

LEANDRO LUIZ LOPES DE FREITAS

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica do aluno Leandro Luiz Lopes de Freitas.

Campinas, 09 de março de 2006.


Prof. Dra. Albina Messias de Almeida
Milani Altemani
Orientadora.

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS AO CICLO CELULAR
(p53, Ki-67, bcl-2 e c-erbB-2) NA TRANSFORMAÇÃO
MALIGNA DO ADENOMA PLEOMÓRFICO DE
GLÂNDULA SALIVAR**

CAMPINAS

2006

**BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP**

LEANDRO LUIZ LOPES DE FREITAS

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS AO CICLO CELULAR
(p53, Ki-67, bcl-2 e c-erbB-2) NA TRANSFORMAÇÃO
MALIGNA DO ADENOMA PLEOMÓRFICO DE
GLÂNDULA SALIVAR**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração
Anatomia Patológica*

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F884a Freitas, Leandro Luiz Lopes de
Análise imunoistoquímica de proteínas relacionadas ao ciclo celular (p53, Ki-67, bcl-2, e c-erbB-2) na transformação maligna do adenoma pleomórfico de glândula salivar / Leandro Luis Lopes de Freitas. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Albina Messias Almeida Milani Altemani
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Adenoma pleomorfo. 2. Tumor misto maligno. 3. Glândula salivar. 4. P53. 5. Proteína c- erbB-2. 6. Proteínas do ciclo celular. I. Altemani, Albina Messias Almeida Milani. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(Sln/fcm)

Título em inglês: *Immunohistochemical analysis of cell-cycle related proteins (p53, Ki-67, bcl-2 and c-erbB-2) in the malignant transformation of pleomorphic adenoma of salivary glands*

Keywords: •Pleomorphic adenoma

- Malignant mixed tumor
- Salivary gland
- Immunohistochemistry
- p53 tumor suppressor proteins
- Cell cycle proteins
- c-erbB-2 protein

Área de concentração: Anatomia Patológica

Titulação: Doutorado em Ciências Médicas

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	F884a
V	
TOMBO	69752
PROC.	16-P.00123-06
C	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	24/08/06
Nº CPD	

Bib id 385633

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Albina Messias Almeida Milani Altemani

Prof. Dr. Athanase Billis

Profa. Dra. Liliana Aparecida Lucci De Ângelo Andrade

Prof. Dr. Antonio Carlos Oliveira de Meneses

Profa. Dra. Cristiane Furuse

Data de Defesa: 09/03/2006

DEDICATÓRIA

À minha esposa Mariana,
pelo carinho, dedicação e companheirismo
cada vez maiores.

Aos meus pais,
exemplos de honestidade e perseverança.

À Profa. Dra. Albina Altemani,
mais do que uma orientadora,
um exemplo de profissional a ser seguido.

Aos meus professores de patologia da
Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro
(Meneses, Marcus e Sheila):
o início de tudo...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me dado saúde para lutar pelos meus sonhos!

Aos Professores e amigos Miriam Trevisan e José Vassallo, pela confiança em mim depositada desde o início.

Às equipes dos laboratórios de imunoistoquímica do Laboratório de Patologia Experimental/CAISM e Laboratório MULTIPAT, que tanto empenho tiveram para que as reações imunoistoquímicas se tornassem realidade, em especial Júlio Cesar, Cristiano Chagas, Elaine Betim e Priscila Juliano.

Às Dras. Vera Araújo e Marília Martins e à equipe do Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da USP - São Paulo, pelo auxílio técnico na realização de parte deste trabalho e pelo incentivo na busca de novos conhecimentos.

Aos Professores Luciano Queiroz e Liliana Andrade, pelo apoio e disponibilização de tempo e material no desenvolvimento deste projeto.

Aos funcionários Maria do Carmo, Elizabeth Justi e Adilson Piazza, pela paciência e atenção nesta longa caminhada.

Aos demais docentes, médicos assistentes, médicos residentes e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da FCM/UNICAMP, pela amizade e respeito sempre constantes.

Aos meus tios Ademar e Maristela. Sem vocês o caminho teria sido mais difícil! Muito obrigado.

“A Palavra se faz carne...”

Rubem Alves

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
1- INTRODUÇÃO	37
1.1- Histologia, anatomia e histogênese dos tumores de glândula salivar	39
1.2- Aspectos clínicos do AP e do CXAP	43
1.3- Aspectos anatomopatológicos do AP e do CXAP	46
1.3.1- Aspectos macroscópicos.....	46
1.3.2- Aspectos microscópicos.....	47
1.4- Patogênese do CXAP	50
1.4.1- p53.....	50
1.4.2- c-erbB-2.....	51
1.4.3- Ki-67.....	52
1.4.4- Bcl-2.....	53
2- JUSTIFICATIVA	55
3- OBJETIVOS	59
3.1- Objetivo geral	61
3.2- Objetivos específicos	61
4- MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	65
4.2- Informações clínicas e epidemiológicas	65

4.3- Grupos de estudo.....	65
4.3.1- CXAP.....	65
4.3.2- AP.....	66
4.4- Análise morfológica.....	66
4.5- Reação imunoistoquímica.....	66
4.6- Análise imunoistoquímica.....	69
4.6.1- p53 e Ki-67.....	69
4.6.2- c-erbB-2.....	70
4.6.3- bcl-2.....	71
4.7- Análise estatística.....	71
5- RESULTADOS.....	73
5.1- Grupo controle.....	76
5.1.1- Análise morfológica.....	76
5.1.2- Análise imunoistoquímica.....	77
5.2- Carcinomas precoces.....	78
5.2.1- Análise morfológica.....	78
5.2.2- Análise imunoistoquímica.....	78
5.3- Carcinomas francamente invasivos.....	90
5.3.1- Análise morfológica.....	90
5.3.2- Análise imunoistoquímica.....	92
6- DISCUSSÃO.....	97
6.1- CXAPs em fase precoce de malignização	100
6.1.1- Critérios morfológicos e proliferação celular.....	100

6.1.2- Marcadores moleculares (p53, c-erbB-2, bcl-2).....	102
6.1.2.1- p53.....	102
6.1.2.2- c-erbB-2.....	105
6.1.2.3- bcl-2.....	107
6.2- CXAPs francamente invasivos.....	108
6.2.1- Critérios morfológicos e proliferação celular.....	108
6.2.2- Marcadores moleculares (p53, c-erbB-2 e bcl-2).....	110
6.2.2.1- p53.....	110
6.2.2.2- c-erbB-2.....	113
6.2.2.3- bcl-2.....	113
7- CONCLUSÕES.....	115
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ácino
AP	Adenoma Pleomórfico
APs	Adenomas Pleomórficos
CAC	Carcinoma Adenóide-Cístico
CEM	Carcinoma Epitelial-Mioepitelial
CMi	Carcinoma Mioepitelial
CSa	Carcinoma Sarcomatóide
CXAP	Carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico
CXAPs	Carcinomas ex-Adenomas Pleomórficos
DAB	Diaminobenzidina
DAP	Departamento de Anatomia Patológica
E	Ducto Excretor
GS	Glândulas Salivares
HE	Hematoxilina e Eosina
I	Ductos Intercalados
Mdm2	Mouse double minute 2
PBS	Phosphate buffer saline
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
S	Ductos Estriados
SG	Glândula Sebácea
s.o.e.	Sem outra especificação

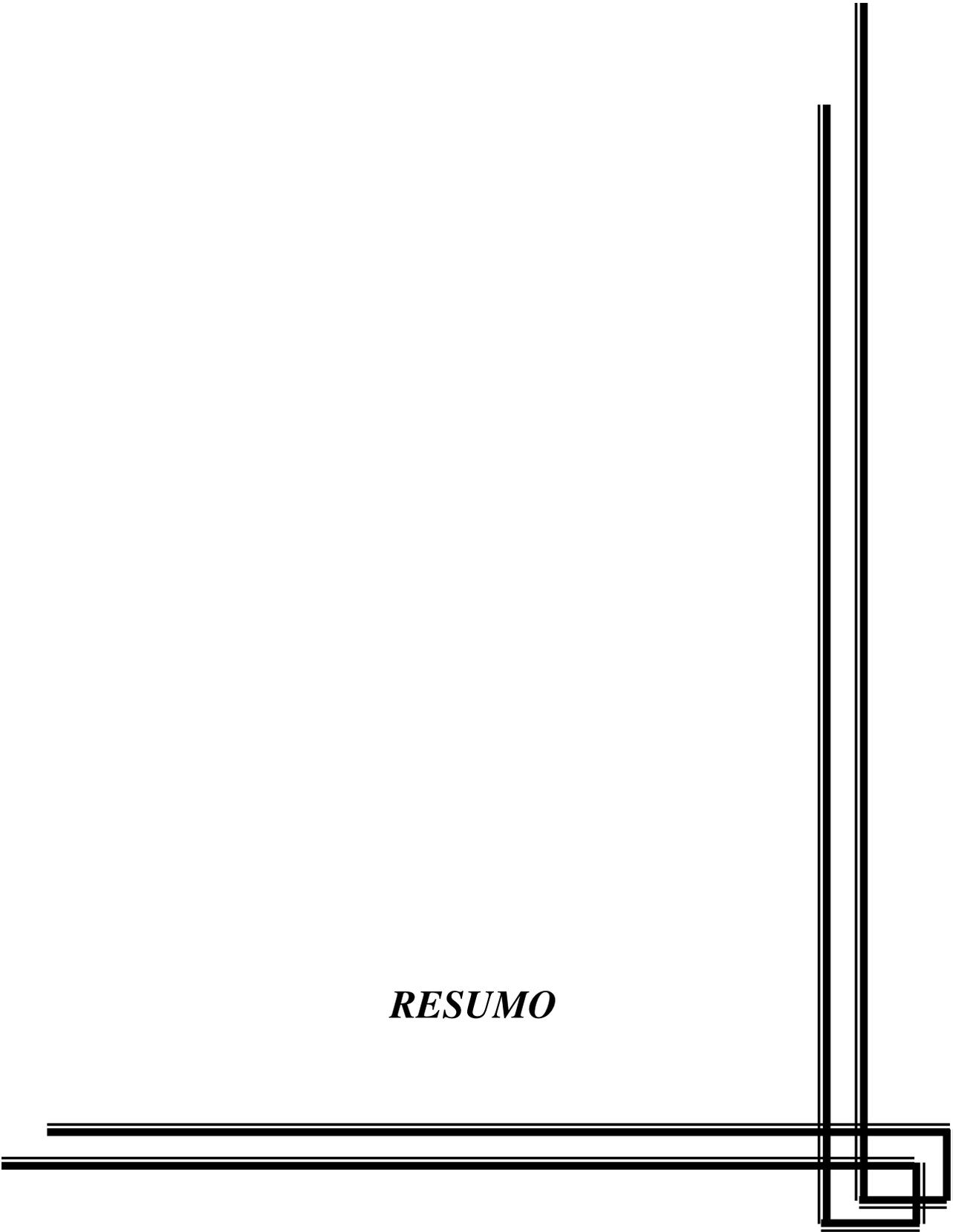
	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Relação de anticorpos primários utilizados, diluição e controles externos positivos.....	68
Tabela 2 CXAP: sexo, idade, glândula acometida e critérios morfológicos em áreas benignas e malignas.....	76
Tabela 3 Grupo controle: sexo, idade, glândula acometida, critérios morfológicos e imunoistoquímicos.....	77
Tabela 4 CXAP - marcadores imunoistoquímicos. Comparação entre áreas benignas e malignas.....	88
Tabela 5 Correlação entre as áreas benignas e malignas dos CXAPs precoces e o grupo controle.....	89
Tabela 6 Correlação entre as áreas benignas e malignas dos CXAPs francamente invasivos e o grupo controle.....	91

		<i>Pág.</i>
Figura 1	Similaridades morfológicas entre alguns tumores de GS e as diferentes estruturas das GS. A-ácino, I-ducto intercalado, S-ducto estriado, E-ducto excretor, SG-glândula sebácea.....	39
Figura 2	Estrutura túbulo-acinar das GS - sistema secretor. S-ducto estriado, I-ducto intercalado.....	41
Figura 3	Exemplo de utilização do programa ImageLab-2000®. À esquerda, imagem capturada sem ser trabalhada. À direita, imagem com núcleos marcados com pontos brancos (positivos- seta azul) e pretos (negativos- seta preta). No círculo, quantidade de células positivas e negativas.....	70
Figura 4	CXAP intracapsular (3430/99). A- adenoma pleomórfico com área maligna assinalada (círculo); B- zona de transição entre as áreas benigna e maligna; C- área benigna; D- área maligna (HE).....	79
Figura 5	CXAP minimamente invasivo (8899/98). A- área benigna sem atipias citológicas. B- área maligna com intensas atipias citológicas em meio a estroma mixocondróide. C, D e E- pormenores de áreas malignas (HE).....	80
Figura 6	A, B e C- CXAP minimamente invasivo (27907), mostrando dupla população celular proliferada: luminal (seta simples) e mioepitelial (seta dupla) (HE).....	81
Figura 7	CXAP intracapsular (3430/99)- dupla coloração para vimentina (corada em vermelho) e p53 (corado em marrom), mostrando negatividade para p53 na área benigna (figura A) e positividade em células luminas da área maligna (figura B). Células mioepiteliais (coradas em vermelho) negativas para p53.....	81

- Figura 8** CXAP minimamente invasivo (8899/98)- expressão imunoistoquímica de p53. Raras células luminais positivas na área benigna (**A**- seta, e **C**) e numerosas na maligna (**B** e **D**). **Figuras C e D** com dupla marcação imunoistoquímica para p53 (marrom) e vimentina (vermelha), realçando a positividade de p53 nas células luminais e negatividade nas mioepiteliais (coradas em vermelho)..... 82
- Figura 9** CXAP minimamente invasivo (27907), mostrando dupla população celular proliferada com positividade imunoistoquímica nuclear para p53, tanto em células luminais (seta simples, figuras **A, B** e **C**) quanto em mioepiteliais (seta dupla, **figuras A a D**), o que fica mais evidente à dupla marcação imunoistoquímica para p53 (marrom) e vimentina (vermelha), nas **figuras C e D**..... 83
- Figura 10** células positivas para Ki-67 (clone MIB-1) tanto nas áreas de adenoma pleomórfico residual (**figuras A e B**, caso 62586), inclusive em células mioepiteliais (**B**), como nas áreas malignas de CXAP (**figuras C e D**, caso 8899/98)..... 84
- Figura 11** CXAP intracapsular (3430/99): c-erbB-2 positivo na área maligna (área circulada na **figura A** e em destaque na **figura B**, metade esquerda da **figura C** e **figura D**, com positividade de membrana forte e contínua – 3+) e negativo na benigna (**figura E**)..... 85
- Figura 12** CXAP minimamente invasivo (8899/98) com forte expressão imunoistoquímica de c-erbB-2. **A**- visão panorâmica, com mistura de áreas positivas (malignas) e negativas (benignas). **B**- pormenor de área maligna ainda mantendo a camada externa de células mioepiteliais negativa para c-erbB-2 (setas simples). **C**- forte positividade de membrana e contínua (3+) em área maligna..... 86

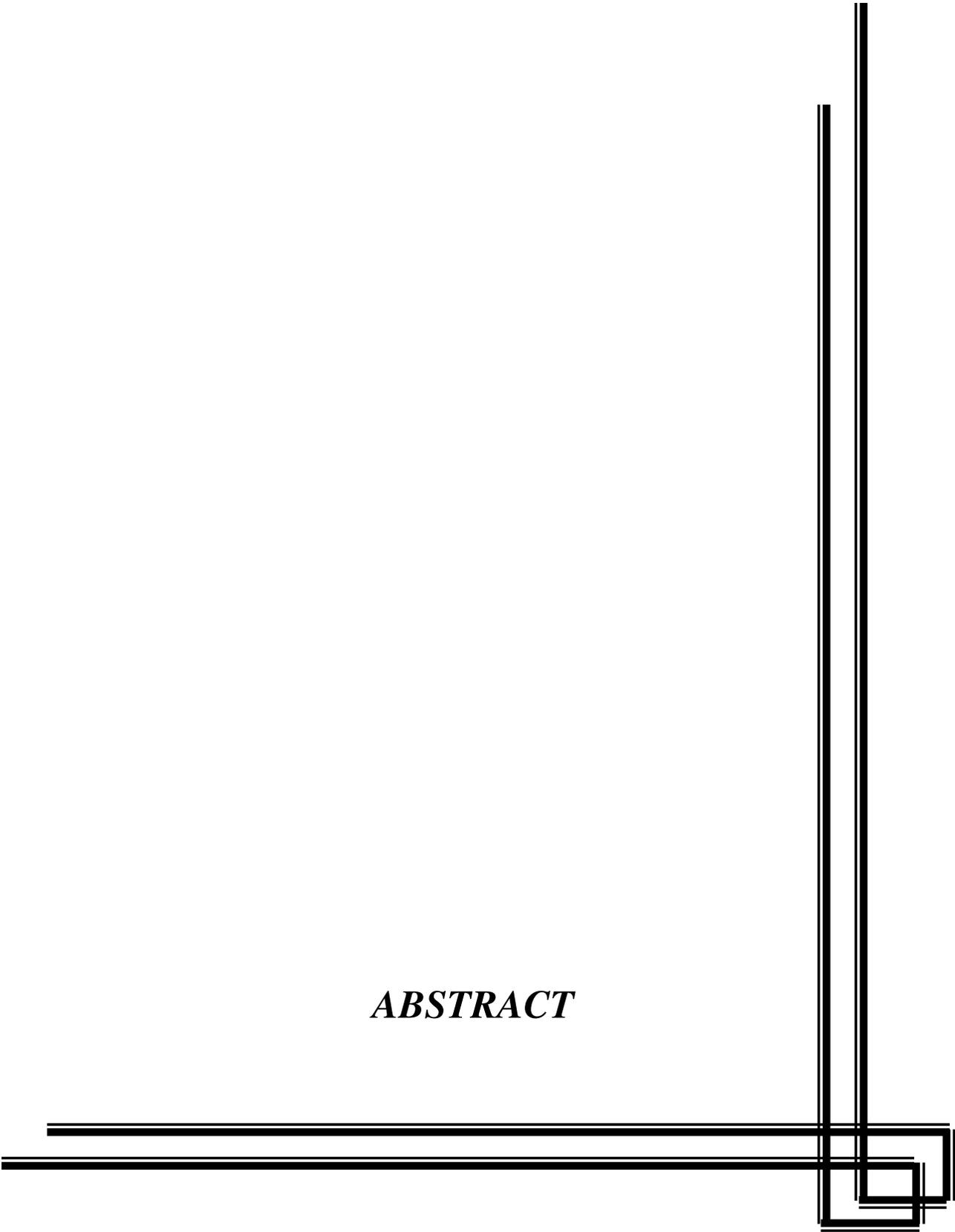
Figura 13	CXAP intracapsular (3430/99)- expressão de bcl-2 (corado em marrom) em células mioepiteliais de área benigna (figura A) e maligna (figura B).....	87
Figura 14	CXAP francamente invasivo (1164/01): áreas benigna (A) e maligna (B, C e D) sem atipias citológicas importantes, com invasão perineural (n- figura C) e do tecido adiposo (a) vizinho (figura D , coloração: HE).....	93
Figura 15	A- CXAP francamente invasivo (45988) com diferenciação mioepitelial única (carcinoma mioepitelial) (HE). B- dupla marcação imunoistoquímica para p53 e vimentina (corada em vermelho), com negatividade para p53.....	94
Figura 16	CXAP francamente invasivo (1164/01)-dupla marcação imunoistoquímica para vimentina (corada em vermelho) e p53 (corado em marrom). A- raras células luminais positivas para p53 (setas). B- várias células positivas para p53 na área maligna, tanto luminais (predominantes) quanto mioepiteliais (marcadas em vermelho, seta).....	94
Figura 17	CXAPs francamente invasivos. A- carcinoma com diferenciação luminal exclusiva, c-erbB-2-positivo (12079/96). B- carcinoma epitelial-mioepitelial (1164/01) com negatividade imunoistoquímica para c-erbB-2.....	95
Figura 18	CXAP francamente invasivo (1164/01) com positividade imunoistoquímica em células mioepiteliais para proteína bcl-2 (n- nervo infiltrado pela neoplasia).....	95

