica de citoqueratinas (CKs) e actina de músculo liso (AML) nos 80 casos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares e 40 casos de glândulas salivares normais adjacentes.

<i>Padrão de expressão</i>		
<i>imunohistoquímica</i>	<i>Expressão mais pronunciada</i>	<i>Expressão menos pronunciada</i>
CMEs	CKs 6, 7, 8, 14, 18 e 19	CK13 e AML
Células acinares	CK18	CKs 6, 7, 8, 13, 14,19 e AML
Ductos intercalados	CKs 6, 7, 18 e 19	CKs 8, 13, 14 e AML
Ductos estriados	CKs 6, 7, 8, 13, 18 e 19	CK14 e AML
Ductos excretores	CKs 6, 7, 8, 14, 18 e 19	CK13 e AML

## 6. DISCUSSÃO:

As neoplasias de glândulas salivares constituem um grupo heterogêneo, dentro do qual o CME representa o segundo tumor mais freqüente e o tumor maligno mais comum (Ellis & Auclair, 1996; Goode *et al.*, 1998; Pires *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004a; Ito *et al.*, 2005; Otoh *et al.*, 2005; Yih *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2006; Rapidis *et al.*, 2007). A maioria dos trabalhos relata uma predominância de ocorrência de CME na glândula parótida seguida pelo palato (Spiro *et al.*, 1978; Ellis & Auclair, 1996; Brandwein *et al.*, 2001; Guzzo *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004a; Barnes *et al.*, 2005; Luna, 2006). Em nosso estudo a distribuição dos tumores por localização se mostrou similar com 47,5% dos casos acometendo a parótida e 26,3% o palato. As demais localizações foram observadas em proporções que variavam entre 2,5 e 3,8% e nenhum caso foi observado na glândula submandibular.

A distribuição da ocorrência dos casos de CME entre os gêneros apresenta algumas variações. Alguns autores relatam predominância do gênero feminino (Ellis & Auclair, 1996; Brandwein *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2005), outros relataram predominância do gênero masculino (Guzzo *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004a; Ito *et al.*, 2005; Luna, 2006; Rapidis *et al.*, 2007), enquanto outros encontraram distribuição equivalente entre os gêneros (Otoh *et al.*, 2005), assim como em nosso estudo.

O CME apresenta uma distribuição relativamente uniforme entre a terceira e sétima década de vida e a média de idade encontra-se em torno dos 47 anos (Spiro *et al.*, 1978; Ellis & Auclair, 1996; Brandwein *et al.*, 2001; Guzzo *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004a; Otoh *et al.*, 2005; Rapidis *et al.*, 2007). O CME raramente acomete crianças e adolescentes, embora constitua a neoplasia maligna de glândula salivar mais comum em pacientes até os 18 anos de idade (Cruz Perez *et al.*, 2004; Guzzo *et al.*, 2006; Luna, 2006). No presente trabalho também se observou distribuição relativamente homogênea entre a segunda e a sétima década de vida, sendo a maior incidência localizada entre a quinta e a sétima década, com idade média de 46 anos.

Somente 3,8% dos casos ocorreram na primeira década de vida, reforçando a raridade do acometimento desta neoplasia em pacientes infantis.

O termo mucoepidermóide enfatiza a presença de apenas dois tipos celulares, mucosos e escamosos, embora estes não constituam os únicos grupos celulares nestes tumores. Histologicamente, os CMEs são caracterizados por uma variedade de tipos celulares e padrões de crescimento (Chaudhry *et al.*, 1989; Dardick, 1996; Ellis & Auclair, 1996, Barnes *et al.*, 2005; Luna, 2006), que contribuem para que a sua histogênese permaneça indeterminada e controversa. Nosso trabalho evidenciou que as células escamosas foram observadas em praticamente todos os casos (98%), seguidas das células intermediárias (71%) e mucosas (54%). As células claras foram observadas em 30% dos casos e organizadas principalmente em um arranjo sólido e lobular, variação descrita com relativa frequência e que pode eventualmente ser predominante (Maiorano *et al.*, 1997; Ellis, 1998; Terada *et al.*, 2004; Luna, 2006). As células colunares foram encontradas em proporção similar (29%) principalmente revestindo espaços císticos e/ou ductais. Também foram observados dois casos contendo células oncocíticas dispostas em ninhos dispersos no estroma tumoral, o que está de acordo com a literatura que descreve a diferenciação oncocítica como um achado extremamente incomum no CME (Deveci *et al.*, 2000; Brannon & Willard, 2003; Luna, 2006). Com relação ao padrão de crescimento neoplásico, este estudo encontrou uma proporção semelhante entre o grau de formação sólida e cística/ductal, contabilizando 89% e 81% dos casos, respectivamente. O grau de formação cística é importante fator de gradação histológica e que se encontra presente em abundância principalmente nos tumores de baixo grau de malignidade (Spiro *et al.*, 1978; Auclair *et al.*, 1992; Dardick, 1996; Ellis & Auclair, 1996; Goode *et al.*, 1998; Cheuk & Chan., 2000; Luna, 2006).