RESUMO



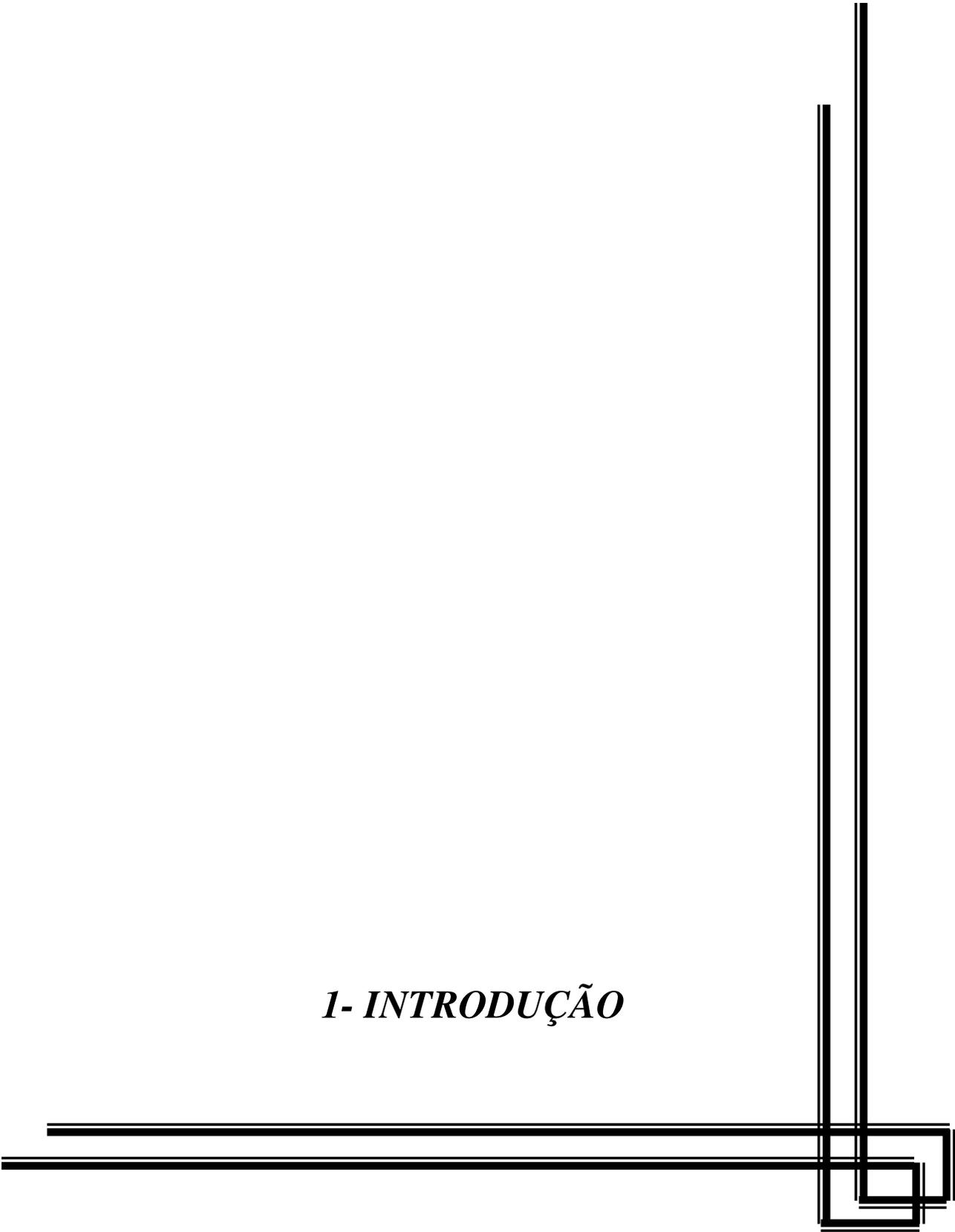
O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia mais freqüente das glândulas salivares e o carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) é a sua forma de transformação maligna mais comum. Os trabalhos da literatura com séries exclusivas de CXAP são poucos e englobam, em sua maioria, carcinomas já em estádios avançados. Raros são os estudos realizados exclusivamente com tumores que apresentam os dois componentes (benigno e maligno) e em fases iniciais de malignização. Alterações nos genes p53 e c-erbB-2 parecem ser as principais vias envolvidas nesta transformação. Estas proteínas, além do marcador de proliferação celular Ki-67, podem ser importantes critérios no diagnóstico do CXAP, especialmente em sua fase precoce. O objetivo deste trabalho foi avaliar retrospectivamente a expressão imunohistoquímica de marcadores celulares (p53, c-erbB-2, Ki-67 e bcl-2, uma proteína antiapoptótica) em CXAP em diferentes fases de malignização (4 intracapsulares, 4 minimamente invasivos e 7 francamente invasivos), nas áreas benignas e malignas e em AP que não sofreram malignização (17 casos - grupo controle). A parótida foi a glândula mais acometida em ambos os grupos (CXAP 53%, grupo controle 88%), envolvendo mais mulheres que homens. A idade média dos pacientes com CXAP em qualquer fase evolutiva (63,3 anos) foi maior que no grupo controle (35,6 anos). A proteína p53 foi mais expressa nas áreas malignas (em média 35,71% nos CXAP precoces e 8,11% nos CXAP francamente invasivos, versus 12,76% e 4,58% nas áreas benignas, respectivamente) e principalmente em células luminais, enquanto os menores valores foram encontrados no grupo controle (1,71%). Fato semelhante ocorreu com o índice mitótico e a expressão de Ki-67. A expressão de c-erbB-2 foi observada quase que exclusivamente em células malignas com diferenciação luminal. A proteína bcl-2 teve positividade fraca e focal. Concluímos que as proteínas p53 e c-erbB-2 parecem estar envolvidas na transformação maligna do AP, já em fases precoces, sendo critérios mais objetivos do que a simples avaliação morfológica para o diagnóstico dos CXAP intracapsulares.

ABSTRACT



Pleomorphic adenoma (PA) is the commonest salivary gland tumor, and carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA) is its most frequent malignant counterpart. There are few studies centering on CXPA only and most have been performed in frankly invasive carcinomas. Series of CXPA containing both morphological components (adenoma and carcinoma) at an early stage of carcinomatous transformation are extremely rare. p53 and c-erbB-2 appear to be the most important genes involved in this malignant change. These proteins, and the proliferative index marker Ki-67, could be valuable criteria for diagnosis of CXPA, specially at an early stage. The aim of this study was to assess retrospectively the expression of cell markers (p53, c-erbB-2, Ki-67 and bcl-2, an antiapoptotic protein) in CXPA in different phases of malignant progression (4 intracapsular, 4 minimally invasive and 7 frankly invasive), in benign and malignant areas and in PA without malignant transformation (17 cases - control group). The parotid was the most frequently involved gland in both groups (CXPA: 53%, control group: 88%), and women were more affected than men. The average age in the CXPA group (63.3 years) at any stage was higher than in the control group (35.6 years). p53 expression was highest in malignant areas (mean 35.71% in early CXPA and 8.11% in frankly invasive CXPA, versus 12.76% and 4.58% in benign areas, respectively) and mainly in luminal cells, while the lowest values (1.71%) occurred in the control group. Similar findings were obtained with the mitotic index and Ki-67 expression. c-erbB-2 positivity was observed almost exclusively in malignant cells of the luminal type. bcl-2 expression was weak and focal. In conclusion, both p53 and c-erbB-2 proteins appear to be involved in malignization of PA since an early stage, thus providing criteria more objective than simple morphological evaluation for diagnosis of intracapsular CXPA.

1- INTRODUÇÃO



1.1- Histologia, anatomia e histogênese dos tumores de glândula salivar

As glândulas salivares (GS) são glândulas túbulo-acinares exócrinas que dão origem a uma diversidade de tipos histológicos de neoplasias biológica e citoarquiteturalmente complexas, sem correspondência no restante do corpo humano (DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001). Entender a sua estrutura básica é um primeiro passo para a compreensão da composição dos tumores e suas classificações (MARTINEZ-MADRIGAL e MICHEAU, 1989) (Figura 1).

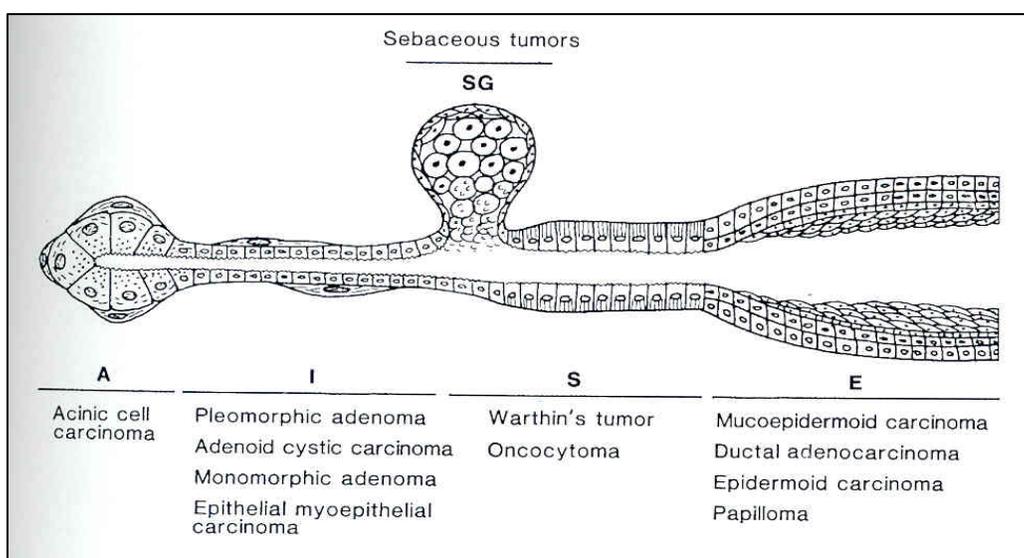


Figura 1- Similaridades morfológicas entre alguns tumores de GS e as diferentes estruturas das GS. (MARTINEZ-MADRIGAL e MICHEAU, 1989). A–ácino, I–ducto intercalado, S–ducto estriado, E–ducto excretor, SG–glândula sebácea.

As GS se dividem em dois grandes grupos: maiores e menores. Este último é representado por numerosas pequenas glândulas que se espalham pelas submucosas das cavidades oral, faríngea e das vias aéreas superiores. Já o primeiro grupo é constituído por três pares de glândulas simétricas: parótida, submandibular e sublingual. As parótidas, as maiores, chegam a pesar 28g na vida adulta, enquanto as sublinguais, as menores, 3g (MARTINEZ-MADRIGAL e MICHEAU, 1989).

Embriologicamente, as GS originam-se a partir da 6ª semana gestacional, sendo a parótida a primeira a se desenvolver. Têm tanto origem ectodérmica (parótida) quanto endodérmica (submandibular e sublingual) e apresentam arquitetura lobular semelhante, exceto pelo fato da parótida conter tecido linfóide. A saliva começa a ser produzida ao redor do 8º mês de gestação, época na qual os ductos excretórios e interlobulares, os ácinos e as células mioepiteliais de revestimento externo já estão presentes. A parótida drena sua secreção através do ducto de Stensen (o qual abre-se na mucosa oral nas proximidades do 2º molar superior), a submandibular através do ducto de Warthon (cuja abertura está na carúncula sublingual) e as sublinguais através ou do ducto de Bartholin (o qual se funde ao de Warthon) ou do de Rivinus (que pode tanto se fundir ao ducto de Warthon como terminar isoladamente na plica sublingual) (MARTINEZ-MADRIGAL e MICHEAU, 1989).

A constituição histológica das estruturas túbulo-acinares varia de um tipo de glândula para outro, o que determina mudanças na constituição da saliva (Figura 2). Enquanto a parótida secreta amilase e é constituída principalmente por ácinos serosos, a sublingual produz mucinas ácidas e neutras em seus ácinos com células luminiais mucosas. Já as glândulas submandibulares têm constituição mista. Além das células acinares secretoras, os ácinos têm revestimento epitelial externo feito pelas células mioepiteliais. Tais células apresentam função contráctil e participam na elaboração da membrana basal, sendo capazes de produzir fibronectina, laminina e colágeno tipo III. Esta capacidade de diferenciação mesenquimatosa e suas diversas conformações citológicas (condromixóide, fusiforme, epitelial e hialina ou plasmocitóide), fazem deste tipo celular um importante componente em diversas neoplasias de GS (MARTINEZ-MADRIGAL e MICHEAU, 1989).

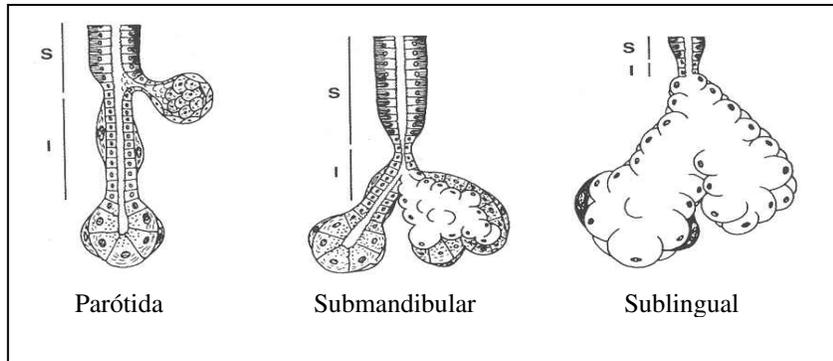


Figura 2- Estrutura túbulo–acinar das GS- sistema secretor (MARTINEZ-MADRIGAL e MICHEAU, 1989). S–ducto estriado, I–ducto intercalado.

As células mioepiteliais revestem também a primeira porção do sistema ductal, os ductos intercalados. Além delas e das células luminares, estes ductos possuem também células basais indiferenciadas em pequena quantidade, provavelmente de reserva. Após os ductos intercalados e ainda fazendo parte do sistema secretor ou intralobular, segue-se o ducto estriado, cujo revestimento é feito por única camada de células colunares simples. O comprimento destes dois tipos de ductos varia de acordo com a GS (Figura 2). Enquanto o ducto intercalado é maior na parótida, o estriado o é na submandibular. O sistema intralobular participa ativamente na constituição final da saliva. Anexas a estes ductos existem glândulas sebáceas em quantidade variável (MARTINEZ-MADRIGAL e MICHEAU, 1989).

A porção final do sistema ductal é constituída pelos ductos interlobulares, localizados nos septos fibrosos entre os lóbulos juntamente com vasos e nervos, e pelos ductos principais. Ambos são revestidos por epitélio colunar pseudoestratificado com células calciformes. À medida que progride em direção ao óstio, o epitélio vai sendo substituído por epitélio escamoso. Acredita-se que os ductos interlobulares possuam células indiferenciadas pluripotenciais, as quais teriam importante papel não só nos processos metaplásicos como também nos neoplásicos (MARTINEZ-MADRIGAL e MICHEAU, 1989).

A histogênese das neoplasias de GS ainda é incerta (MARUYA et al., 2004). Existem pelo menos três grandes linhas de raciocínio, ainda contestáveis (DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001):

- Teoria de célula-tronco reserva (*stem-cell*): por esta teoria, uma única célula pluripotencial daria origem a todos os tumores;
- Teoria bicelular de células reservas semipluripotenciais: nesta, as células indiferenciadas dos ductos intercalados e células basais dos ductos interlobulares/excretoras dariam cada uma origem a determinados tipos histológicos de neoplasia;
- Teoria multicelular: por esta linha de raciocínio cada tipo celular constituinte normal da estrutura túbulo-acinar das GS daria origem a um ou mais tipos histológicos de neoplasia.

Existem numerosos trabalhos na literatura apoiando ou contestando cada uma destas teorias. Para BATSAKIS et al. (1989) a célula-tronco reserva sob estímulo daria origem primeiramente a uma célula epitelial com grande capacidade de se replicar e diferenciar. Poderia, então, maturar-se para célula ductal ou diferenciar-se para célula mioepitelial, a qual seria um tipo celular terminal, com pouca ou nenhuma capacidade mitótica. A presença ou não das células mioepiteliais estaria relacionada com o comportamento biológico da neoplasia – baixo e alto grau de malignidade, respectivamente. AIGNER et al. (1998) demonstraram que a maior parte das células tumorais no adenoma pleomórfico (AP) é de fenótipo transicional entre células epiteliais e mioepiteliais e que a maturação ocorreu no sentido epitelial – mioepitelial. ERLANDSON et al. (1984) demonstraram que o AP tem origem num único tipo celular, o qual, provavelmente, é uma célula ductal intercalada transformada. Porém, ainda não se conseguiu identificar, com segurança, qual realmente é esta célula-tronco (DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001).

De acordo com a segunda teoria, haveria uma correlação entre os tumores oriundos a partir das células basais dos ductos intercalados, que teriam um comportamento de baixo grau de malignidade, e aqueles provenientes das células de reserva dos ductos

excretoras, os quais comportariam-se como de alto grau de malignidade. Com isto, uma semelhança entre a estrutura básica da glândula e algumas neoplasias poderia ser estabelecida, como, por exemplo, entre o carcinoma de células acinares (uma neoplasia bem diferenciada) e os ácinos normais, bem como entre os carcinomas mucoepidermóide e ductal (neoplasias agressivas) e os ductos excretoras (Figura 1). Porém, segundo DARDICK e VAN NOSTRAND (1987), isto não implica necessariamente que o tumor tenha se originado na estrutura à qual mantenha semelhança.

A teoria mais aceita atualmente, defendida já por DARDICK et al. (1990) é a multicelular, na qual todos os tipos celulares são capazes de proliferar e, portanto, sofrer malignização.

1.2- Aspectos clínicos do AP e do CXAP

O AP é a neoplasia mais comum de GS. Sua frequência varia de acordo com a população estudada, correspondendo no ocidente de 40 a 70% de todos os tumores destas glândulas (PINKSTON e COLE, 1999, GNEPP et al., 2000, VARGAS et al., 2002, SANTOS et al., 2003). No nosso meio, dois trabalhos recentes mostraram 59,7% e 67% de APs entre os casos estudados (VARGAS et al., 2002, SANTOS et al., 2003). Valores semelhantes, variando entre 55,9% (NAGLER e LAUFER, 1997) e 60 % (HILL, 2002, VUHAHULA, 2004), foram encontrados no Oriente Médio e em populações negras africanas, respectivamente. Contudo, LIM et al. (2003) encontraram 33% de APs em Singapura, sendo esta a segunda neoplasia mais frequente. Neste trabalho, o tumor de Warthin foi a neoplasia mais comum (37%), ao passo que em populações negras este tumor é extremamente raro (HILL, 2002, VUHAHULA, 2004).

O AP acomete qualquer faixa etária (GNEPP et al., 2000), com pico de incidência entre a 3ª e a 5ª décadas de vida (GNEPP et al., 2000, STENNERT et al., 2001). Na série de VARGAS et al. (2002) a idade variou de 13 a 84 anos, com média de 39 anos. RIBEIRO et al. (2002) e FONSECA et al. (1991), estudando crianças e adolescentes no Brasil e em Portugal, respectivamente, encontraram também nestes grupos etários uma

grande frequência de APs (63% e 66%, respectivamente) entre os tumores benignos. Na realidade, o que mais diferiu estas duas populações foi a frequência de tumores malignos: 71% no estudo brasileiro *versus* 29% no português, sendo que em ambos, o carcinoma mucoepidermóide foi o mais comum. TAKAECHI et al. (1983) relataram 4 casos de AP em crianças filhas de pais sobreviventes à exposição à irradiação da bomba de Hiroshima. Neste grupo estudado, o risco para AP foi duas vezes maior que na população não exposta. Tanto em crianças como em adultos, o sexo feminino é o mais acometido (FONSECA et al., 1991, ELLIS e AUCLAIR, 1996, PINKSTON e COLE, 1999, CHEUK E CHAN, 2000, GNEPP et al., 2000, STENNERT et al., 2001, RIBEIRO et al., 2002, VARGAS et al., 2002).