Os CMEs podem ser classificados em graus baixo, intermediário e alto de malignidade, os quais de um modo geral apresentam predominância de células mucosas, intermediárias e escamosas, respectivamente (Spiro *et al.*, 1978; Dardick, 1996; Luna, 2006). Nas glândulas salivares, os tumores de baixo e alto grau de malignidade, representam nesta ordem os tumores mais comuns, enquanto os tumores de grau intermediário representam a menor parcela dos casos (Pires *et al.*, 2002; Vargas *et al.*,

2002; Pires *et al.*, 2004a; Rapidis *et al.*, 2006). Em concordância com a literatura, os casos avaliados no presente trabalho foram classificados principalmente como de alto (45%) e baixo (43,8%) graus de malignidade, com somente 11,2% dos casos classificados como de grau intermediário de malignidade.

Com relação à distribuição dos tipos celulares de acordo com a gradação histológica, este trabalho encontrou uma distribuição relativamente homogênea de casos contendo células escamosas (100%), mucosas (77%) e intermediárias (71%) nos tumores classificados como de baixo grau. Os tumores descritos como de grau intermediário apresentaram predominância de células escamosas e de células intermediárias, observadas em 100% e 88,9% dos casos, respectivamente. Já nos tumores de alto grau de malignidade o único tipo celular predominante foi o escamoso, observado em 94% dos casos, sempre em quantidade superior aos demais tipos celulares, intermediárias (66,7%) e mucosas (33,3%). Auclair *et al.* (1992) e Goode *et al.* (1998) analisaram em seus trabalhos a porcentagem dos tipos celulares encontrados correlacionando-os com o prognóstico em casos de CMEs de glândulas salivares menores e maiores, respectivamente. Ambos observaram células escamosas em maior proporção nos pacientes que apresentaram pior prognóstico, enquanto células intermediárias em proporções distribuídas de forma constante por todos os grupos de pacientes, e células mucosas sempre em proporções menores. Estes achados apresentam algumas similaridades com os resultados deste estudo que identificou as células escamosas como tipo celular predominante nos tumores de alto grau de malignidade, embora também represente proporção elevada nos tumores de graus baixo e intermediário, no entanto observamos proporção similar de células intermediárias e mucosas nos tumores de baixo grau e somente de células intermediárias nos de grau intermediário. Estes achados também são reforçados por Dardick (1996) que descreve os tumores de baixo grau com proporção elevada e similar de células escamosas e mucosas, e moderada quantidade de células intermediárias, os de grau intermediário com células intermediárias predominantes com ou sem diferenciação escamosa, e os de alto grau com uma mistura de células escamosas pouco diferenciadas e células intermediárias.

Dessa forma, nos parece que os CMEs bem diferenciados de baixo grau de malignidade apresentam da mesma forma os componentes celulares bem distribuídos e

diferenciados, enquanto que aqueles de alto grau de malignidade apresentam principalmente células escamosas pouco diferenciadas de aspecto muitas vezes similar a um carcinoma espinocelular, enquanto os tumores com grau de malignidade intermediário representem, como o nome reflete, um espectro intermediário entre os de baixo e alto graus de malignidade.

O processo de histogênese dos tumores de glândulas salivares baseia-se na unidade acinar-ductal, que resulta em três modelos de desenvolvimento: origem das células luminais, origem das células não-luminais, e uma população mista com uma combinação de células acinares e/ou ductal com células basais e/ou mioepiteliais (Dardick, 1996). Pela grande diversidade celular observada no CME, sua histogênese exata permanece indeterminada e controversa. A maioria dos autores acredita que se origine de células pluripotentes dos ductos excretórios (Eversole, 1971; Batsakis, 1980; Dardick *et al.*, 1990; Loyola *et al.*, 1998; Pires *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004b). A exclusão de uma origem similar ao adenoma pleomorfo e carcinoma adenóide cístico a partir do ducto intercalado é baseada na ausência de diferenciação mioepitelial pelos CMEs (Dardick *et al.*, 1990; Loyola *et al.*, 1998). Além disso, estudo recente realizado por Foschini *et al.* (2002) relata evidências de diferenciação de ducto estriado em CME.

As CKs constituem o maior grupo de filamentos intermediários e têm sido utilizadas para diagnóstico, histogênese, diferenciação e identificação de tipos celulares em tumores de glândulas salivares, especialmente o CME (Araujo & Sousa, 1996; Loyola *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2000; Chu & Weiss, 2002; Foschini *et al.*, 2002; Sobral *et al.*, 2002; Foschini & Eusebi, 2004; Nikitakis *et al.*, 2004; Pires *et al.*, 2004b; Silveira *et al.*, 2006).

No presente estudo as células escamosas apresentaram expressão elevada acima de 50% das CKs 6, 7, 8, 14, 18 e 19, e expressão reduzida da CK 13 (33,3%). A expressão de CK14 nas células escamosas está de acordo com a literatura (Loyola *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2000; Foschini *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2006), no entanto, a expressão de CK13, encontrada neste tipo celular por diferentes autores (Loyola *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2006) apresentou expressão reduzida nas células escamosas (33,3% dos casos) neste estudo. A expressão das CKs 7, 8 e 19 também foi similar àquela

encontrada em estudo realizado por Araujo *et al.* (2000) com 20 casos de CMEs. A expressão da CK17, par da CK6, observada no trabalho de Foschini *et al.* (2002) neste tipo celular foi similar aos achados deste estudo em relação à CK6.

A expressão imunohistoquímica das CKs nas células mucosas apresentou expressão reduzida abaixo de 15% para a maioria dos marcadores, exceto para a CK7, positiva em 46,5% dos casos. Este achado apresenta similaridades com a literatura que também relata expressão de CK7 nas células mucosas (Loyola *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2000; Foschini *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2006), no entanto não se observa neste estudo a expressão elevada concomitante do par de CKs 8/18 (Loyola *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2000; Foschini *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2006), nem de CK19 (Foschini *et al.*, 2002), par da CK7, expressa no presente trabalho.

As células intermediárias apresentaram imunopositividade elevada para a CK7 (61,4%) e imunopositividade moderada para as CKs 6 (40,4%) e 8 (47,4%) neste estudo, similar a literatura que também demonstrou expressão destes marcadores nas células intermediárias (Loyola *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2000; Foschini *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2006). Contudo, este estudo não observou expressão elevada para a CK14, positiva em somente 17,5% dos casos, ao contrário dos trabalhos realizados por Loyola *et al.* (1998), Foschini *et al.* (2002) e Silveira *et al.* (2006), todos positivos para a CK14 em células intermediárias. O trabalho de Loyola *et al.* (1998) analisando dezessete casos de CMEs de glândulas salivares menores relatou positividade intensa para a CK13 nas células intermediárias, em desacordo com este trabalho que revelou positividade para a CK13 em somente 8,8% dos casos de células intermediárias. A expressão da CK 19 foi relatada no trabalho de Loyola *et al.* (1998) e Foschini *et al.* (2002) como moderada, ao contrário deste estudo que apresentou imunopositividade para a CK19 em apenas 22,8% dos casos.

O perfil imunohistoquímico de CKs nas células claras foi de positividade elevada para as CKs 6, 7 e 8, resultado similar ao estudo realizado por Silveira *et al.* (2006) que analisou onze casos de CMEs de glândulas salivares maiores e menores e encontrou positividade moderada de CK7 nas células claras. No entanto, estudo realizado por Loyola *et al.* (1998) encontrou negatividade para todas as CKs estudadas, 7, 8, 10, 13, 14 e 19, nas células claras.

O presente trabalho também avaliou o perfil imunohistoquímico de CKs nas células colunares e encontrou positividade elevada para as CKs 6, 7, 8 e 18. Estes achados encontram similaridades com àqueles observados por Loyola *et al.* (1998) e Foschini *et al.* (2002) que encontraram positividade para as CKs 7, 8 e 18. A CK 17, par da CK6, também apresentou positividade no estudo realizado por Foschini *et al.* (2002), assim como a CK19, que no neste estudo apresentou positividade moderada em 30,4% dos casos. A CK13 apresentou positividade intensa a moderada nos casos avaliados por Loyola *et al.* (1998), enquanto que apresentou positividade reduzida em 17,4% dos casos avaliados nesta pesquisa.