Usualmente, o AP apresenta-se como massa única, indolor e de crescimento lento, que acomete preferencialmente a parótida, entre 75 e 85% dos casos (HUVOS e PAULINO, 1999). Entre as GS menores, as do palato e lábio são as mais acometidas, raramente levando à ulceração (ELLIS e AUCLAIR, 1996, GNEPP et al., 2000).

Numa minoria dos casos, a qual varia entre 1,6% e 23% (média 6,2%), os APs podem sofrer malignização (CHEUK e CHAN, 2000) para três tipos de neoplasia, em ordem de frequência: carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP), carcinossarcoma e adenoma pleomórfico metastatizante. O CXAP é a 6ª neoplasia mais comum de GS, com uma frequência estimada em 11,6% e 3,6%, respectivamente, entre todas as neoplasias malignas e entre todos os tumores destas glândulas (GNEPP et al., 2000). WAHLBERG et al. (2002) encontraram 358 casos de CXAP entre 2465 estudados (14,5%), mas observaram uma diminuição da incidência desta neoplasia nas décadas de 80 e 90 quando comparadas às décadas de 60 e 70, talvez em decorrência da remoção cirúrgica mais precoce dos APs. Em nosso meio sua frequência varia. VARGAS et al. (2002) encontraram 3 entre 124 casos (12% dos malignos), enquanto SANTOS et al. (2003) não encontraram nenhum caso entre 119 tumores estudados.

À semelhança dos APs, os CXAPs acometem mais mulheres que homens, em média uma década mais velhas que aquelas com tumores benignos (GNEPP et al., 2000) e sendo a parótida a glândula mais acometida (73% dos casos – HUVOS e PAULINO, 1999). A principal manifestação clínica é a de um tumor de longa duração que

passou a crescer rapidamente nos últimos meses, podendo ser acompanhada de dor, paralisia do nervo facial e aderência a outras estruturas (GNEPP et al., 2000).

O AP é uma neoplasia de crescimento lento e que freqüentemente recidiva, especialmente após uma excisão cirúrgica incompleta ou por ruptura da cápsula (DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001), sendo que a chance de malignização aumenta com o número de recidivas (ELLIS e AUCLAIR, 1996). AUCLAIR e ELLIS (1996) observaram que 2/3 dos pacientes que tiveram AP com evolução para CXAP apresentaram recidivas prévias do AP. Além disso, a malignização ocorreu com maior freqüência em tumores de glândulas submandibulares (50% dos tumores destas glândulas malignizaram) do que naqueles originados em parótida e glândula salivar menor (apenas 10% dos tumores de cada grupo evoluíram para carcinoma). O risco de malignização, segundo Eneroth e Zetterberg, aumenta também com a duração do AP, passando de 1,6% naqueles com 5 anos de evolução para 9,6% entre os com mais de 15 anos (AUCLAIR e ELLIS, 1996). Para THACKRAY e LUCAS (1974), 25% dos APs não tratados evoluirão para CXAPs.

As séries que estudam CXAPs em fases precoces são poucas. BRANDWEIN et al. (1996) observaram predomínio do sexo feminino (7 em 12 casos), acometimento preferencial da parótida (9 casos) e idade média de 55 anos (variou de 34 a 74 anos). O tempo de evolução da doença variou de 2 a 18 meses entre os pacientes com tumores completamente confinados à cápsula do AP, enquanto que entre aqueles com tumores com infiltração extracapsular mínima (no máximo 1,5 mm), este tempo variou de 3 meses a 12 anos. DI PALMA et al. (2005), numa série exclusiva com 11 CXAPs intracapsulares, observaram também acometimento preferencial da parótida (10 casos), porém com envolvimento preferencial do sexo masculino (7 pacientes). O tempo de evolução da doença só foi avaliado em 4 casos, variando entre 2 e 42 anos. Apesar do tamanho (a maior lesão media 6 cm), não houve paralisia do nervo facial em nenhum caso.

1.3- Aspectos anatomopatológicos do AP e do CXAP

1.3.1- Aspectos Macroscópicos

Os APs apresentam-se normalmente como massas únicas arredondadas bem delimitadas e encapsuladas (ELLIS e AUCLAIR, 1996, CHEUK e CHAN, 2000), variando desde alguns milímetros a vários centímetros de tamanho (CHEUK e CHAN, 2000). Porém, os tumores de GS menores são normalmente não-encapsulados e pouco delimitados (ELLIS e AUCLAIR, 1996). À superfície de corte, exibem coloração clara e consistência variável, a depender da quantidade de estroma. A lesão pode emitir prolongamentos extracapsulares e atingir o tecido não-neoplásico vizinho sem que isto a caracterize como maligna (McCLUGGAGE et al., 1998, CHEUK e CHAN, 2000, GNEPP et al., 2000). STENNERT et al. (2001) observaram que a maioria dos APs apresentavam irregularidades da cápsula. Áreas finas, de interrupção e “pseudópodes” com nódulos satélites foram encontrados em 97%, 46% e 28% dos casos, respectivamente. O fator mais associado a recidiva tumoral, nesta casuística, foi a presença dos nódulos satélites. APs recidivados apresentam-se como múltiplos nódulos distribuídos difusamente em tecidos moles e na glândula residual (ELLIS e AUCLAIR, 1996). Os APs podem apresentar também áreas de necrose e hemorragia, especialmente após a realização de procedimentos invasivos, como punções por agulha fina (ELLIS e AUCLAIR, 1996).

O aspecto macroscópico do CXAP varia de acordo com a proporção entre os componentes benigno e maligno da neoplasia (LEWIS et al., 2001). Usualmente, apresenta-se como massa mal-delimitada, endurecida e francamente invasiva, em média com duas vezes o tamanho do AP, podendo chegar a 25 cm (GNEPP et al., 2000). Na série de 73 casos de LEWIS et al. (2001), o tamanho médio foi de 3,9 cm (variou de 1 a 17 cm). BRANDWEIN et al. (1996) observaram que entre os 12 tumores em fase inicial de transformação maligna, o tamanho variou de 0,8 a 3,5 cm, sendo que 8 (75%) lesões mediam até 2,0 cm. AUCLAIR e ELLIS (1996) observaram que os tumores que sofreram malignização foram significativamente maiores (com tamanho médio de 4,5 cm) do que aqueles não transformados.

Em tumores em fases iniciais de transformação maligna, o carcinoma pode estar completamente delimitado à cápsula do AP, sendo denominado de intracapsular ou não-invasivo, ou pode infiltrar minimamente o tecido não neoplásico vizinho,

sendo denominado então de minimamente invasivo. No entanto, há divergências na literatura quanto à extensão da invasão do carcinoma além dos limites do AP progresso para que um tumor seja considerado minimamente invasivo. Para TORTOLEDO et al. (1984), tumores com até 8 mm receberam tal denominação. Para LEWIS et al. (2001), esta extensão foi de 5 mm, enquanto para BRANDWEIN et al. (1996), apenas tumores com até 1,5 mm de extensão extracapsular foram considerados minimamente invasivos.

1.3.2- Aspectos Microscópicos

Os APs apresentam amplo espectro morfológico, sendo constituídos por dois componentes: um epitelial e outro mesenquimatoso-símile, em proporções que variam de um tumor para outro e mesmo dentro da própria lesão (ELLIS e AUCLAIR, 1996). O componente epitelial é constituído por estruturas túbulo-ductais revestidas por dois tipos celulares: um interno ou luminal e outro externo, não-luminal ou mioepitelial. O componente luminal pode exibir feições que variam desde células cuboidais até células grandes eosinofílicas, mucosas ou mesmo escamosas ou sebáceas (CHEUK e CHAN, 2000). Ampla variação observa-se também no componente mioepitelial, responsável pela produção da matriz mixocondróide, encontrando-se células cuboidais, fusiformes, estreladas, hialino-plasmocitóides, epitelioídes e claras (CHEUK e CHAN, 2000). De acordo com a proporção entre os componentes epitelial e mesenquimatoso-símile, os APs podem ser classificados em: celular (predomínio do componente epitelial) ou mixóide (predomínio do componente mesenquimatoso-símile, com áreas mixomatosas e mixocondróides) (ELLIS e AUCLAIR, 1996).

Os APs podem apresentar áreas de hialinização estromal que, quando intensas, associam-se mais frequentemente a malignização (AUCLAIR e ELLIS, 1996). Atipias citológicas moderadas a intensas, alto índice mitótico e necrose também estão associados à esta transformação maligna (ELLIS e AUCLAIR, 1996, HUVOS e PAULINO, 1999, CHEUK e CHAN, 2000). A malignização do AP pode acometer qualquer um dos dois componentes epiteliais (células epiteliais luminares e mioepiteliais), isolada ou concomitantemente. Porém, há um predomínio de carcinomas com diferenciação epitelial sobre aqueles com diferenciação mioepitelial, apesar deste tipo celular ser o mais

freqüente no AP (DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001). Qualquer tipo histológico pode ser encontrado no CXAP, sendo o carcinoma dos ductos salivares um dos mais freqüentes (GNEPP et al., 2000, LEWIS et al., 2001).

LEWIS et al. (2001) encontraram 8 subtipos histológicos entre os 73 casos estudados: 31 adenocarcinomas sem outra especificação (s.o.e.), 24 carcinomas dos ductos salivares, 5 carcinomas adenoescamosos, 3 carcinomas indiferenciados e 3 adenóide-císticos (CAC), 2 carcinomas mioepiteliais (CMi), um caso de carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM) e outro de carcinoma sarcomatóide (CSa), além de 3 casos não classificáveis. Na série de COSTA ROSA et al. (1996) 15 dos 19 casos apresentaram feições de neoplasia de alto grau histológico, sendo que 13 apresentaram componente de adenocarcinoma s.o.e. isoladamente (6 casos) ou em conjunto com um ou dois outros tipos histológicos (7 casos). Dentre estes vários tipos, existem as neoplasias consideradas de alto grau histológico, como o carcinoma mucoepidermóide e o ductal, que apresentam freqüentes atipias citológicas e mitoses. Já aquelas cujas feições citológicas são brandas, com atipias e/ou mitoses quase inexistentes, são classificadas como de baixo grau histológico, como, por exemplo, o carcinoma polimórfico de baixo grau.

Muitas vezes, o crescimento destrutivo da lesão é o único critério de malignidade do CXAP (GNEPP et al., 2000). Além disso, a extensão da invasão além da cápsula do AP é considerada fator prognóstico mais importante que o subtipo histológico da neoplasia (TORTOLEDO et al., 1984, BRANDWEIN et al., 1996, LEWIS et al., 2001). Os tumores classificados como intracapsulares e minimamente invasivos são tidos como neoplasias de bom prognóstico e comportamento biológico semelhante ao dos APs sem malignização (BRANDWEIN et al., 1996, LEWIS et al., 2001). Há apenas um relato de caso na literatura de metástase linfonodal em um CXAP intracapsular (FELIX et al., 2002). Divergências existem em pelo menos dois pontos nestes tumores: qual a extensão da invasão além da cápsula do AP para se classificar um tumor como minimamente invasivo e quais são os critérios histológicos para o diagnóstico da lesão intracapsular.

A maior parte dos trabalhos sobre CXAP diz respeito a tumores francamente invasivos, usualmente de pior prognóstico, com freqüentes metástases e óbito relacionado à doença (LEWIS et al., 2001). TORTOLEDO et al. (1984) foram os primeiros a

correlacionar a extensão da invasão do componente carcinomatoso além da cápsula do AP com o prognóstico. Consideraram carcinomas minimamente invasivos e de bom prognóstico aqueles com até 8mm de infiltração extracapsular. Todos os pacientes desta casuística com tumores com invasão extracapsular maior que 9 mm morreram com doença. Contudo, BRANDWEIN et al. (1996) demonstraram que apenas os tumores com infiltração menor que 1,5 mm tiveram um bom comportamento biológico (sem recidivas ou óbito pela doença), o mesmo acontecendo com os tumores intracapsulares e com até 5mm de infiltração da série de LEWIS et al. (2001).

A porção maligna do CXAP pode substituir completamente o AP, dificultando inclusive a correta classificação da neoplasia, ou fazer com que o AP residual restrinja-se a pequenas áreas hialinizadas (LEWIS et al., 2001). O componente maligno intracapsular pode crescer dentro das estruturas túbulo-ductais remanescentes do AP, substituindo a camada luminal sem, contudo, romper a camada mioepitelial. Isto dá um aspecto de carcinoma *in situ* à neoplasia (LEWIS et al., 2001). Os 4 casos de CXAP intracapsular da série de LEWIS et al. (2001) apresentavam características citológicas francamente malignas (3 foram classificados como adenocarcinoma s.o.e. e um como carcinoma ductal) e, apesar disto, não apresentaram recidiva, metástase ou óbito pela doença no período de seguimento. Nove entre os 11 casos de CXAP intracapsulares da série de DI PALMA et al. (2005) também apresentaram feições de tumores de alto grau histológico e tiveram o mesmo comportamento destes da série de LEWIS et al. (2001). Atipia citológica moderada, alta celularidade, mitoses ou até mesmo necrose, isoladamente, não são critérios suficientes para o diagnóstico de carcinoma (ENEROTH, 1965, SPIRO et al., 1977, AUCLAIR e ELLIS, 1996, GNEPP et al., 2000). Para AUCLAIR e ELLIS (1996), uma lesão só é considerada maligna se apresentar amplas áreas com intensas atipias citológicas. Caso contrário, deve receber a denominação de AP atípico. BRANDWEIN et al. (1996) excluíram de sua casuística de tumores em fases iniciais de transformação maligna aqueles tumores com algumas áreas com graus mínimos de pleomorfismo celular e nuclear. Já para SPIRO et al. (1977) a presença de atipias citológicas marcadas em células embebidas em estroma hialinizado é suficiente para o diagnóstico de malignidade.

1.4- Patogênese do CXAP

Outro tópico ainda controverso e alvo de numerosos estudos é a patogênese do carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Alterações nos genes *p53* e *c-erbB-2* são, até o momento, as duas vias mais estudadas e mais correlacionadas com a transformação maligna do AP em CXAP (DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001).

1.4.1- p53

O gene *p53*, um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 17p13, é um dos mais estudados em neoplasias humanas (KARJA et al., 1997). Codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kDa reguladora natural do ciclo celular. Caso haja erros na seqüência do DNA, a proteína p53 interrompe o ciclo celular entre as fases G1 e S para que tais erros possam ser reparados. Caso o reparo não ocorra, o mecanismo de apoptose é então deflagrado (KARJA et al., 1997). Esta proteína, na sua forma natural, tem meia-vida curta, não sendo normalmente detectada por método imunistoquímico. Alterações no gene, especialmente mutações, deleções e perda de alelos, levam à transcrição de proteínas mutadas que, sendo mais estáveis e com meia-vida maior, são detectadas por exame imunistoquímico (GALLO et al., 1995, LEONG et al., 1999).

A participação no gene *p53* está bem estabelecida em numerosos tumores humanos, sendo o exemplo clássico a evolução do adenoma para adenocarcinoma colorretal (FEARON e VOLGELSTEIN, 1990). Em tumores de GS os resultados variam desde ausência de correlação com recidiva, metástase ou sobrevida de pacientes com tumores malignos (KARJA et al., 1997) até o oposto, ou seja, alta agressividade e pior prognóstico (GALLO et al., 1995). Especificamente em APs, a frequência de imunexpressão da proteína tem variado de 0 a 41% (SOINI et al., 1992, DEGUCHI et al., 1993, ISHII e NAKAJIMA, 1994, RIGHI et al., 1994, GALLO et al., 1995, KARJA et al., 1997, LI et al., 1997, ROSA et al., 1997, YAMAMOTO et al., 1998, NORDKVIST et al., 2000, OHTAKE et al., 2002), com apenas um trabalho mostrando 75% de positividade em cultura de células tumorais – 3 de 4 casos positivos (AZUMA et al., 1992). Já nos CXAPs,

a expressão imunoistoquímica da proteína p53 tem variado de 33 a 75% (DEGUCHI et al., 1993, ISHII e NAKAJIMA, 1994, GALLO et al., 1995, KAMIO, 1996, KARJA et al., 1997, LI et al., 1997, YAMAMOTO et al., 1998, LEWIS et al., 2001), sendo que apenas RIGHI et al. (1994) mostraram 100% de positividade (4 casos). Neste trabalho, estes autores fizeram o primeiro relato da literatura da mesma mutação encontrada tanto no AP quanto no CXAP correspondente (RIGHI et al., 1994). LEWIS et al. (2001) encontraram 41% de positividade imunoistoquímica para p53 entre os CXAPs estudados, o que se correlacionou com tamanho tumoral, alto grau histológico, extensão de invasão extracapsular e subtipo histológico (ductal), porém, sem correlação com sobrevida.

1.4.2- c-erbB-2

O gene *c-erbB-2* ou HER2/neu (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*) localiza-se também no cromossomo 17 (17q21) e está relacionado ao controle do desenvolvimento e crescimento celular. Codifica uma proteína transmembrana de 185 kDa homóloga ao receptor do fator de crescimento epidérmico. A amplificação do gene leva à superexpressão da proteína, que pode ser detectada por exame imunoistoquímico (SKALOVA et al., 2003) e está relacionada à piora do prognóstico em uma série de tumores, especialmente nos de mama (RO et al., 1990, PRESS et al., 1994, COTRAN et al., 2000). Quanto aos tumores de GS, os resultados são contraditórios, pois incluem neoplasias de histogênese e tipos histológicos diversos (COSTA ROSA et al., 1996). APs sem transformação maligna e áreas benignas de CXAPs usualmente não exibem expressão imunoistoquímica (positividade de membrana) de c-erbB-2 (KERNOHAN et al., 1991, SUGANO et al., 1992, COSTA ROSA et al., 1996, DI PALMA et al., 2005). Entre as neoplasias malignas, especialmente o CXAP com diferenciação para tumor de alto grau histológico, existe positividade que se relaciona, inclusive, com pior prognóstico. Todos os CXAPs c-erbB-2-positivos da série de COSTA ROSA et al. (1996) foram classificados como adenocarcinomas s.o.e. e os pacientes morreram com doença. Em outra série deste mesmo grupo de pesquisadores, os tumores de GS com diferenciação mioepitelial foram c-erbB-2-negativos (ROSA et al., 1997).

Contudo, existem poucos trabalhos na literatura que comparam a imunexpressão das proteínas p53 e c-erbB-2 em áreas benignas e malignas do CXAP (RIGHI et al., 1994, COSTA ROSA et al., 1996, YAMAMOTO et al., 1998, FELIX et al., 2002, DI PALMA et al., 2005). Destes trabalhos, apenas os de FELIX et al. (2002) e DI PALMA et al. (2005) dizem respeito a tumores em fases iniciais de transformação maligna. No relato de caso de FELIX et al. (2002), o tumor exibiu alta expressão de ambas as proteínas e teve comportamento clínico agressivo, com metástase linfonodal. A princípio, a proteína p53 estaria envolvida precocemente na evolução AP-CXAP, enquanto a c-erbB-2 participaria da aquisição de um fenótipo mais agressivo (COSTA ROSA et al., 1996, DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001).

1.4.3- Ki-67

Avaliar o índice mitótico de uma neoplasia é umas das formas de se avaliar sua proliferação. Outra maneira muito utilizada é através de marcadores imunoistoquímicos de células no ciclo celular, entre eles a proteína Ki-67 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), utilizados inclusive para se estabelecer prognóstico (FELIX et al., 1996, KAMIO, 1996). Enquanto a proteína Ki-67 tem meia-vida curta e é expressa em todas as fases do ciclo celular, o PCNA possui uma meia-vida maior (cerca de 20 horas) e pode ser encontrado, inclusive, em células na fase G0. O PCNA é expresso principalmente na fase final de G1 e fase S (FELIX et al., 1996) e sofre maiores influências do agente fixador, o que confere à Ki-67 uma maior reprodutibilidade (LEONG et al., 1999, ALVES et al., 1999).