O grau de diferenciação mioepitelial foi objeto de estudo através de análise ultraestrutural, imunofluorescência e imunohistoquímica, na tentativa de esclarecer a real participação das células mioepiteliais nos CME e auxiliar no entendimento de sua histogênese (Kahn *et al.*, 1985; Chaudhry *et al.*, 1989; Hassanin *et al.*, 1989; Dardick *et al.*, 1990; Regezi *et al.*, 1991; Loyola *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 1999; Foschini *et al.*, 2002; Yook *et al.*, 2004).

Este estudo evidenciou a diferenciação mioepitelial através da reação imunohistoquímica positiva para AML em 21,3% dos casos, distribuída de maneira diferenciada entre os tipos celulares encontrados. As células escamosas apresentaram imunopositividade em 19,2% dos casos, as intermediárias em 17,5% dos casos e as colunares em 8,7% dos casos. As células mucosas e claras apresentaram rara imunopositividade com 2,3% e 4,2% dos casos respectivamente. Estes achados apresentaram discordância com trabalho realizado por Loyola *et al.* (1998) que encontrou negatividade nas células tumorais para actina de músculo específico, e rara positividade para vimentina e com o trabalho realizado por Foschini *et al.* (2002) que encontrou negatividade para AML, calponina, caldesmonina e miosina de músculo liso de cadeia pesada, exceto um caso (10%) que apresentou positividade das células intermediárias para a calponina. Prasad *et al.* (1999) em estudo realizado com treze casos de CMEs também encontrou negatividade para os três marcadores de células mioepiteliais utilizados, actina de músculo liso, miosina de músculo liso de cadeia pesada e calponina. Todavia, em trabalho realizado por Hassanin *et al.* (1989) com dezesseis casos de CMEs de glândulas

salivares maiores e menores as células escamosas apresentaram forte imunopositividade para a actina, que variou de fraca a moderada nas células claras e intermediárias, e imunopositividade para a proteína S100 na maioria das células escamosas, intermediárias e claras e em algumas células mucosas. A detecção de diferenciação mioepitelial em células escamosas e intermediárias também foi verificada através de imunofluorescência por este mesmo grupo de pesquisadores (Hassanin *et al.*, 1989). Somado a estes achados da literatura, sugere-se que as células intermediárias representem uma contraparte das células mioepiteliais modificadas encontrada nos adenomas pleomorfos (Dardick *et al.*, 1990), justificando dessa forma algum grau de diferenciação mioepitelial verificado nesta pesquisa, que se encontra em concordância com trabalho realizado por Kahn *et al.* (1985) que observou positividade para a proteína S100 nas células intermediárias e mais raramente nas células mucosas.

A diferenciação mioepitelial em células neoplásicas de CME não pode ser considerada inexistente, visto que diferentes trabalhos já demonstraram algum grau de diferenciação mioepitelial em CME através de diferentes metodologias, como análise ultraestrutural, reações imunohistoquímica e de imunofluorescência, em material parafinado ou em cultura de tecidos (Kahn *et al.*, 1985; Chaudhry *et al.*, 1989; Hassanin *et al.*, 1989; Dardick *et al.*, 1990; Regezi *et al.*, 1991; Loyola *et al.*, 1998; Yook *et al.*, 2004). As divergências encontradas entre este estudo e alguns trabalhos da literatura, que descrevem a diferenciação mioepitelial como mínima ou ausente provavelmente residem nos critérios de identificação utilizados, na maioria dos casos abrangendo as diferentes células neoplásicas do CME como um todo e não individualmente.

A expressão imunohistoquímica de CKs também apresentou variação de acordo com o padrão morfológico de crescimento, em que os ninhos tumorais sólidos apresentaram positividade elevada para a CK6 (53,5% dos casos), além das CKs 7, 8 e 18 que também apresentaram positividade elevada nas ilhas císticas e/ou ductais. Estes achados apresentaram algumas similaridades com o trabalho realizado por Silveira *et al.* (2006) que também demonstrou positividade para as CKs 7 e 8 em ambos os padrões de crescimento neoplásico, porém sem a avaliação da imunoexpressão das CKs 6 e 18 como na presente pesquisa. Neste trabalho verificamos positividade moderada para as CKs 14 e 19 no padrão

de crescimento sólido, achado similar ao verificado por Silveira *et al.* (2006) cujo padrão de expressão de CK14 foi altamente positivo nas ilhas neoplásicas sólidas.

Ao correlacionar a gradação histológica e a expressão imunohistoquímica das CKs e AML verificamos que todos os graus histológicos de malignidade apresentaram perfil imunohistoquímico similar, exceto pela AML. Os tumores classificados como de alto grau de malignidade apresentaram expressão elevada de todas as CKs, exceto pela CK13 que apresentou expressão imunohistoquímica moderada em 33,3% dos casos, e a diferenciação mioepitelial, observada em somente 27,8% dos casos. Os tumores de grau intermediário de malignidade também apresentaram expressão imunohistoquímica elevada para as CKs 6, 7, 8 e 14 e moderada para as CKs 13, 18 e 19 e para a AML, positiva em 33,3% dos casos. Os tumores de baixo grau de malignidade mostraram perfil imunohistoquímico similar aos de alto grau, apresentando positividade elevada para todas as CKs, exceto pela 13 que foi positiva em 42,9% dos casos, e a diferenciação mioepitelial que foi evidente em somente 11,4% dos casos. Estes achados reforçaram os descritos por Silveira *et al.* (2006) que mostraram perfil imunohistoquímico similar entre todos os graus histológicos de malignidade dos 11 casos de CMEs avaliados.

No tecido glandular normal, a CK18 apresentou positividade elevada em todos os componentes luminais, ácinos e células ductais, assim como a CK8, porém em menor proporção, achados comparáveis aos relatados na literatura que caracterizam as CKs 8 e 18 como principais marcadores luminais (Araujo & Sousa, 1996; Loyola *et al.*, 1998; Foschini & Eusebi, 2004; Silveira *et al.*, 2006). A CK7 também apresentou positividade em todas as células luminais, além de 35,5% das células basais dos ductos excretores e 10% das células mioepiteliais, achado similar ao encontrado por Foschini *et al.* (2002), no entanto com algumas divergências com os trabalhos de Araujo & Sousa (1996), Loyola *et al.* (1998) e Silveira *et al.* (2006) que não observaram esta positividade nas células mioepiteliais. A CK19 apresentou imunopositividade elevada somente para as células luminais ductais, achado verificado por Loyola *et al.* (1998) e Foschini *et al.* (2002), que também encontraram rara positividade para as células acinares. A CK6 mostrou perfil similar ao da CK19, achado não verificado no trabalho de Foschini *et al.* (2002) e Martins *et al.* (2002) que não observaram positividade para as CKs 16 e 17 respectivamente, ambas CKs que

apresentam pareamento com a CK6. A CK13 apresentou positividade elevada somente nas células luminais do ducto estriado, enquanto que a CK14 apresentou imunopositividade elevada nas células basais do ducto excretor e moderada nas células mioepiteliais. Em estudo realizado por Loyola *et al.* (1998) a expressão de CK14 foi similar, no entanto a de CK13 foi divergente não apresentando positividade elevada em nenhuma estrutura glandular normal (Loyola *et al.*, 1998). Os achados de Silveira *et al.* (2006) verificaram que a CK14 apresentava positividade somente nas células mioepiteliais, sem evidências de marcação ductal, no entanto verificou positividade para a CK13 nas células luminais ductais de maneira similar aos nossos achados. Durante o desenvolvimento das glândulas salivares menores, a expressão de CKs se mostra similar aos nossos achados pós-desenvolvimento, exceto pela CK13, não expressa em nenhuma estrutura glandular normal em desenvolvimento (Martins *et al.*, 2002).

De forma resumida, em nosso trabalho verificamos que as CKs apresentaram algum grau de imunopositividade nos diferentes tipos celulares encontrados nos CMEs, num padrão de expressão similar ao encontrado nos ductos excretores das glândulas salivares normais. A diferenciação mioepitelial foi menos comumente observada, entretanto não deve ser considerada ausente ou inexistente nos CMEs.

## 7. CONCLUSÕES:

1. A expressão imunohistoquímica de diferentes CKs dependente do tipo celular e em menor proporção de AML, similar ao imunofenótipo dos ductos excretores, reforça o conceito de uma origem a partir de células indiferenciadas pluripotentes localizadas nos ductos excretores das glândulas salivares normais.