HELLQUIST et al. (1997), no seu trabalho com fração de crescimento tumoral e apoptose em carcinomas de células acinares de GS, mostraram que a expressão de Ki-67 foi o único fator prognóstico independente. Ao contrário, FELIX et al. (1996), estudando a expressão de PCNA em carcinomas dos ductos salivares, não encontraram associação com o prognóstico, apesar da alta expressão desta proteína. Especificamente em CXAP, LEWIS et al. (2001) encontraram maior índice de proliferação celular (avaliado através do Ki-67) em áreas de carcinoma (média de 11,95%) do que em áreas de AP (média de 0,55%)

e áreas normais (média de 0,42%), o que influenciou no prognóstico ($p < 0.05$). Co-expressão de p53 e c-erbB-2 correlacionou-se com maior índice proliferativo e com progressão para tumores de alto grau histológico na série de KAMIO (1996). Mesmo em CXAPs intracapsulares, o índice proliferativo avaliado pelo Ki-67 mostrou-se aumentado e foi, ao lado de c-erbB-2, importante no diagnóstico na série de DI PALMA et al. (2005).

1.4.4- bcl-2

A apoptose, mecanismo de morte celular programada, além de estar envolvida numa série de mecanismos fisiológicos e embriológicos, tem papel importante na gênese de algumas neoplasias (SOINI et al., 1998, COTRAN et al., 2000). Falhas nos sistemas de controle da apoptose prolongam o tempo de vida celular, levando ao acúmulo de mutações genéticas que podem desencadear ou estimular o crescimento de certos tumores (AOKI et al., 2004). O controle da apoptose é feito por uma série de genes, como *p53*, *Rb*, *c-myc* e *bcl-2*, este último um proto-oncogene antiapoptótico descrito originalmente no linfoma não Hodgkin folicular (TSUJIMOTO et al., 1985, SOINI et al., 1998, LEONG et al., 1999). A regulação da apoptose pela proteína bcl-2 deve-se à ação de uma série de proteínas, cujo conjunto é denominado “família bcl-2”. São proteínas com ações antagônicas, sendo o resultado final, apoptose ou não, dependente da somatória de todas (SOINI et al., 1998, COTRAN et al., 2000). Enquanto a bcl-2 e a bcl-Xl inibem a apoptose, a bax, a bad e a bcl-Xs, entre outras, induzem-na (HELLQUIST et al., 1997, SOINI et al., 1998, COTRAN et al., 2000).

A participação da proteína bcl-2 tem sido demonstrada também em neoplasias epiteliais, como nas de pulmão e cólon, associando-se inclusive com bom prognóstico (HELLQUIST et al., 1997, LEONG et al., 1999). Em GS normais, esta proteína foi demonstrada em células basais de ductos excretórios e estriados do tecido normal, conferindo a estas células um caráter precursor (PAMMER et al., 1995). Em tumores benignos de GS, especialmente no AP, foi positiva principalmente nas células mioepiteliais das estruturas túbulo-ductais e, em menor escala, em áreas sólidas, mixóides e condróides (PAMMER et al., 1995). DA CRUZ PERES et al. (2004), estudando tumores de GS em

crianças e adolescentes, encontraram 87,5% de positividade para bcl-2 em APs. Para PAMMER et al. (1995), a apoptose controlada pela bcl-2 está envolvida na gênese destas neoplasias.

SOINI et al. (1998), estudando a apoptose e a expressão de bcl-2 e bax em tumores benignos e malignos de GS, mostraram que a bcl-2 é mais freqüentemente encontrada em tumores benignos e com menor índice apoptótico, enquanto a bax é expressa amplamente nas duas categorias. Como alguns carcinomas expressaram bcl-2 com grande intensidade, estes autores sugeriram que outras vias reguladoras da apoptose estivessem envolvidas. Quanto à influência da positividade no prognóstico, nem HELLQUIST et al. (1997), em sua série de carcinomas de células acinares, nem DA CRUZ PERES et al. (2004), com os tumores em crianças e adolescentes, conseguiram estabelecer correlação. Em CXAPs, mais especificamente, apenas SUNARDHI-WIDYAPUTRA e VAN DAMME (1995) encontraram forte expressão desta proteína na periferia de áreas malignas e benignas de CXAP.

2- JUSTIFICATIVA



O carcinoma ex-adenoma pleomórfico é um modelo interessante para se estudar a seqüência adenoma-adenocarcinoma em neoplasia humana. Entretanto, na literatura, há poucos trabalhos que analisam a expressão de marcadores biológicos com influência no crescimento e ciclo celular na transformação maligna do AP. Estes estudos, além de apresentarem resultados muitas vezes contraditórios, concentram-se, quase que exclusivamente, na forma francamente invasiva do CXAP. O estudo da expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular numa série de tumores, que compreende desde a fase precoce de transformação maligna do AP (representada pelos carcinomas intracapsulares e minimamente invasivos) até a fase mais avançada (representada pelos carcinomas francamente invasivos), pode fornecer informações sobre o processo de carcinogênese no tumor benigno mais comum da glândula salivar. Além disso, como a detecção morfológica de transformação carcinomatosa precoce no AP pode ser difícil, visto que os critérios morfológicos são subjetivos, é interessante investigar se a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular poderia contribuir para o diagnóstico de CXAPs em fase inicial, isto é, intracapsulares e minimamente invasivos.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar a imunoexpressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular (bcl-2, c-erbB-2, Ki-67 e p53) em adenomas pleomórficos sem transformação maligna e em CXAPs nas formas intracapsular, minimamente invasiva e francamente invasiva.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1- Comparar a expressão imunoistoquímica de bcl-2, c-erbB-2, Ki-67 e p53 entre as áreas benigna (adenoma) e maligna (carcinoma) dos CXAPs.

3.2.2- Comparar a expressão imunoistoquímica de bcl-2, c-erbB-2, Ki-67 e p53 entre o adenoma pleomórfico sem transformação maligna com as áreas benigna e maligna dos CXAPs.

3.2.3- Comparar a expressão imunoistoquímica de bcl-2, c-erbB-2, Ki-67 e p53 entre CXAPs classificados conforme a extensão da invasão além da cápsula do adenoma em: neoplasias em fase precoce (carcinomas intracapsular e minimamente invasivo) e neoplasias em fase avançada (carcinoma francamente invasivo).

3.2.4- Discriminar quais componentes celulares (epitelial e/ou mioepitelial) apresentam expressão imunoistoquímica de bcl-2, c-erbB-2, Ki-67 e p53 no CXAP e no AP sem transformação maligna.

4- MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em 32 tumores de glândulas salivares ressecados cirurgicamente e selecionados do arquivo de Patologia Cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica (DAP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. As lâminas do arquivo coradas em hematoxilina-eosina (HE) foram revistas e um bloco de cada caso foi selecionado para exame imunoistoquímico.

4.1- Aprovação do comitê de ética em pesquisa

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP. Por se tratar de trabalho retrospectivo em material biológico parafinado de arquivo, foi dispensada a utilização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do paciente.

4.2- Informações clínicas e epidemiológicas

Os dados clínicos e epidemiológicos, tais como: nome, sexo, idade, glândula acometida e evolução, foram retirados dos prontuários médicos do Serviço de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas/UNICAMP.

4.3- Grupos de estudo

4.3.1- CXAP

Foram 15 casos de CXAPs, definidos como neoplasias epiteliais malignas crescendo em associação com AP primário ou recidivado. Todos os casos apresentavam áreas carcinomatosas e de AP residual. Os carcinomas foram classificados de acordo com a extensão de invasão além da cápsula do AP como:

- intracapsular: carcinomas sem invasão, confinados à cápsula do AP pregresso – 4 casos;
- minimamente invasivo: carcinomas cujo componente invasivo não ultrapassou 1,5 mm além da cápsula do AP pregresso ($\leq 1,5$ mm de invasão) – 4 casos;
- francamente invasivo: carcinomas com componente invasor estendendo-se além de 1,5 mm da cápsula do AP pregresso – 7 casos.

4.3.2- AP

Dentre numerosos casos de AP do arquivo do DAP, foram selecionados 17 casos que não apresentavam: atipias citológicas moderadas ou intensas, índice mitótico elevado, extensão extra-capsular (“pseudópodes”), história de cirurgia pregressa e/ou recidiva. Tais casos foram utilizados como grupo controle.

4.4- Análise morfológica

Foram avaliados os seguintes critérios morfológicos:

- tipo de diferenciação celular: as áreas malignas dos CXAPs foram classificadas de acordo com o tipo celular (luminal e/ou mioepitelial) proliferado;
- atipia celular: graduada em três categorias: leve (raras células com núcleos levemente aumentados de volume, com leve hipercromatismo e pequenos nucléolos); intensa (muitas células com núcleos grandes, pleomórficos e hipercromáticos, com nucléolo evidente); e, moderada (células com feições intermediárias). Este parâmetro foi avaliado nas áreas benignas e malignas dos CXAPs. Os APs do grupo controle, por critérios de inclusão, não apresentavam atipias citológicas moderadas ou intensas;
- índice mitótico: número de mitoses em 10 campos de maior aumento (0,43 mm de diâmetro, objetiva de 40x). Este índice foi calculado em ambas as áreas do CXAP (benigna e maligna) e no grupo controle;
- hialinização estromal: ausente ou presente e, neste caso, graduada em leve (menos de 25% da área), moderada (entre 25 e 50% da área) e intensa (mais de 50% da área). Esta alteração foi avaliada nas três áreas: benigna e maligna do CXAP e grupo controle.

4.5- Reação imunoistoquímica

Os cortes histológicos de 5 µm realizados para estudo imunoistoquímico foram colocados em lâminas previamente lavadas, desengorduradas e tratadas com solução de organossilano a 25% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, SIGMA, código A3648) e armazenadas a -20°C até o momento da reação. Os controles externos positivos de cada anticorpo empregado estão relacionados na Tabela 1.

Os cortes foram desparafinizados em banho de xilol previamente aquecido em estufa a 110°C e, a seguir, em banhos subsequentes de xilol à temperatura ambiente. A etapa seguinte, hidratação, foi realizada em banhos em álcool etílico em concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e as lâminas então foram lavadas em águas corrente e destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em três banhos de H₂O₂ a 10 volumes, cada um com 5 minutos de duração, seguidos de lavagens em água corrente e água destilada.

A recuperação antigênica foi feita pelo método de calor úmido, utilizando-se panela a vapor T-Fall[®] (Dijon, França). As lâminas, imersas em solução tampão (tampão citrato de sódio – pH 6,0 para o anticorpo anti-c-erbB-2 e tampão Tris-EDTA – pH 8,9 para os demais anticorpos), foram aquecidas por 30 minutos a 95°C e, posteriormente, lavadas em água corrente.

Cada anticorpo primário foi gotejado sobre o preparado histológico na diluição adequada (conforme Tabela 1) e incubados por 30 minutos em estufa a 37°C. Após isto, permaneceram em câmara úmida a 4°C *overnight* por 16-18 horas. Após a incubação as lâminas foram lavadas três vezes em PBS (*phosphate buffer saline*), pH 7,4, sob agitação e secas. As lâminas foram então incubadas por uma hora a 37°C com um coquetel de polímeros marcado com peroxidase, sendo utilizado o sistema de detecção EnVision Plus (Dakocytomation, código K4001) para aquelas com os anticorpos primários anti-p53, -Ki-67 e -bcl-2 e o sistema EnVision (Dakocytomation, código K1491) para o anti-c-erbB-2. Após a incubação, foram novamente imersas em PBS.

Tabela 1- Relação de anticorpos primários utilizados, diluição e controles externos positivos.

Anticorpo anti-	Clone (código)	Fabricante	Diluição	Controle externo positivo
p53	DO-7 (M7001)	Dakocytomation, Carpinteria, CA, EUA	1:100	Carcinoma de mama*
Bcl-2	124 (M887)	Dakocytomation, Carpinteria, CA, EUA	1:40	Linfonodo
c-erbB-2	Policlonal (A0485)	Dakocytomation, Carpinteria, CA, EUA	1:300	Carcinoma de mama*
Ki-67	MIB-1 (0505)	IMUNOTECH, Marseille, França	1:150	Carcinoma de mama*
Vimentina	V9 (M725)	Dakocytomation, Carpinteria, CA, EUA	1:100	Linfonodo

*casos sabidamente positivos

Para a revelação da reação foi utilizado um substrato cromogênico – a solução de DAB (3-3'-Diaminobenzidina), na proporção de 0,06 g para 100mL de PBS e 1,500 mL de H₂O₂ a 10 volumes e 1 mL de DMSO, por 5 minutos a 37°C. O material foi lavado em água corrente, contracorado com hematoxilina de Meyer (30 a 60 segundos), desidratado (três banhos de álcool etílico absoluto e três de xilol) e as lamínulas montadas com resina de Entellan[®].

Nos casos de CXAP foi realizada dupla marcação imunoistoquímica com os anticorpos anti-p53 e anti-vimentina a fim de se visualizar simultaneamente os dois marcadores. A vimentina é um antígeno usualmente expresso em células mioepiteliais e ausente em células luminiais (ARAÚJO et al., 1994, FURUSE et al., 2005). Além disso, é de expressão citoplasmática, enquanto que a proteína p53 localiza-se no núcleo das células.

Os cortes histológicos de 5 µm em lâminas silanizadas foram imersos em tampão citrato de 10 mM (pH 6.0) para a recuperação antigênica, realizada em panela a vapor a 95°C por 30 minutos. O primeiro anticorpo primário (anti-p53) foi gotejado e

marcado em marrom pelo sistema estreptavidina-biotina-peroxidase, usando DAB como cromógeno. Depois de sua eluição com ácido oxálico 0,5% (pH 3.5), foi realizado o bloqueio da avidina e da biotina endógenas, utilizando-se o kit de bloqueio da Avidina/Biotina (VECTOR, Burlingame, CA, EUA). O segundo anticorpo primário foi então incubado e marcado em vermelho utilizando-se o sistema estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina, o qual usa nova fucsina (BIOGENEX, San Ramon, CA, EUA) como substância cromogênica. As lâminas foram então lavadas em água corrente, submetidas a banhos de xilol e as lamínulas montadas com resina de Entellan[®].

4.6- Análise imunoistoquímica

A análise da reação imunoistoquímica foi feita de modo diferente para os anticorpos empregados.

4.6.1- p53 e Ki-67

Em cada caso de CXAP, áreas benignas do AP pregresso e áreas malignas do carcinoma com maior positividade imunoistoquímica (*hotspots*) foram escolhidas e 1.000 células foram contadas em cada uma delas, calculando-se, então, a porcentagem de células positivas por área. A contagem foi feita através da captura de imagem com câmera SONY (modelo CCD-IRIS/RGB), em campo de maior aumento (0,43 mm de diâmetro, objetiva de 40x) em microscópio Olympus – CH30. Capturada a imagem, foi então utilizado o programa ImageLab-2000[®], através de sua função “contador manual”, a qual permite selecionar dois padrões (positivo e negativo) por imagem, dando também a somatória das células contadas (Figura 3). No grupo controle foi adotado o mesmo método, contando-se 1.000 células por caso.

Nos casos submetidos à dupla marcação imunoistoquímica para vimentina (positividade citoplasmática) e p53 (positividade nuclear), pôde-se discriminar com maior precisão se a expressão de p53 ocorreu em células epiteliais e/ou mioepiteliais.

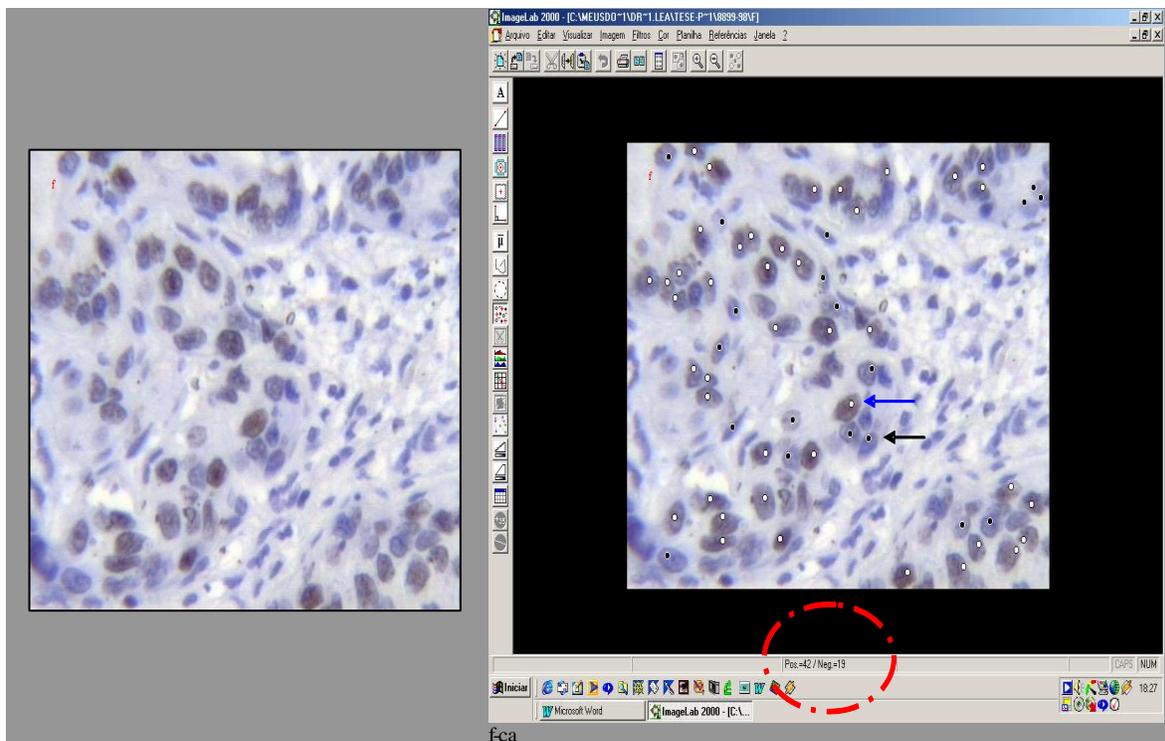


Figura 3- Exemplo de utilização do programa ImageLab-2000[®]. À esquerda, imagem capturada sem ser trabalhada. À direita, imagem com núcleos marcados com pontos brancos (positivos – seta azul) e pretos (negativos – seta preta). No círculo, quantidade de células positivas e negativas.

4.6.2- c-erbB-2

A semiquantificação de positividade para c-erbB-2 tanto nas áreas benignas e malignas do CXAP, como no grupo controle, foi realizada de acordo com o manual do fabricante (DAKO CORPORATION, 2001) como se segue: zero - nenhuma ou menos de 10% das células tumorais com positividade de membrana, 1+ - mais de 10% das células tumorais com positividade de membrana fraca e descontínua, 2+ - mais de 10% das células tumorais com positividade de membrana fraca a moderada e contínua, e 3+ - mais de 10% das células tumorais com forte e completa positividade de membrana.

4.6.3- bcl-2

As áreas benignas ou malignas do CXAP e os casos-controle foram considerados apenas positivos ou negativos caso houvesse positividade citoplasmática. Através da morfologia das células, tentamos estabelecer se eram células luminais ou mioepiteliais.

4.7- Análise estatística

Para análise estatística foram utilizados os testes de Fisher ou Qui-Quadrado (para se verificar associações entre variáveis categóricas), teste não-paramétrico de Mann-Whitney (para comparação entre variáveis contínuas de dois grupos) e teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (para comparação entre variáveis contínuas de mais de dois grupos). Foram considerados significativos valores menores ou iguais a 0.05 ($p \leq 0.05$). Foi calculado o coeficiente *kappa* para se verificar a concordância entre as áreas diferentes nas medidas categóricas e aplicado o teste não-paramétrico de Wilcoxon para as medidas contínuas de amostras pareadas.

A análise estatística foi realizada pelo Serviço de Estatística da Comissão de Pesquisa da FCM/UNICAMP.