2. A diferenciação mioepitelial não pode ser considerada ausente nos CMEs, e foi encontrada especialmente nas células escamosas e intermediárias, principalmente nos tumores de grau alto (27,8%) e intermediário (33,3%) de malignidade nos quais supostamente há maior perda de diferenciação celular, assemelhando-se às células pluripotentes.

3. Os tumores de baixo grau de malignidade apresentaram distribuição homogênea de células escamosas, intermediárias e mucosas; os de grau intermediário prevalência de células escamosas e intermediárias; e os de alto grau maior proporção de células escamosas. As células claras e colunares foram observadas sempre em menor frequência.

4. A expressão imunohistoquímica das CKs variou de acordo com as células analisadas: as células escamosas apresentaram imunopositividade elevada para as CKs 6, 7, 8, 14, 18 e 19; as células intermediárias elevada para a CK7 e moderada para as CKs 6 e 8; as células mucosas elevada somente para a CK7; as células claras elevada para as CKs 6, 7 e 8; e as células colunares elevada para as CKs 6, 7, 8 e 18.

5. A expressão imunohistoquímica das CKs variou de acordo com o padrão morfológico de crescimento neoplásico: o padrão cístico/ ductal apresentou maior expressão das CKs 7, 8 e 18; e o padrão sólido das CKs 6, 7, 8 e 18.

6. A expressão imunohistoquímica das CKs foi similar em todos os graus histológicos de malignidade.

## REFERÊNCIAS\*:

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Citoesqueleto. *In*: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, editores. *Biologia Molecular da Célula*. 4<sup>a</sup> ed. New York: Garland Publishing; 2004 p.907-982.

de Araujo VC, de Sousa SOM, Jaeger RG, de Araujo NS. Immunohistochemical study of malignant salivary tumors. An analysis of 67 cases. *Rev Odontol USP*. 1991 Jan/Jun; 5(1): 37-42.

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

de Araujo VC, de Sousa SO, Carvalho YR, de Araujo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2000 Sep; 8(3): 195-202.

Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands: evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer*. 1992 Apr 15; 69:2021-30.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics – Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press; 2005.

Batsakis JG. Salivary gland neoplasia: an outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980 Mar; 49(3): 229-32.

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

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

---

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Bouquot JE, Gnepp DR, Dardick I, Hietanem JH. Intraosseous salivary tissue: jawbone examples of choristomas, hamartomas, embryonic rests, and inflammatory entrapment – Another histogenetic source for intraosseous Adenocarcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Aug; 90(2): 205-17.

Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A *et al.* Mucoepidermoid Carcinoma. A clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol.* 2001 Jul; 25(7): 835-45.

Brannon RB, Willard CC. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma of parotid gland origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Dec; 96(6): 727-33.

Chaudhry AP, Cutler LS, Liefer C, Labay G. Ultrastructural study of the histogenesis of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1989 Aug; 18(7): 400-9.

Chen SY. Ultrastructure of mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1979 Mar; 47(3): 247-55.

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

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

Clarke C, Sandle J, Lakhani SR. Myoepithelial Cells: pathology, cell separation and markers of myoepithelial differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005 Jul; 10(3): 273-80.

Coulombe PA, Omary MB. “Hard” and “soft” principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin in Cell Biol.* 2002 Feb; 14(1): 110-22.

da Cruz Perez DE, Pires FR, Alves FA, Almeida OP, Kowalski LP. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2004 Jul; 68(7): 895-902.

Dale, AC. Salivary Glands, *In: Ten Cate AR, editor. Oral Histology – Development, structure and function.* 4<sup>th</sup> ed. St Louis: Mosby; 1994 p.356-88.

Dardick I, Daya D, Hardie J, van Nostrand AWP. Mucoepidermoid carcinoma: ultrastructural and histogenetic aspects. *J Oral Pathol.* 1984 Aug; 13(4): 342-58.

Dardick I, Rippstein P, Skimming L, Boivin M, Parks WR, Dairkee SW. Immunohistochemistry and ultrastructure of myoepithelium and modified myoepithelium of the ducts of human major salivary glands: histogenetic implications for salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987 Dec; 64(6): 703-15.

Dardick I, Gliniecki MR, Heathcote JG, Burford-Mason A. Comparative histogenesis and morphogenesis of mucoepidermoid carcinoma and pleomorphic adenoma. An ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1990; 417(5): 405-17.

Dardick I. *Color Atlas/ Text of Salivary Gland Pathology.* New York: Igaku – Shoin Medical Publishers, 1996.

Deveci MS, Deveci G, Günhan O, Finci R. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: report of a case with DNA ploidy analysis and review of the literature. *Pathol Int.* 2000 Nov; 50(11):905-9.

Ellis GL, Auclair PL. *Tumors of the Salivary Glands - Atlas of Tumor Pathology.* 3<sup>rd</sup> Series, Fascicle 17. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.

Ellis GL. Clear cell neoplasm in salivary glands: clearly a diagnostic challenge. *Ann Diagn Pathol.* 1998 Feb; 2(1):61-78.

Eversole LR. Histogenic classification of salivary tumors. *Arch Pathol.* 1971 Dec; 92(6): 433-43.

Foschini MP, Scarpellini F, Gown AM, Eusebi V. Differential expression of myoepithelial markers in salivary, sweat and mammary Glands. *Int J Surg Pathol.* 2000 Jan; 8(1): 29-37.

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

Foschini MP, Eusebi V. Value of immunohistochemistry in the diagnosis of salivary gland tumors. *Pathology Case Reviews.* 2004 Nov/Dec; 9(6): 270-75.

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

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

Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of major salivary glands – Clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer*. 1998 Apr; 82(7): 1217-24.

Gustafsson H, Kjorell U, Eriksson A, Virtanen I, Thornell LE. Distribution of intermediate filament proteins in developing and adult salivary glands in man. *Anat Embryol (Berl)*. 1988; 178(3): 243-51.

Guzzo M, Andreola S, Sirizzotti G, Canto G. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: clinicopathologic review of 108 patients treated at the National Cancer Institute of Milan. *Ann Surg Oncol*. 2002 Aug; 9(7): 688-95.

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

Hassanin MB, Ghosh L, Das AK, Waterhouse JP. Immunohistochemical and fluorescent microscopic study of histogenesis of salivary mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1989 May; 18(5): 291-8.

Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Jul; 34(5): 533-6.

Kahn HJ, Baumal R, Marks A, Dardick I, van Nostrand AW. Myoepithelial cells in salivary gland tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 1985 Feb; 109(2): 190-5.

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

Lopes MA, Kowalski LP, da Cunha Santos G, Paes de Almeida O. A clinicopathologic study of 196 intraoral minor salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med*. 1999 Jul; 28(6): 264-7.

Lopes MA, da Cruz Perez DE, de Abreu Alves F, de Almeida OP, Kowalski LP. Clinicopathologic and immunohistochemical study of intraoral mucoepidermoid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Apr; 134(4): 622-6.

Loyola AM, Araujo VC. Carcinoma Mucoepidermóide: estudo clínico e histológico. *RPG.* 1996 Abr/Mai/Jun; 3(2): 115-121.

Loyola AM, de Sousa SO, Araujo NS, Araujo VC. Study of minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma differentiation based on immunohistochemical expression of cytokeratins, vimentin and muscle-specific actin. *Oral Oncol.* 1998 Mar; 34(2): 112-8.

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

Maiorano E, Altini M, Favia G. Clear cell tumors of the salivary glands, jaws and oral mucosa. *Semin Diagn Pathol.* 1997 Aug; 14(3): 203-12.

Martins MD, Cavalcanti de Araujo V, Raitz R, Soares de Araujo N. Expression of cytoskeletal proteins in developing human minor salivary glands. *Eur J Oral Sci.* 2002 Aug; 110(4): 316-21

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

Morinaga S, Nakajima T, Shimosato Y. Normal and neoplastic myoepithelial cells in salivary glands: an immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 1987 Dec; 18(12): 1218-26.

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

Otoh EC, Johnson NW, Olasoji H, Danfillo IS, Adeleke OA. Salivary gland neoplasm in Maiduguri, north-eastern Nigeria. *Oral Dis.* 2005 Nov; 11(6): 386-91.

Pelissier A, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Changes in cytokeratin expression during the development of the human oral mucosa. *J Periodontal Res.* 1992 Nov; 27(6): 588-98.

Pia-Foschini M, Reis-Filho JS, Eusebi V, Lakhani SR. Salivary gland-like tumours of the breast. *J Clin Pathol*. 2003 Jul; 56(7): 497-506.

Pires FR, Alves FA, de Almeida OP, Kowalski LP. Carcinoma mucoepidermóide de cabeça e pescoço: estudo clínico-patológico de 173 casos. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2002 Set/Out; 68(5): 679-684.