5- RESULTADOS

A idade média dos pacientes estudados do grupo CXAP foi de 63,3 anos (variou de 37 a 89 anos), sendo 3 décadas maior que no grupo controle (média: 35,6 anos, variou de 14 a 57 anos). Quando subdividimos o grupo CXAP de acordo com a extensão da invasão, observamos um aumento na idade média dos pacientes à medida que o tumor evolui: intracapsulares – idade média 47,2 anos (variou de 37 a 58 anos), minimamente invasivos – idade média: 67,7 anos (variou de 43 a 89 anos) e francamente invasivos - idade média 70 anos (variou de 55 a 86 anos) (Tabela 2).

Tanto nos pacientes (73,3%), em qualquer um dos subgrupos, quanto no grupo controle (58,8%) houve predomínio do sexo feminino, assim como do acometimento da glândula parótida (53,3% dos pacientes e 88,2% dos controles). As glândulas submandibulares estiveram envolvidas em 5 casos com CXAP (33,3%) e em 2 (11,7%) APs do grupo controle. Não houve Acometimento das glândulas sublinguais em nenhum dos grupos. As glândulas salivares menores do palato foram sítio de origem de CXAP em 2 casos (13,3%).

Os resultados das análises morfológica e imunoistoquímica serão demonstrados dividindo os casos de acordo com a extensão do componente invasivo do carcinoma em dois grandes grupos: carcinomas em fase precoce de malignização (intracapsulares e minimamente invasivos) e carcinomas francamente invasivos, além do grupo controle.

Tabela 2- CXAP: sexo, idade, glândula acometida e critérios morfológicos em áreas benignas e malignas.

Caso	Grupo	Idade	Sexo	Glândula	Tipo histológico	Hialinização estromal		Atipia citológica		IM*		
						B.	M.	B.	M.	B.	M.	
1	3430/99	I	44	F	Submand.	Luminal	0	0	1	2	0	1
2	62586	I	37	F	Submand.	Luminal	3	2	1	3	2	8
3	9337/95	I	58	M	Parótida	Luminal	1	0	1	2	0	12
4	7695/96	I	50	F	Parótida	Luminal	1	0	1	3	0	0
5	534/03	II	89	F	Submand.	Luminal	2	0	0	3	0	8
6	8899/98	II	74	M	Parótida	Luminal	2	0	1	3	0	13
7	6599	II	65	F	Parótida	Luminal	0	2	1	3	0	6
8	27907	II	43	F	Parótida	Luminal e mioepitelial	0	1	1	2	1	0
9	12079/96	III	66	M	Parótida	Luminal	3	1	NA	3	NA	3
10	2011/03	III	62	F	Submand.	Luminal	3	0	NA	3	NA	41
11	8657/97	III	86	F	Submand.	Luminal	3	2	NA	3	NA	6
12	45988	III	74	F	Sl. menor	CMi	3	1	0	2	0	4
13	1164/01	III	65	M	Parótida	CEM	3	3	0	0	0	0
14	23252	III	55	F	Sl. menor	CEM	0	0	0	0	1	10
15	5479/96	III	82	F	Parótida	CSa	2	1	1	3	3	23

Legenda- grupo I- CXAP intracapsular; grupo II- CXAP minimamente invasivo; grupo III- CXAP francamente invasivo; M- masculino; F- feminino; Submand.- glândula submandibular; Sl. Menor- glândula salivar menor (palato); CMi- Carcinoma Mioepitelial; CEM- Carcinoma Epitelial-Mioepitelial; CSa- Carcinoma Sarcomatóide; B.- área benigna (adenoma pleomórfico residual); M.- área maligna do CXAP; 0- ausente; 1- leve; 2- moderado; 3- intenso; *IM- Índice Mitótico (nº de mitoses em 10 campos de maior aumento); NA- não avaliável.

5.1- Grupo controle

5.1.1- Análise morfológica

Nenhum dos casos de AP do grupo controle apresentou hialinização estromal moderada ou intensa, bem como atipias citológicas ou índice mitótico elevado (no máximo 2 mitoses/10 campos de maior aumento).

5.1.2- Análise imunoistoquímica

Dez casos (58,8%) apresentaram positividade para p53, porém em nenhum deles ela foi maior que 10% (variou de 0,5% a 7,2%). O índice proliferativo médio também foi baixo neste grupo (2,85% \pm 1,86). Não houve positividade para c-erbB-2, enquanto que 11 casos (64,7%) apresentaram, em sua maioria (10 casos), células mioepiteliais das estruturas túbulo-ductais e de áreas sólidas positivas para bcl-2.

Todos os resultados obtidos no grupo controle estão na Tabela 3.

Tabela 3- Grupo controle: sexo, idade, glândula acometida, critérios morfológicos e imunoistoquímicos.

<i>Caso</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Glândula</i>	<i>Hialinização estromal</i>	<i>Atipia citológica</i>	<i>Índice Miótico*</i>	<i>P53 %</i>	<i>Ki-67 %</i>	<i>c-erbB-2</i>	<i>Bcl-2</i>
<i>1</i>	5144/01	F	Parótida	0	0	0	0	0,9	0	(-)
<i>2</i>	3727/01	F	Submand.	0	1	2	4,8	6,7	0	(+)(Mi)
<i>3</i>	3110/01	F	Parótida	0	0	0	0	2,4	0	(+)(Mi)
<i>4</i>	5334/00	F	Parótida	0	0	1	0	2,9	0	(-)
<i>5</i>	11697/00	M	Parótida	0	1	1	0	1,3	0	(-)
<i>6</i>	1294/01	M	Parótida	1	1	1	0	6,6	0	(+)(Mi)
<i>7</i>	2646/01	F	Parótida	0	0	0	0	4,0	0	(-)
<i>8</i>	2820/01	F	Parótida	1	0	1	0,6	4,7	0	(-)
<i>9</i>	4669/00	M	Parótida	1	1	0	0	1,7	0	(-)
<i>10</i>	3921/00	F	Parótida	0	0	0	0,8	3,6	0	(+)(Mi)
<i>11</i>	8716/00	M	Parótida	1	0	1	4,5	2,2	0	(+)(Mi)
<i>12</i>	4014/95	F	Parótida	0	0	0	2,9	1,2	0	(+)(Mi)
<i>13</i>	9433/94	M	Submand.	1	1	0	1,3	2,1	0	(+)(Mi)
<i>14</i>	8795/94	M	Parótida	0	1	1	1,9	1,5	0	(+)(Mi)
<i>15</i>	6377/00	F	Parótida	0	1	2	7,2	4,2	0	(+)(Mi)
<i>16</i>	11341/00	F	Parótida	1	1	0	4,5	0,6	0	(+)(Mi,L)
<i>17</i>	8168/99	M	Parótida	0	0	0	0,5	1,9	0	(+)(Mi)

Legenda- M- masculino; F- feminino; Submand.- glândula submandibular; 0- ausente/negativo; 1- leve; *Índice Mitótico- n° de mitoses em 10 campos de maior aumento; (-)- negativo; (+)- positivo; Mi- célula mioepitelial; L- célula luminal.

5.2- Carcinomas precoces

Dentro deste subgrupo, encontramos 6 mulheres e dois homens, com acometimento de parótida (5 casos) e glândula submandibular (3 casos).

5.2.1- Análise Morfológica

Sete entre os oito CXAPs (87,5%) mostravam apenas um tipo celular proliferado no componente carcinomatoso, o luminal, com atipias citológicas moderadas ou intensas (Figuras 4 e 5). O oitavo caso, um CXAP minimamente invasivo, exibia dupla população (epitelial e mioepitelial) proliferada (Figura 6). As áreas benignas de AP mostravam-se moderada ou intensamente hialinizadas em 3 (37,5%) dos casos, enquanto que apenas 2 (25%) das áreas malignas mostravam este aspecto (kappa 0.1429). Atipias citológicas moderadas ou intensas só foram encontradas nas áreas malignas e o índice mitótico foi maior nas áreas malignas que nas benignas ($p < 0.05$). Os demais dados estão colocados na Tabela 2.

5.2.2- Análise Imunoistoquímica

A expressão de p53 foi acima de 10% em 5 (62,5%) das áreas benignas e em 7 (87,5%) das áreas malignas dos CXAPs, havendo diferença estatística da porcentagem de células positivas entre os dois subgrupos e também entre cada uma delas e o grupo controle. A expressão de p53 foi mais freqüente entre as células luminais, tanto das áreas benignas quanto das malignas, o que pôde ser melhor caracterizado através da dupla marcação imunoistoquímica (Figuras 7, 8 e 9). Assim como o índice mitótico, o índice proliferativo avaliado pelo marcador de proliferação celular Ki-67 foi maior nas áreas malignas que nas benignas (Figura 10). A expressão de c-erbB-2 com intensidade de 2+ ou 3+ foi encontrada apenas em células luminais atípicas das áreas malignas (5 casos), sendo negativa ou, no máximo, 1+ em todas as áreas benignas e nas outras 3 áreas malignas de CXAP e no grupo controle (Figuras 11 e 12). Houve diferença estatística entre as áreas malignas e os

demais subgrupos quanto à expressão deste marcador. A expressão de bcl-2 restringiu-se a apenas duas áreas benignas e a 3 áreas malignas de CXAP, sendo que uma destas últimas a positividade ocorreu apenas em células mioepiteliais residuais das estruturas túbulo-ductais (Figura 13). Todos os dados estão dispostos nas Tabelas 4 e 5.

É interessante notar que não houve diferença estatística de expressão das proteínas c-erbB-2, Ki-67 e bcl-2 quando comparamos os CXAPs em seus diferentes estágios evolutivos, ou seja, carcinomas intracapsulares, minimamente invasivos e francamente invasivos.

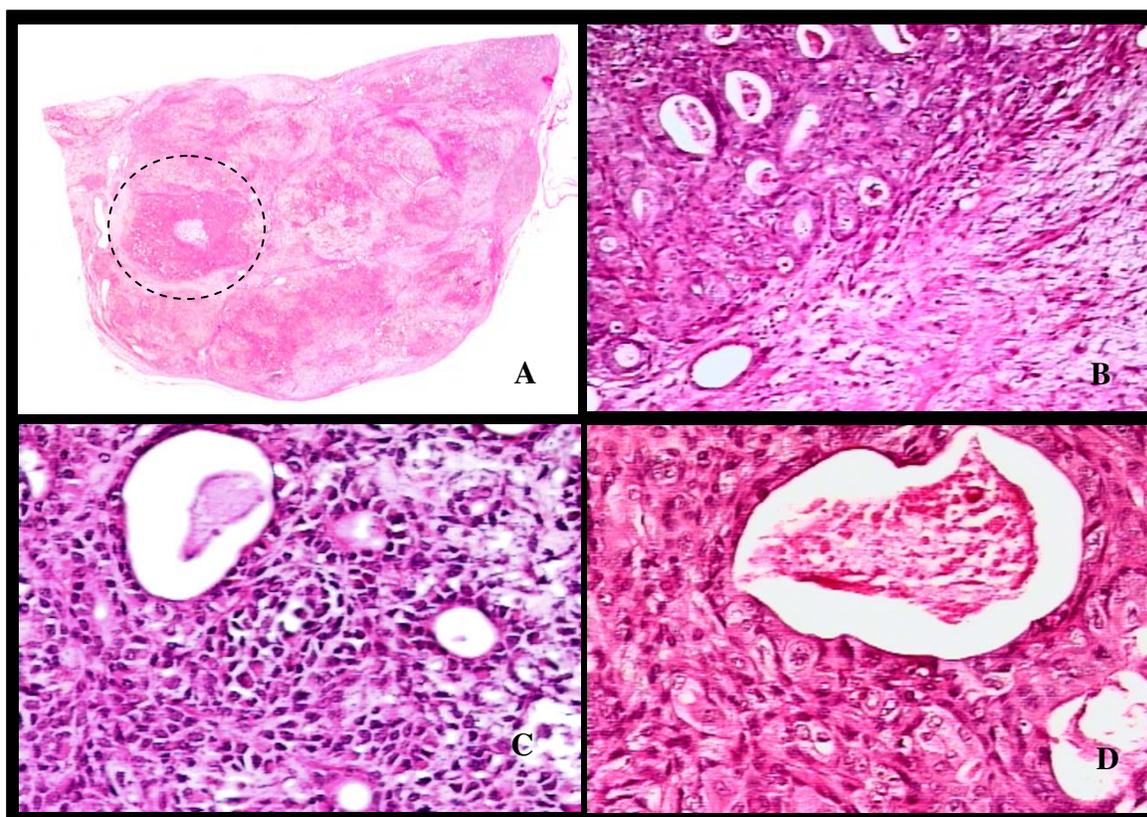


Figura 4- CXAP intracapsular (3430/99). **A-** adenoma pleomórfico com área maligna assinalada (círculo); **B-** zona de transição entre as áreas benigna e maligna; **C-** área benigna; **D-** área maligna (HE).

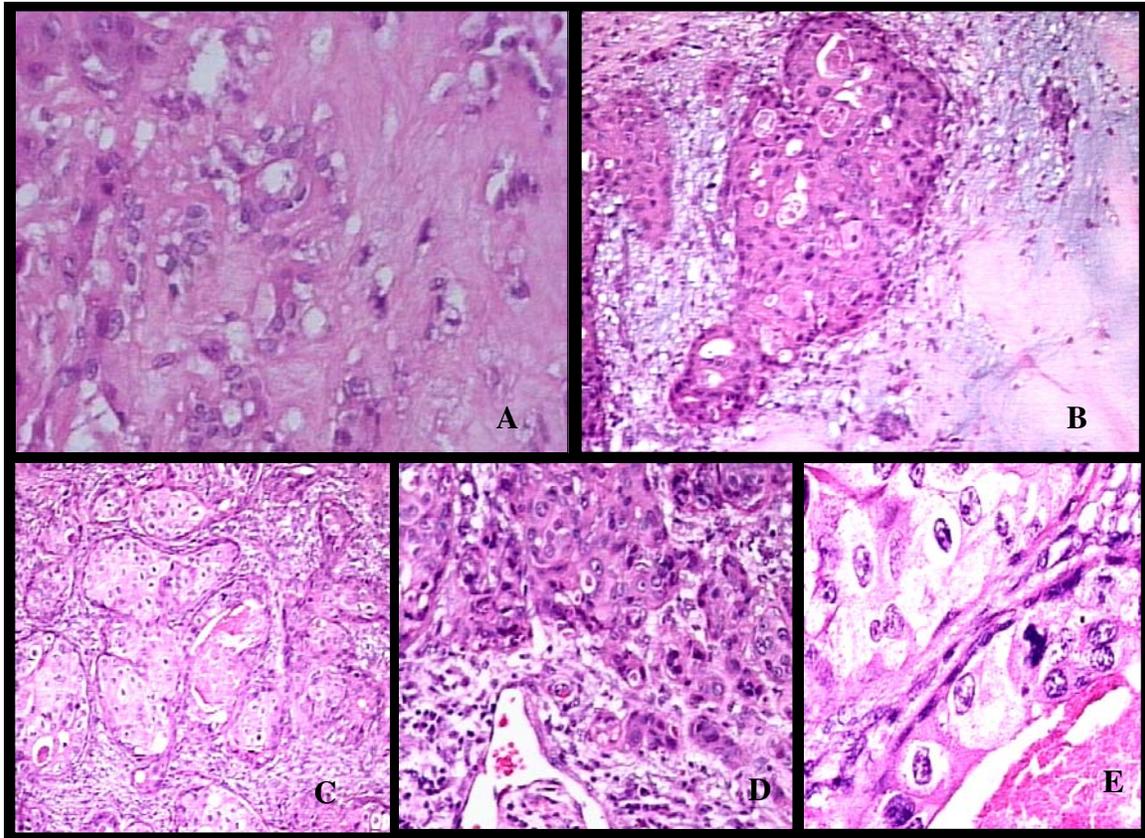


Figura 5- CXAP minimamente invasivo (8899/98). **A-** área benigna sem atipias citológicas. **B-** área maligna com intensas atipias citológicas em meio a estroma mixocondróide. **C, D e E-** pormenores de áreas malignas (HE).

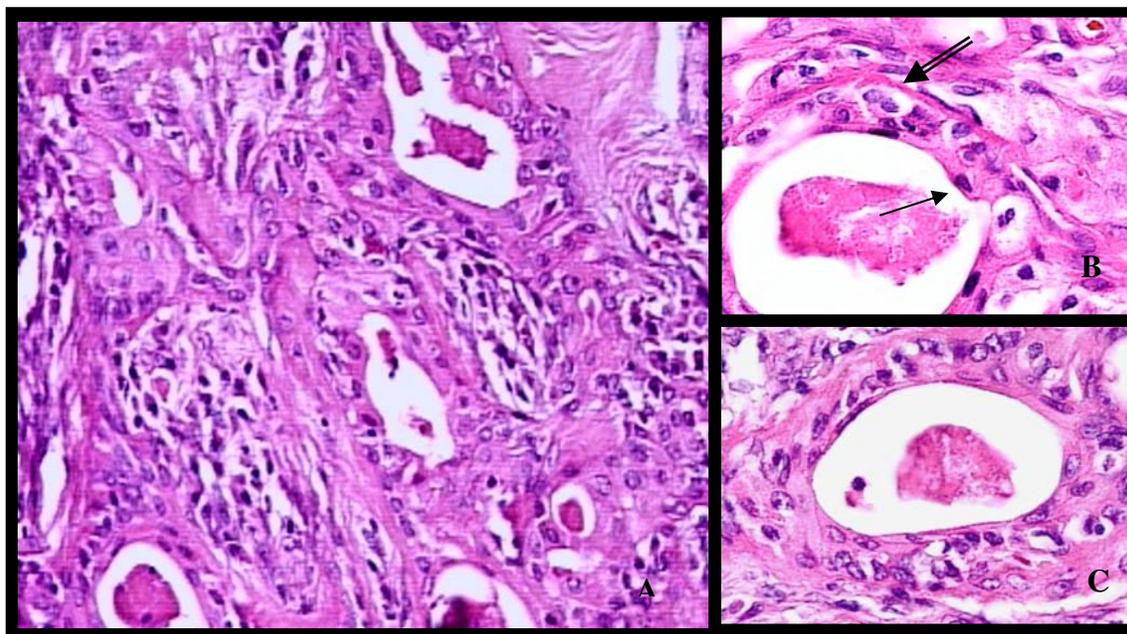


Figura 6- A, B e C- CXAP minimamente invasivo (27907), mostrando dupla população celular proliferada: luminal (seta simples) e mioepitelial (seta dupla) (HE).

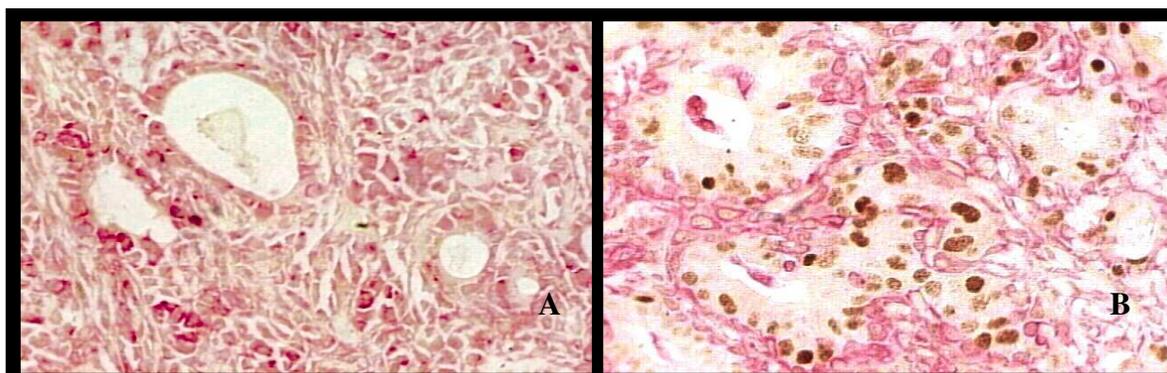


Figura 7- CXAP intracapsular (3430/99)- dupla coloração para vimentina (corada em vermelho) e p53 (corado em marrom), mostrando negatividade para p53 na área benigna (**figura A**) e positividade em células luminiais da área maligna (**figura B**). Células mioepiteliais (coradas em vermelho) negativas para p53.

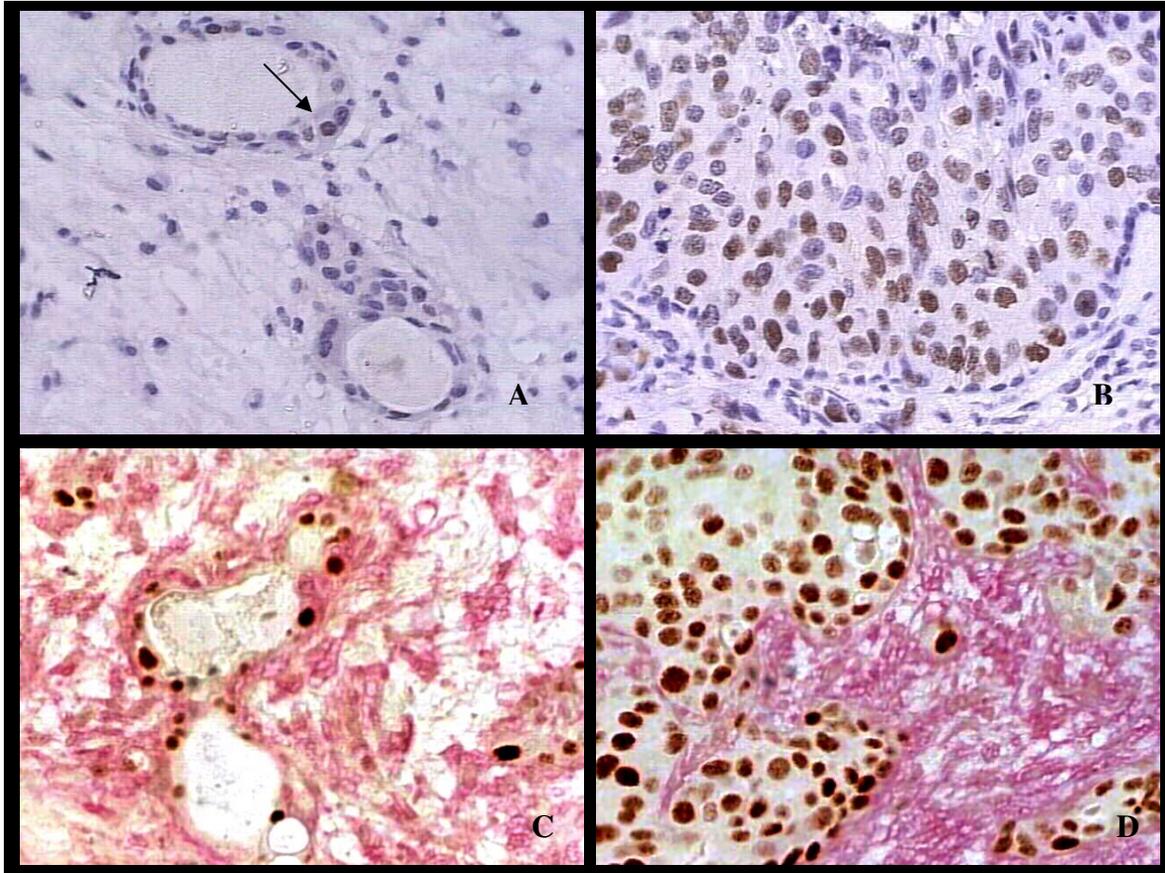


Figura 8- CXAP minimamente invasivo (8899/98): expressão imunoistoquímica de p53. Raras células luminais positivas na área benigna (A- seta, e C) e numerosas na maligna (B e D). **Figuras C e D** com dupla marcação imunoistoquímica para p53 (marrom) e vimentina (vermelha), realçando a positividade de p53 nas células luminais e negatividade nas mioepiteliais (coradas em vermelho).

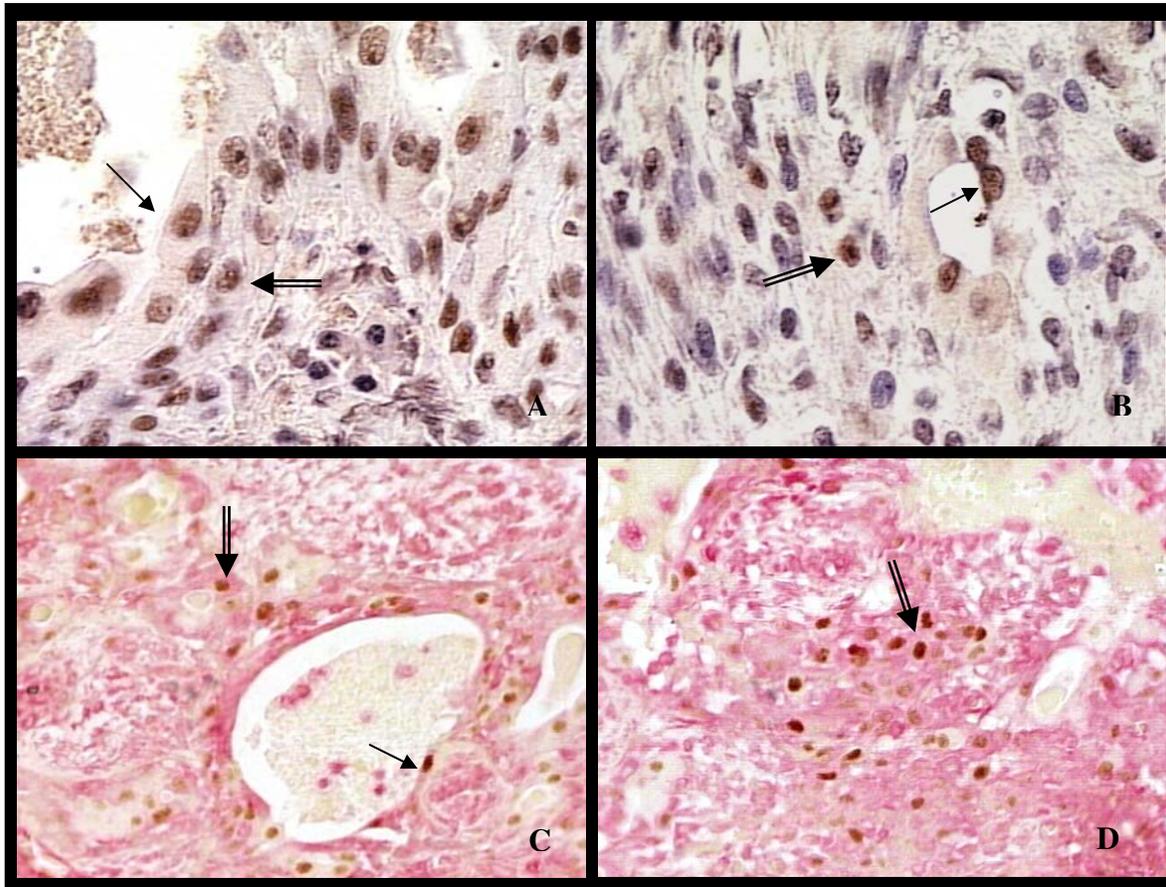


Figura 9- CXAP minimamente invasivo (27907), mostrando dupla população celular proliferada com positividade imunohistoquímica nuclear para p53, tanto em células luminais (seta simples **figuras A, B e C**) quanto em mioepiteliais (seta dupla, **figuras A a D**), o que fica mais evidente à dupla marcação imunohistoquímica para p53 (marrom) e vimentina (vermelha), nas **figuras C e D**.

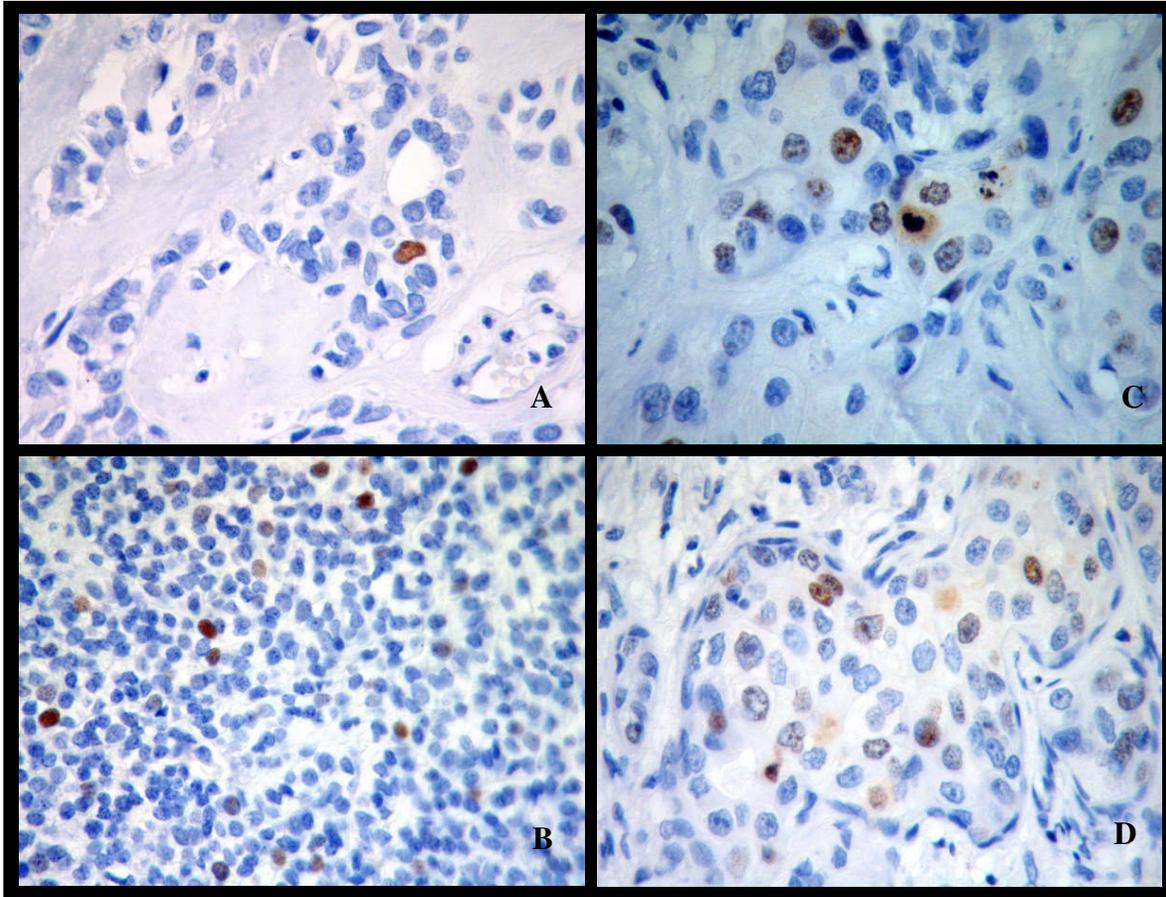


Figura 10- células positivas para Ki-67 (clone MIB-1) tanto nas áreas de adenoma pleomórfico residual (**figuras A e B**, caso 62586), inclusive em células mioepiteliais (**B**), como nas áreas malignas de CXAP (**figuras C e D**, caso 8899/98).

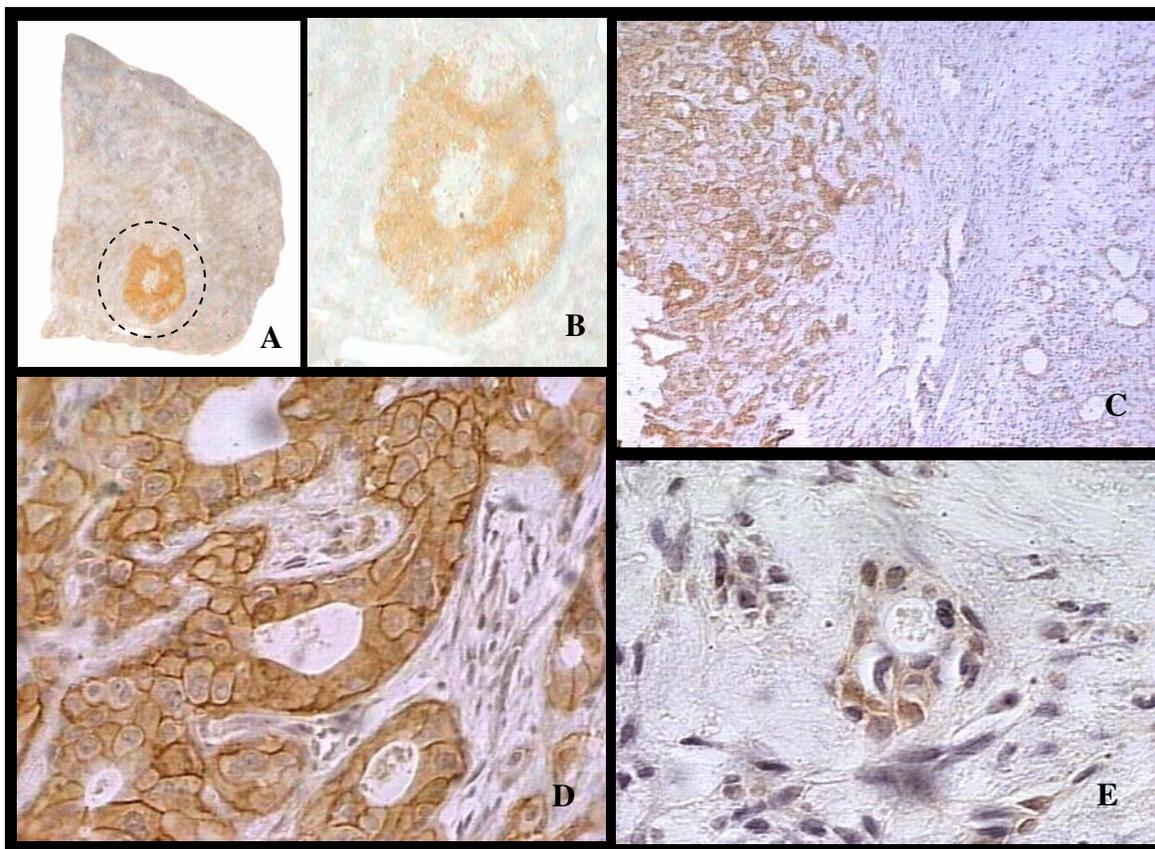


Figura 11- CXAP intracapsular (3430/99): c-erbB-2 positivo na área maligna (área circulada na **figura A** e em destaque na **figura B**, metade esquerda da **figura C** e **figura D**, com positividade de membrana forte e contínua – 3+) e negativo na benigna (**figura E**).

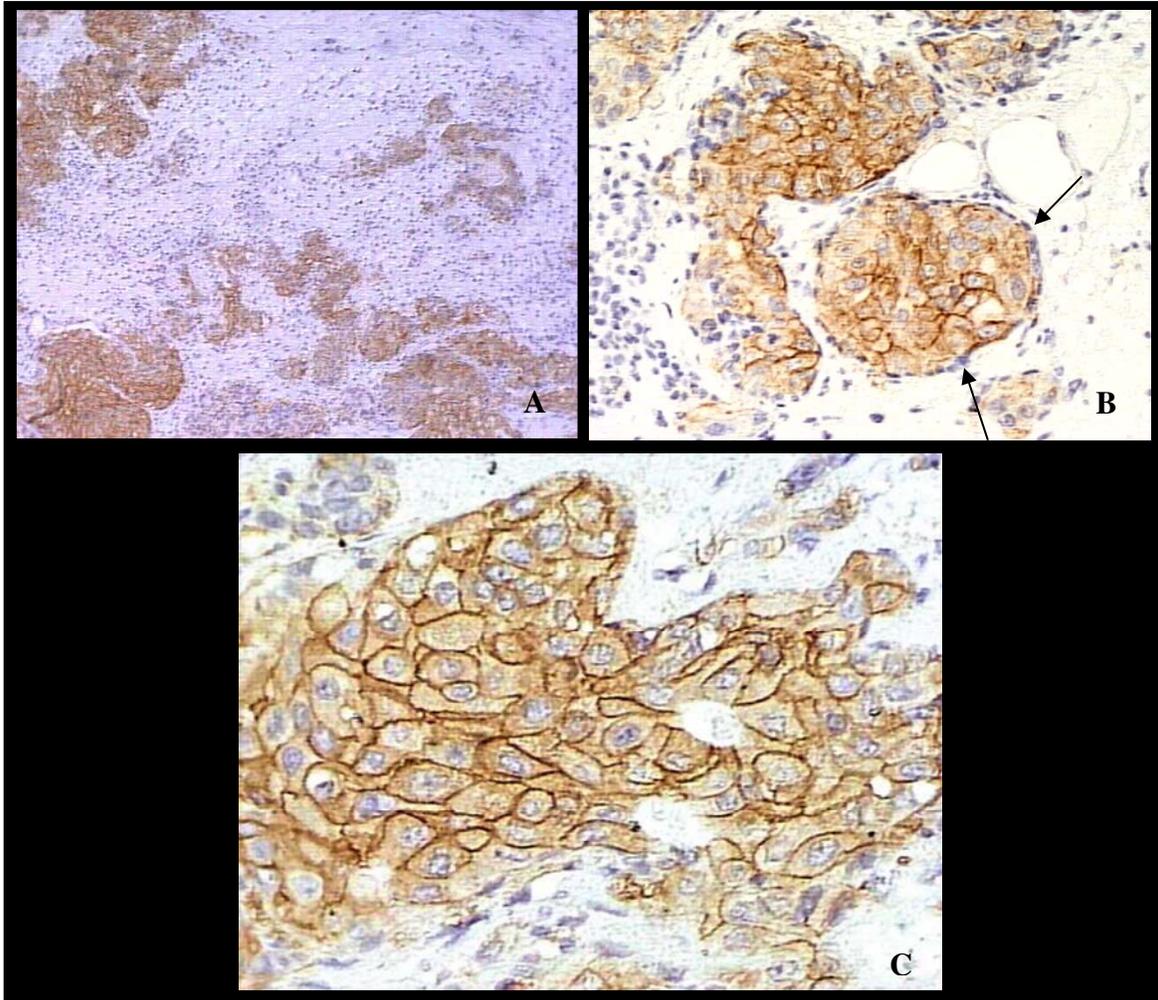


Figura 12- CXAP minimamente invasivo (8899/98) com forte expressão imunoistoquímica de c-erbB-2. **Figura A-** visão panorâmica, com mistura de áreas positivas (malignas) e negativas (benignas). **Figura B-** pormenor de área maligna ainda mantendo a camada externa de células mioepiteliais negativa para c-erbB-2 (setas simples). **Figura C-** forte positividade de membrana e contínua (3+) em área maligna.