Pires FR, Paes de Almeida O, Lopes MA, Elias da Cruz Perez D, Kowalski LP. Central mucoepidermoid carcinoma of the mandible: report of four cases with long-term follow-up. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Aug; 32(4): 378-82.

Pires FR, de Almeida OP, de Araujo VC, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004a Feb; 130(2): 174-80.

Pires FR, Chen S-Y, Perez DEC, Almeida OP, Kowalski LP. Cytokeratin expression in central mucoepidermoid carcinoma and glandular odontogenic cyst. *Oral Oncol*. 2004b May; 40(5): 545-51.

Pires FR, Pringle GA, de Almeida OP, Chen S-Y. Intra-oral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 546 cases. *Oral Oncol*. No prelo 2006.

Prasad AR, Savera AT, Gown AM, Zarbo RJ. The myoepithelial immunophenotype in 135 benign and malignant salivary gland tumors other than pleomorphic adenoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1999 Sep; 123(9): 801-6.

Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Stavrianos SD, Faratzis G, Lagogiannis GA *et al*. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. *Oral Oncol*. 2007 Feb; 43(2): 130-6.

Regezi JA, Zarbo RJ, Batsakis JG. Immunoprofile of mucoepidermoid carcinomas of minor salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991 Feb; 71(2): 189-92.

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

Sawaf MH, Ouhayoun JP, Forest N. Cytokeratin profiles in oral epithelia: a review and a new classification. *J Biol Buccale*. 1991 Sep; 19(3): 187-98.

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

da Silveira EJ, Veras Barros SS, de Amorim RF, Queiroz LM, Freitas R de A, de Souza LB. Cytokeratin profile in mucoepidermoid carcinoma is not related to its histological grading of malignancy. Exp Mol Pathol. 2006 Aug; 81(1): 72-6.

Sobral AP, Loducca SV, Kowalski LP, Santos IR, Almeida OP, Araujo NS *et al.* Immunohistochemical distinction of high-grade mucoepidermoid carcinoma and epidermoid carcinoma of the parotid region. Oral Oncol. 2002 Jul; 38(5): 437-40.

Spiro RH, Huvos AG, Berk R, Strong EW. Mucoepidermoid Carcinoma of salivary gland origin – A clinicopathologic study of 367 cases. Am J Surg. 1978 Oct; 136(4): 461-8.

Stewart FW, Foote FW, Becker WF. Mucoepidermoid tumors of salivary glands. Ann Surg. 1945; 122: 820-44.

Sun TT, Tseng SC, Huang AJ, Cooper D, Schermer A, Lynch MH *et al.* Monoclonal antibody studies of epithelial keratins: a review. Ann N Y Acad Sci. 1985; 455: 307-29.

Terada T, Ikeuchi S, Inomoto C, Shimamura K. Mucoepidermoid carcinoma of the palate composed exclusively of clear cells (clear cell variant). Virchows Arch. 2004 Nov; 445(5): 541-3.

di Tomaso L, Foschini MP, Ragazzini T, Magrini E, Fornelli A, Ellis IO *et al.* Mucoepidermoid carcinoma of the breast. Virchows Arch. 2004 Jan; 444(1):13-9.

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

Yih WY, Kratochvil FJ, Stewart JC. Intraoral minor salivary gland neoplasms: review of 213 cases. J Oral Maxillofac Surg. 2005 Jun; 63(6): 805-10.

Yook JI, Lee SA, Chun YC, Huh J, Cha IH, Kim J. The myoepithelial cell differentiation of mucoepidermoid carcinoma in a collagen gel-based coculture model. J Oral Patol Med. 2004 Apr; 33(4): 237-42.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



**CERTIFICADO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise imunohistoquímica da expressão de citoqueratinas e marcadores mioepiteliais e sua distribuição nos carcinomas mucoepiteliais de glândulas salivares maiores e menores em suas diferentes graduações histológicas", protocolo nº **029/2006**, dos pesquisadores **REBECA DE SOUZA AZEVEDO** e **FABIO RAMÔA PIRES**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 19/04/2006.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Immunohistochemical analysis of cytokeratin and myoepithelial markers expression and salivary glands mucoepithelioid carcinomas" distribution in different histologic grading", register number **029/2006**, of **REBECA DE SOUZA AZEVEDO** and **FABIO RAMÔA PIRES**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 19/04/2006.

  
**Prof. Cecilia Gatti Guirado**  
Secretária  
CEP/FOP/UNICAMP

  
**Prof. Jacks Jorge Junior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

**Anexo:**