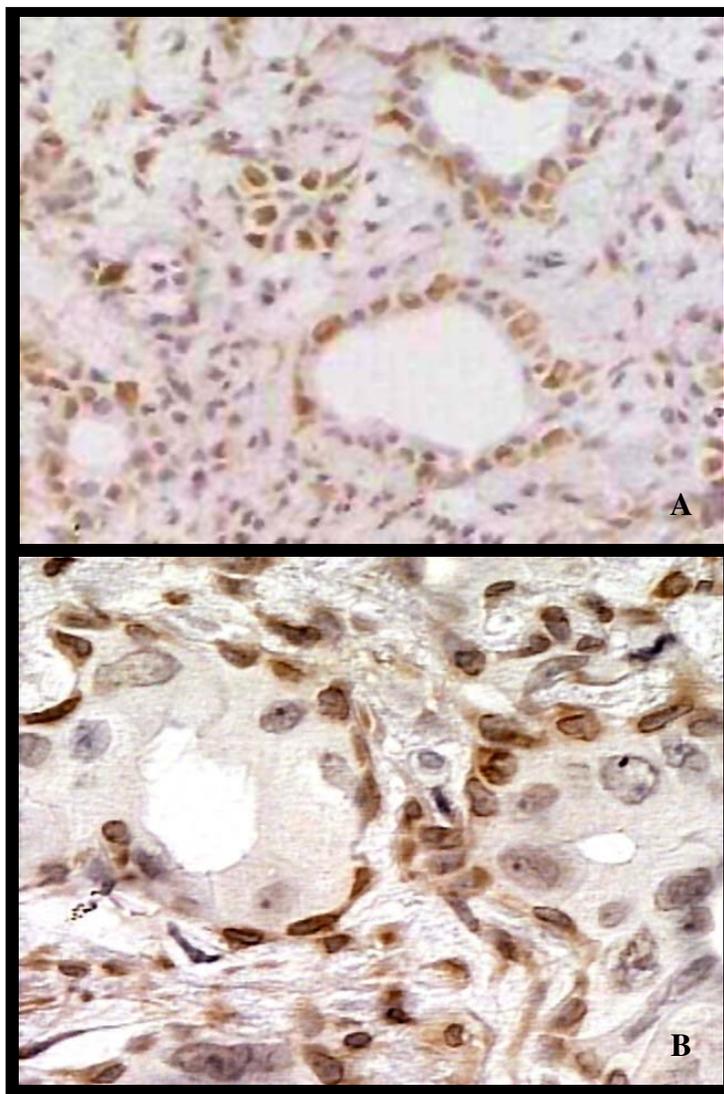


Figura 13- CXAP intracapsular (3430/99) - expressão de bcl-2 (corado em marrom) em células mioepiteliais de área benigna (**figura A**) e maligna (**figura B**).

Tabela 4- CXAP - marcadores imunohistoquímicos. Comparação entre áreas benignas e malignas.

Caso	Grupo	p53 (%)		Ki-67 (%)		c-erbB-2		bcl-2	
		B	M	B	M	B	M	B	M
1	I	8,0	26,5	2,2	5,9	1+	3+	(+) (Mi)	(+) (Mi) ^Φ
2	I	23,3	47,6	5,1	7,6	0	2+	(-)	(-)
3	I	13,5	28,1	0	2,3	0	0	(-)	(-)
4	I	0	0,7	1,6	3,3	0	1+	(-)	(-)
5	II	11,3	30,9	3,0	11,3	0	2+	(+) (L, Mi)	(+) (L)
6	II	16,7	57,9	2,0	11,4	1+	3+	(-)	(-)
7	II	0	34,6	1,4	3,2	0	3+	(-)	(-)
8	II	29,3	59,4	0,7	1,3	0	0	(-)	(+) (L, Mi)
9	III	NA	0	NA	10,4	NA	3+	NA	(-)
10	III	NA	0	NA	34,9	NA	3+	NA	(-)
11	III	NA	0	NA	9,1	NA	1+	NA	(-)
12	III*	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)
13	III	10	13,8	0,3	5,4	0	0	(-)	(+) (Mi)
14	III	6,4	31,5	3,8	8,3	0	0	(-)	(-)
15	III	1,9	11,5	0	8	0	0	(-)	(-)

Legenda- grupo I- CXAP intracapsular; grupo II- CXAP minimamente invasivo; grupo III- CXAP francamente invasivo; B- área benigna do CXAP; M- área maligna do CXAP; expressão do c-erbB-2: 0- negativo ou menos de 10% das células malignas com positividade de membrana, 1+- mais de 10% das células malignas com fraca e descontínua positividade de membrana, 2+- mais de 10% das células com positividade de membrana contínua de fraca a moderada intensidade, e 3+ - mais de 10% das células exibindo forte positividade de membrana contínua; (-) negativo; (+) positivo; NA- não avaliável; Mi- células mioepiteliais; L- células luminiais; *- caso com negatividade para todos os marcadores imunohistoquímicos, exceto vimentina; Φ- células mioepiteliais residuais das estruturas túbulo-ductais.

Tabela 5- Correlação entre as áreas benignas e malignas dos CXAPs precoces e o grupo controle.

Critérios	Grupo	Resultados	p*
Índice Mitótico*	CXAP		
	-Área benigna	0,38 (± 0,74)	> 0.05 ^a
	-Área maligna	6,0 (± 5,21)	0.047^b
	Grupo controle	0,59 (± 0,71)	0.0033^c
p53 (%)	CXAP		
	-Área benigna	12,76 (± 10,36)	0.0301^a
	-Área maligna	35,71 (± 19,23)	0.008^b
	Grupo controle	1,71 (± 2,25)	0.0012^c
Ki-67 (%)	CXAP		
	-Área benigna	2,00 (+ 1,55)	> 0.05 ^a
	-Área maligna	5,79 (+ 3,97)	0.008^b
	Grupo controle	2,85 (+ 1,86)	>0.05 ^c
c-erbB-2 (nº)	CXAP		
	-Área benigna	8 (0 ou +) / 0 (++ ou +++)	-
	-Área maligna	3 (0 ou +) / 5 (++ ou +++)	0.0007^c
	Grupo controle	17 (0 ou +) / 0 (++ ou +++)	-
Bcl-2 (nº)	CXAP		
	-Área benigna	6 (neg.) / 2 (pos.)	> 0.05 ^a
	-Área maligna	6 (neg.) / 2 (pos.)	> 0.05 ^c
	Grupo controle	6 (neg.) / 11 (pos.)	-

Legenda- ^a- *p* correlação entre áreas benignas do CXAP e o grupo controle; ^b- *p* correlação entre áreas benignas e malignas do CXAP; ^c- *p* correlação entre áreas malignas do CXAP e o grupo controle; *Índice Mitótico- número de mitoses em 10 campos de maior aumento; neg.- negativo; pos.- positivo.

5.3- Carcinomas francamente invasivos

Apesar da parótida também ser a glândula mais acometida neste grupo (3 casos), houve acometimento também das submandibulares (2 casos) e, apenas neste grupo, de glândulas salivares menores (2 casos). As mulheres também foram as mais afetadas (5 casos).

5.3.1- Análise Morfológica

Dentro deste grupo de carcinomas, encontramos uma divisão maior entre os tipos celulares envolvidos. Três casos apresentavam apenas o componente luminal proliferado nas áreas francamente invasivas, com atipias citológicas intensas. Todos estes 3 casos apresentavam o componente benigno completamente hialinizado, o que impossibilitou a análise nestas regiões dos demais critérios morfológicos, bem como dos imunoistoquímicos (Tabelas 2, 4 e 6).

Os outros 4 casos apresentavam células mioepiteliais malignas, isoladamente ou em associação com as células luminais (Figuras 14 e 15). Tais casos foram classificados como: CEM - dois casos, CMi - um caso e CSa - um caso. Três casos também apresentaram moderada ou intensa hialinização estromal, porém não o suficiente para impossibilitar a análise morfológica e imunoistoquímica. Nenhum dos casos apresentou atipias citológicas importantes nas áreas benignas, as quais só foram encontradas nos casos de CMi e CSa. Os dois casos de CEM não apresentaram atipias citológicas nem mesmo no componente carcinomatoso, sendo que em um deles o diagnóstico de malignidade só foi estabelecido pela nítida invasão perineural (figura 14). O índice mitótico foi maior nas áreas malignas que nas áreas benignas destes carcinomas, porém sem diferença estatística significativa (p: 0.250).

Tabela 6- Correlação entre as áreas benignas e malignas dos CXAPs francamente invasivos e o grupo controle.

Crítérios	Grupo	Resultados	p*
Índice Mitótico*	CXAP		
	-Área benigna	1,00 + 1,41	> 0.05 ^a
	-Área maligna	12,43 + 14,66	> 0.05 ^b
	Grupo controle	0,59 + 0,71	0.003^c
p53 (%)	CXAP		
	-Área benigna	4,58 + 4,50	> 0.05 ^a
	-Área maligna	8,11 + 11,93	> 0.05 ^b
	Grupo controle	1,71 + 2,25	>0.05 ^c
Ki-67 (%)	CXAP		
	-Área benigna	1,03 + 1,86	> 0.05 ^a
	-Área maligna	10,87 + 11,13	> 0.05 ^b
	Grupo controle	2,85 + 1,86	0.016^c
c-erbB-2 (nº)	CXAP		
	-Área benigna	4 (0 ou +) / 0 (++ ou +++)	> 0.05 ^a
	-Área maligna	5 (0 ou +) / 2 (++ ou +++)	> 0.05 ^b
	Grupo controle	17 (0 ou +) / 0(++ ou +++)	> 0.05 ^c
Bcl-2 (nº)	CXAP		
	-Área benigna	4 (neg.) / 0 (pos.)	0.024^a
	-Área maligna	6 (neg.) / 1(pos.)	-
	Grupo controle	6 (neg.) / 11(pos.)	> 0.05 ^c

Legenda- ^a- *p* correlação entre áreas benignas dos CXAPs e o grupo controle; ^b- *p* correlação entre áreas benignas e malignas dos CXAPs; ^c- *p* correlação entre áreas malignas dos CXAPs e o grupo controle; *Índice Mitótico- número de mitoses em 10 campos de maior aumento; neg.- negativo; pos.- positivo.

5.3.2- Análise Imunoistoquímica

Como anteriormente assinalado, a hialinização estromal extensa dos APs dos CXAPs com diferenciação luminal exclusiva impossibilitou a avaliação imunoistoquímica nestas regiões. Além disso, o CMi foi negativo para todos os anticorpos utilizados (exceto para vimentina), o que interpretamos como provável perda de antigenicidade para estes antígenos pesquisados. Todos estes fatos somados impossibilitaram uma melhor comparação estatística entre os grupos estudados. Não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre as áreas benignas e malignas dos CXAPs para nenhuma das proteínas estudadas.

A expressão de p53 foi encontrada apenas em 3 carcinomas com diferenciação mioepitelial, em todos acima de 10% (Figura 16). Entre os APs, variou entre 1,9% e 10%. Ao contrário dos CXAPs em fases precoces, os carcinomas francamente invasivos com diferenciação luminal exclusiva não foram p53-positivos. Porém, o índice proliferativo demonstrou o mesmo comportamento, elevado, sendo mais alto que nos CXAPs precoces. O c-erbB-2 foi positivo nos três casos de CXAPs com diferenciação luminal (em dois 3+ e no outro 1+) e negativo tanto nas áreas benignas de todos os CXAPs, quanto nas malignas daqueles com diferenciação mioepitelial (Figura 17). O bcl-2 foi positivo em apenas um caso de CEM, nas células mioepiteliais malignas (Figura 18). Os demais dados estão sumarizados nas Tabelas 4 e 6.

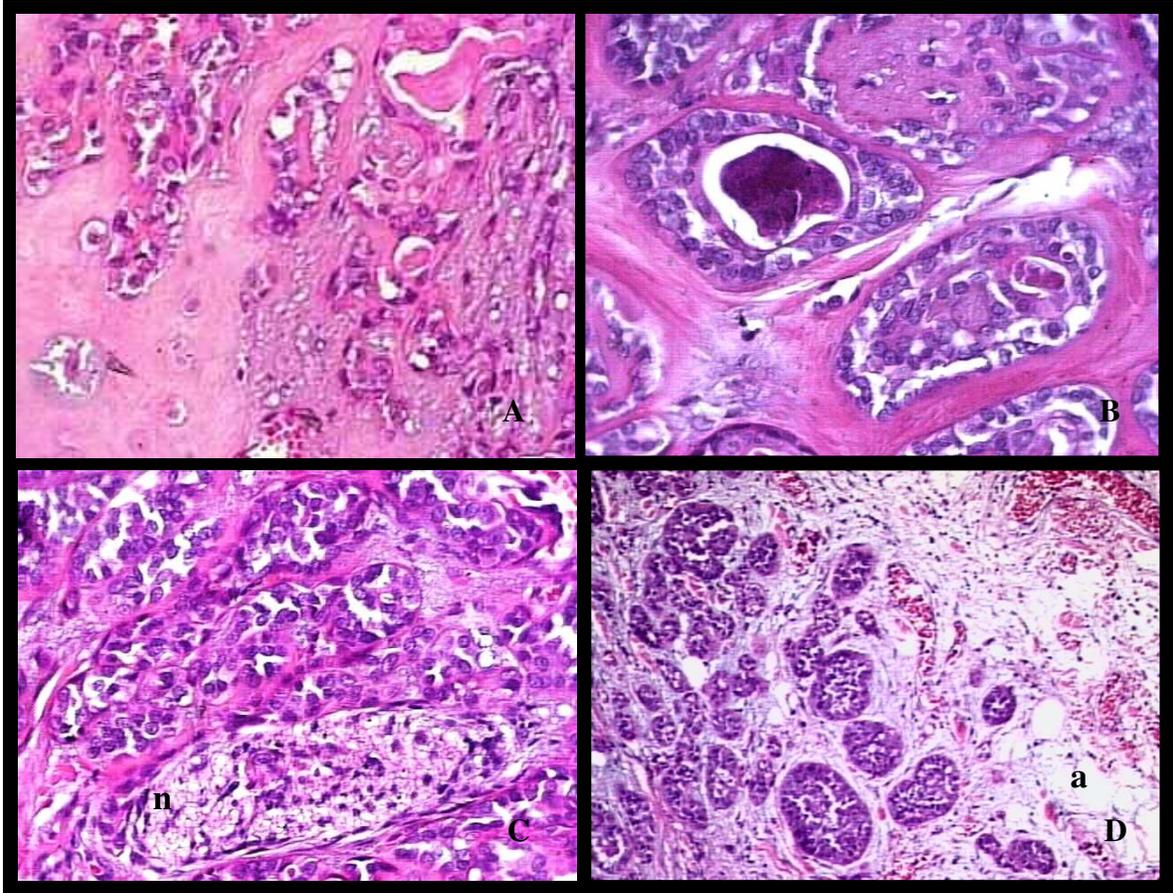


Figura 14- CXAP francamente invasivo (1164/01): áreas benigna (A) e maligna (B, C e D) sem atipias citológicas importantes, com invasão perineural (n- **figura C**) e do tecido adiposo (a) vizinho (**figura D**, coloração: HE).

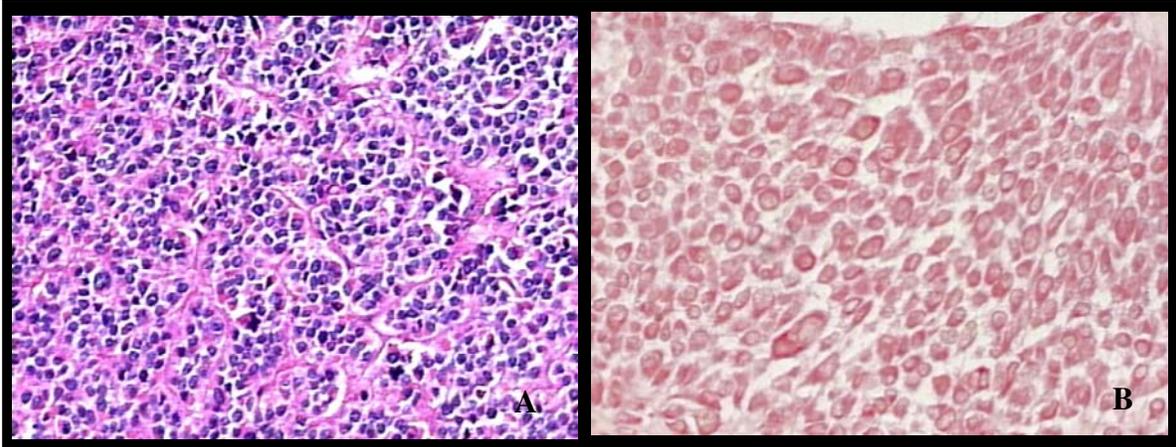


Figura 15- A- CXAP francamente invasivo (45988) com diferenciação mioepitelial única (carcinoma mioepitelial) (HE). **Figura B-** dupla marcação imunohistoquímica para p53 e vimentina (corada em vermelho), com negatividade para p53.

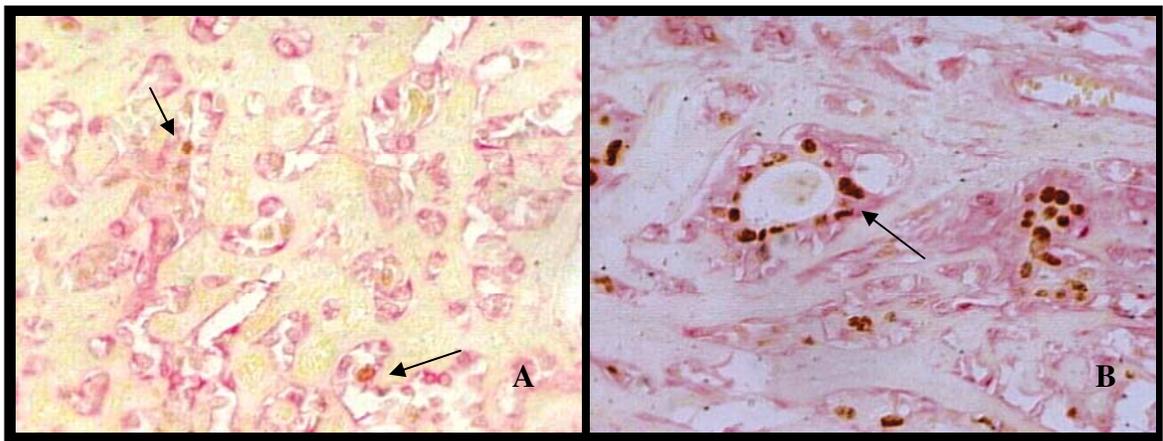


Figura 16- CXAP francamente invasivo (1164/01)- dupla marcação imunohistoquímica para vimentina (corada em vermelho) e p53 (corado em marrom). **A-** raras células luminiais positivas para p53 (setas). **B-** várias células positivas para p53 na área maligna, tanto luminiais (predominantes) quanto mioepiteliais (marcadas em vermelho, seta).

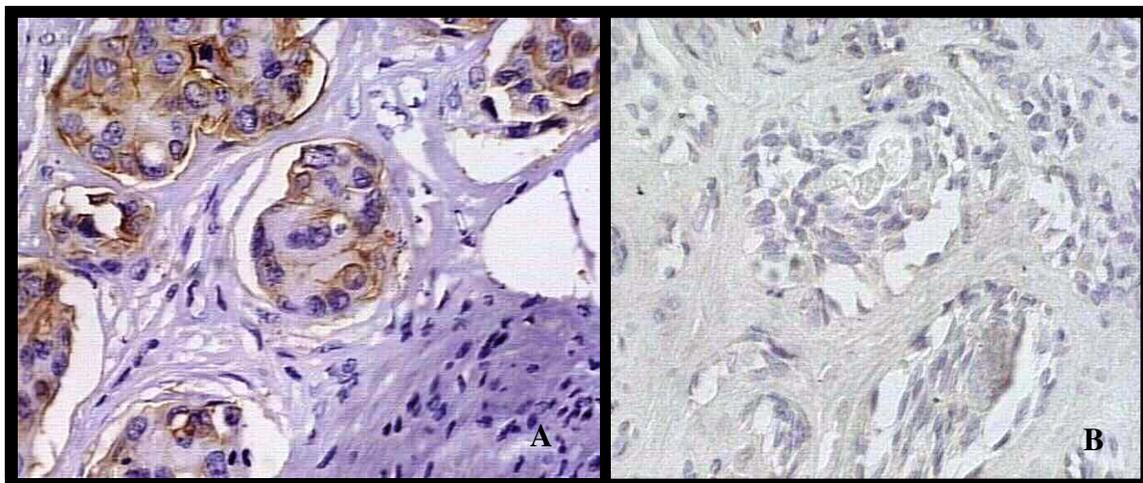


Figura 17- CXAPs francamente invasivos. **A-** carcinoma com diferenciação luminal exclusiva, c-erbB-2-positivo (12079/96). **B-** carcinoma epitelial-mioepitelial (1164/01) com negatividade imunoistoquímica para c-erbB-2.

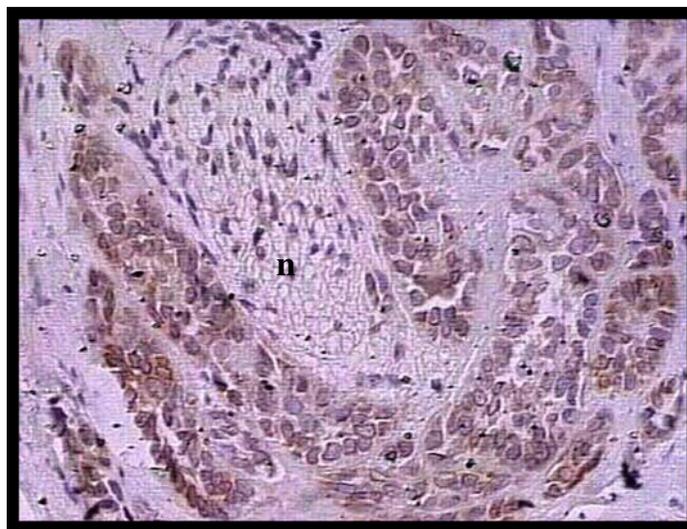


Figura 18- CXAP francamente invasivo (1164/01) com positividade imunoistoquímica em células mioepiteliais para proteína bcl-2 (n- nervo infiltrado pela neoplasia).

6- DISCUSSÃO

A carcinogênese é um processo que se faz em várias etapas, tanto a nível fenotípico quanto genético. Múltiplos genes e suas proteínas estão relacionados em uma ou mais vias com a promoção ou supressão tumoral (LI et al., 1997, COTRAN et al., 2000). O CXAP de glândulas salivares é uma neoplasia maligna agressiva definida como um tumor com características citológicas e histológicas de anaplasia, mitoses atípicas, curso progressivo e crescimento infiltrativo, no qual as evidências de um AP ainda podem ser encontradas (SEIFERT e SOBIN, 1991). Pela possibilidade de se observar na mesma lesão áreas benignas e malignas lado a lado, o CXAP torna-se um modelo interessante para se estudar a seqüência adenoma-adenocarcinoma. No entanto, o seu diagnóstico em fases precoces de malignização é difícil, especialmente quando as atipias citológicas são discretas e o índice mitótico é baixo (GNEPP et al., 2000). Para AUCLAIR e ELLIS (1996), APs com pequenas áreas atípicas completamente confinadas à cápsula são denominados apenas de adenomas pleomórficos atípicos, enquanto OHTAKE et al. (2002) descrevem células com núcleos bizarros com expressão de p53 e PCNA como carcinomas focais.

Na literatura, poucos são os trabalhos sobre a malignização do AP onde ambas as áreas, benigna e maligna, são dos mesmos tumores (RIGHI et al., 1994, BRANDWEIN et al., 1996, COSTA ROSA et al., 1996, YAMAMOTO et al., 1996, YAMAMOTO et al., 1998, EL-NAGAR et al., 2000, DI PALMA et al., 2005) e, mais raros ainda, são aqueles com séries exclusivas de CXAPs precoces (BRANDWEIN et al., 1996, DI PALMA et al., 2005). BRANDWEIN et al. (1996) estudaram 12 casos, sendo 4 intracapsulares e os demais minimamente invasivos (até 1,5 mm de extensão extra-capsular do componente carcinomatoso). Na maior e mais recente série exclusiva de casos não invasivos, DI PALMA et al. (2005) estudaram 11 casos, sendo 7 provenientes da República Tcheca e 4 oriundos de dois hospitais ingleses. Em nossa casuística, conseguimos reunir 15 casos de CXAP, avaliando simultaneamente áreas benignas e malignas, sendo 8 em fases precoces (4 intracapsulares ou não invasivos e 4 minimamente invasivos) e 7 francamente invasivos.

Apesar de qualquer subtipo histológico poder ser encontrado nos CXAPs (GNEPP et al., 2000) e os carcinomas de alto grau histológico (especialmente os adenocarcinomas ductal e s.o.e.) serem os mais freqüentes (LEWIS et al., 2001), a extensão da invasão do carcinoma além dos limites da cápsula do AP tem sido considerada como o

principal fator prognóstico nestas neoplasias (TORTOLEDO et al., 1984, BRANDWEIN et al., 1996, LEWIS et al., 2001). Em nossa casuística, classificamos como tumores minimamente invasivos aqueles com até 1,5 mm de extensão extra-capsular, à semelhança de BRANDWEIN et al. (1996), e comparamos a expressão imunoistoquímica de quatro proteínas (p53, c-erbB-2, bcl-2 e Ki-67) e critérios morfológicos (atipia citológica, índice mitótico, hialinização estromal e tipo celular envolvido) entre tumores em fase inicial (não invasivos e minimamente invasivos), fase avançada (invasão além de 1,5 mm) e APs que não sofreram malignização.

6.1- CXAPs em fase precoce de malignização

6.1.1- Critérios Morfológicos e Proliferação Celular

Em 1996, BRANDWEIN et al. (1996), estudando 12 casos de CXAP não invasivos ou com até 1,5 mm de invasão carcinomatosa extra-capsular, observaram que nenhum dos pacientes apresentou recidiva do carcinoma ou morreu com doença. Até então, eram considerados tumores minimamente invasivos aqueles com infiltração de até 8 mm (TORTOLEDO et al., 1984), e cujo comportamento biológico seria semelhante ao do próprio AP. Porém, LEWIS et al. (2001) mostraram que pacientes com tumores com 5 mm de extensão além da cápsula do AP progressivamente morreram com doença. O valor então de 1,5 mm passou a ser empregado como limite para se definir tumores com provável comportamento biológico indolente (DI PALMA et al., 2005), havendo apenas um relato na literatura de um CXAP intracapsular com metástase linfonodal (FELIX et al., 2002).

BRANDWEIN et al. (1996), em sua série, encontraram predomínio de mulheres (58%), a parótida foi a glândula mais acometida (75%) e a idade média dos pacientes foi de 55 anos (variou de 34 a 74 anos). Entre os pacientes com tumores não invasivos, a idade média foi 42,5 anos (variou de 34 a 65 anos) e entre os minimamente invasivos, 60,5 anos (variando de 35 a 74 anos). Estes dados são em muito semelhantes aos nossos, uma vez que também encontramos acometimento preferencial de parótidas (62,5%), de mulheres (75%) e com média de idade de 57,5 anos (variou de 37 a 89 anos).

Entre os nossos casos intracapsulares, a idade variou de 37 a 58 anos (média: 47,2 anos) e entre os minimamente invasivos variou de 43 a 89 anos (média: 67,7 anos). Na série de DI PALMA et al. (2005), as parótidas (91%) de homens (63,6%) com idade média de 62 anos foram as mais freqüentemente acometidas.

“O desenvolvimento do carcinoma dentro do AP é parcialmente dependente do tempo” (DI PALMA et al., 2005), aumentando à medida que aumenta a duração do AP (AUCLAIR e ELLIS, 1996). Assim, entende-se porque a faixa etária aumenta entre uma e três décadas quando se comparam as idades médias dos pacientes com AP (35,6 anos em nossa série) com aqueles com CXAP intracapsulares, minimamente invasivos e francamente invasivos, respectivamente em nossa série: 47,2, 67,7 e 70 anos. Os pacientes da série de AUCLAIR e ELLIS (1996) que sofreram malignização do AP eram, em média, 12 anos mais velhos que aqueles que não malignizaram.

Avaliando critérios morfológicos que pudessem se associar com malignização em APs, AUCLAIR e ELLIS (1996) observaram que apenas hialinização estromal demonstrou correlação com tal processo. Hiper celularidade, violação da cápsula, anaplasia celular, necrose e índice mitótico foram os outros critérios avaliados, mas que não demonstraram diferença estatística. Enquanto BRANDWEIN et al. (1996) encontraram extensa hialinização na maioria dos seus casos, pouco mais de um terço dos casos precoces da nossa série e daquela de DI PALMA et al. (2005) (37,5 e 36,3%, respectivamente) apresentavam este achado morfológico, o que na nossa série foi estatisticamente diferente (*kappa*: 0,1429) quando comparado ao grupo controle.

Os APs podem apresentar amplo espectro morfológico, desde lesões ricamente celulares até aquelas extensamente mixóides, sem diferença quanto ao tratamento exigido (ELLIS e AUCLAIR, 1996). Irregularidades da cápsula, com áreas finas, de interrupção e com emissão de prolongamentos (“pseudópodes”) extra-capsulares são encontradas com freqüência nos APs, especialmente nos mixóides (STENNERT et al., 2001). Para AUCLAIR e ELLIS (1996), estas violações da cápsula apenas indiretamente aumentam a chance de malignização por aumentarem as chances de recidiva. Focos de necrose podem ser encontrados nos APs e são decorrentes ou de procedimentos prévios (manipulação, punções) ou mesmo por isquemia tecidual. As áreas mixóides dos APs são consideradas áreas de hipóxia, pouco vascularizadas (SWELAN et al., 2005).

Apesar de não ter havido diferença estatística na série de AUCLAIR e ELLIS (1996) quanto ao índice mitótico entre os casos que sofreram malignização e aqueles que não sofreram, o valor médio deste índice foi o dobro no primeiro grupo (1,5 *versus* 0,66). Em nossa casuística, tanto o número de mitoses quanto a proliferação celular avaliada pelo marcador Ki-67 (clone MIB-1), foi maior nas áreas malignas do que nas benignas dos CXAPs e no grupo controle, especialmente nos tumores com diferenciação luminal exclusiva. O índice proliferativo, de nossa casuística, exceto pelo único caso de baixo grau histológico, foi importante para se distinguir áreas malignas de benignas nestes tumores em fases iniciais de malignização, o mesmo observado por DI PALMA et al. (2005).

Apesar das células mioepiteliais predominarem no AP, a malignização acomete preferencialmente as células luminais (DI PALMA e GUZZO, 1993, DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001). Em sete de nossos 8 casos, apenas este subtipo citológico (luminal) mostrou-se atípico, com células grandes e eosinófilas atapetando estruturas tubulares, com atipias nucleares marcadas e com freqüentes mitoses. Tais achados caracterizaram estas neoplasias como de alto grau histológico e assemelharam-se àquelas do carcinoma ductal, um dos subtipos histológicos mais freqüentes entre os CXAPs (LEWIS et al., 2001). Este tipo histológico foi também o mais freqüentemente encontrado por DI PALMA et al. (2005) e assemelha-se ao descrito por FELIX et al. (2002) no caso de CXAP intracapsular com metástase linfonodal. O único caso por nós classificado como um carcinoma de baixo grau histológico, com atipias citológicas brandas e baixos índices mitótico e proliferativo, exibiu altíssima expressão de p53, suficiente para caracterizá-lo como maligno.

6.1.2- Marcadores Moleculares (p53, c-erbB-2 e bcl-2)

6.1.2.1- p53

RIGHI et al. (1994) foram os primeiros a demonstrar a mesma mutação no gene *p53* num CXAP e no AP pregresso. Desde então, diversos trabalhos têm mostrado alterações genéticas como perda de heterozigose e mutações deste gene supressor tumoral e a superexpressão da proteína mutada *p53* na transformação maligna do AP. Enquanto nos APs, a freqüência de imunoexpressão da proteína varia de 0% a 41% (SOINI et al., 1992,

DEGUCHI et al., 1993, ISHII e NAKAJIMA, 1994, RIGHI et al., 1994, GALLO et al., 1995, KARJA et al., 1997, LI et al., 1997, ROSA et al., 1997, YAMAMOTO et al., 1998, NORDKVIST et al., 2000, OHTAKE et al., 2002), nos CXAPs esta expressão tem variado de 33% a 75% (DEGUCHI et al., 1993, ISHII e NAKAJIMA, 1994, RIGHI et al., 1994, GALLO et al., 1995, KAMIO, 1996, KARJA et al., 1997, LI et al., 1997, YAMAMOTO et al., 1998, LEWIS et al., 2001). No entanto, a maioria destes trabalhos foi realizada em CXAPs em diversos estágios evolutivos, englobando desde formas intracapsulares até tumores francamente invasivos. Além disso, a maioria correlacionou dois grupos distintos de lesão: CXAP *versus* AP. Poucos são os trabalhos exclusivos com CXAPs que comparam, na mesma lesão, as áreas benignas e as áreas malignas (RIGHI et al., 1994, YAMAMOTO et al., 1998, FELIX et al., 2002) e que especificam qual o tipo citológico envolvido. Destes, o único com CXAP não invasivo é o relato de caso de FELIX et al. (2002), não havendo nenhuma série de casos em fases precoces de malignização. O carcinoma não invasivo relatado por estes autores era uma lesão de alto grau histológico, semelhante à maioria dos nossos casos, e com forte expressão de p53 e c-erbB-2 (FELIX et al., 2002)

Numa abordagem diferente dos demais trabalhos da literatura, OHTAKE et al. (2002) estudaram a expressão de p53 e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), um marcador imunistoquímico de atividade mitótica, em células atípicas isoladas em APs. Tais células atípicas com positividade para p53 e/ou PCNA foram encontradas em mais de 50% dos casos, especialmente em áreas sólidas de células mioepiteliais. Em apenas 5,9% dos casos formavam pequenos focos carcinomatosos de até 1 mm de diâmetro. Esta frequência encontra-se dentro da esperada para a malignização do AP, a qual pode chegar a 25% dos casos, dependendo do tempo de evolução da doença (AUCLAIR e ELLIS, 1996, GNEPP et al., 2000). Porém, OHTAKE et al. (2002) não relataram qual a quantidade de células positivas para p53 e/ou PCNA nestes focos para que tenham sido considerados positivos. Para alguns autores, o encontro de células isoladas p53-positivo estaria relacionado à estabilização/acumulação da proteína na sua forma natural e não necessariamente correspondendo a uma mutação do gene *p53*, sendo considerados verdadeiramente positivos os casos com mais de 10% das células marcadas (ROSA et al., 1997).

Em nossa casuística, a imunexpressão da proteína p53 foi muito mais freqüente nas áreas malignas dos CXAPs ($35,71\% \pm 19,23$) quando comparadas com as áreas benignas ($12,76\% \pm 10,36$) e com o grupo controle ($1,71 \pm 2,25$), havendo diferença estatística também entre estes dois grupos. Com a dupla marcação imunoistoquímica, utilizando os anticorpos anti-p53 e anti-vimentina, um marcador usualmente utilizado para células mioepiteliais (ARAÚJO et al., 1994, FURUSE et al., 2005), demonstramos que a maior expressão de p53 ocorreu entre as células luminais atípicas das estruturas túbulo-ductais, com apenas raras células mioepiteliais residuais p53-positivas. Sete dos nossos 8 casos precoces apresentavam mais de 10% de células atípicas positivas nas áreas malignas dos CXAPs.

ROSA et al. (1997) estudaram exclusivamente carcinomas de glândula salivar de baixo grau histológico (tumores com diferenciação mioepitelial) e neoplasias benignas também com diferenciação mioepitelial (AP e mioepiteliomas), inclusive com tumores recidivantes. Apenas dois tumores benignos (1,5%) apresentaram mais de 10% de células p53-positivas, um deles um AP com positividade apenas na sua segunda recidiva. Já entre os tumores malignos, 10% dos casos foram positivos, com positividade difusa, sem predileção por tipo celular (luminal ou mioepitelial) e sem preferência por subtipo histológico. Apesar de 58,8% dos nossos APs do grupo controle apresentarem células positivas para p53, em nenhum esta positividade foi maior do que 10%, ao passo que 5 das áreas benignas dos CXAPs já superexpressavam p53, apesar de não apresentarem critérios citológicos de malignidade. Portanto, ao contrário de ROSA et al. (1997) e KARJA et al. (1997), concordamos com os dados da literatura que apontam a participação desta proteína na transformação maligna do AP (DEGUCHI et al., 1993, YAMAMOTO et al., 1998, OHTAKE et al., 2002), apesar de outros genes também poderem estar envolvidos neste processo (YAMAMOTO et al., 1996).

Assim, corroboramos os dados da literatura que mostram que as células luminais são as mais comumente afetadas na malignização do AP, apesar de serem numericamente inferiores que as mioepiteliais (DI PALMA e GUZZO, 1993, DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001). Entretanto, permanecem desconhecidos os motivos que levam estas células a desencadarem o processo carcinogênico. Nossos achados sugerem

também que a proteína p53 esteja envolvida já nas fases mais precoces do processo de malignização do AP, com forte expressão em áreas ainda sem critérios citológicos suficientes para o diagnóstico de carcinoma. Estas áreas eram vizinhas daquelas com aspecto morfológico de carcinoma e podem ser consideradas transicionais, ou seja, morfológicamente benignas, porém com acúmulo significativo de proteína p53.

6.1.2.2- c-erbB-2

Assim como para o p53, poucos são os trabalhos na literatura com séries exclusivas de CXAP comparando a expressão imunoistoquímica da proteína c-erbB-2 nas áreas benignas e malignas (COSTA ROSA et al., 1996, DI PALMA et al., 2005). Em trabalho recentemente publicado, DI PALMA et al. (2005) mostraram que formas intracapsulares do CXAP expressavam fortemente a proteína c-erbB-2, desde que apresentassem feições citológicas de lesão de alto grau. Ou seja, tais tumores precoces eram constituídos por células moderada a intensamente atípicas, com citoplasma eosinófilo abundante, núcleo vesiculoso e nucléolo evidente. Os dois casos negativos para c-erbB-2, entre os 11 por eles estudados, mostravam diferenciação mioepitelial. Tais achados confirmam os previamente relatados por COSTA ROSA et al. (1996), onde todos os tumores c-erbB-2-positivos eram do subtipo adenocarcinoma s.o.e.. Por sua vez, os tumores com diferenciação mioepitelial e as áreas benignas de AP foram negativos para c-erbB-2 (COSTA ROSA et al., 1996), o que foi novamente demonstrado em trabalho do mesmo grupo em tumores com diferenciação mioepitelial (ROSA et al., 1997).

Nossos achados reforçam tais dados da literatura, sendo o c-erbB-2 um importante e precoce marcador de transformação maligna do AP. Cinco de nossos 8 casos apresentaram forte expressão de c-erbB-2 em células luminais das áreas malignas. As células mioepiteliais e as áreas benignas dos CXAPs, bem como todos os casos do grupo controle, foram negativas. Ao contrário do p53, a positividade exclusiva em células luminais corrobora a idéia de que exista mais de uma via de malignização no AP (YAMAMOTO et al., 1996, ROSA et al., 1997, DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001) e que o c-erbB-2 esteja envolvido na gênese de carcinomas com diferenciação

epitelial luminal, os quais são os subtipos mais freqüentemente encontrados (LEWIS et al., 2001, COSTA ROSA et al., 1996).

A expressão de c-erbB-2 tem sido demonstrada numa freqüência que varia entre 21% e 47% dos CXAPs (LEWIS et al., 2001). Tal expressão usualmente relaciona-se com o subtipo histológico, sendo normalmente encontrada nos tumores de alto grau histológico, sem diferenciação mioepitelial (COSTA ROSA et al., 1996, ROSA et al., 1997). Enquanto para LEWIS et al. (2001), a expressão de c-erbB-2 não influenciou no prognóstico, os 4 casos positivos de COSTA ROSA et al. (1996) tiveram um péssimo prognóstico, com óbito pela doença, o que confirmou dados prévios da literatura (SUGANO et al., 1992). No relato de FELIX et al. (2002), o carcinoma intracapsular com metástase linfonodal tinha feições de alto grau histológico e expressava fortemente c-erbB-2, fato semelhante ao por nós encontrado em 2 dos intracapsulares e em 3 dos CXAPs minimamente invasivos. No entanto, KERNOHAN et al. (1991) não conseguiu demonstrar tal associação, apesar de 4 dos 5 (80%) pacientes com carcinomas c-erbB-2-positivos terem morrido com doença em atividade. Estes autores atribuíram a ausência de correlação ao pequeno número de casos em cada subtipo histológico estudado e ao fato de que 12% dos outros pacientes com tumores c-erbB-2-negativos também morreram com doença ativa. Em nossa casuística não conseguimos estabelecer correlação com prognóstico, especialmente pelo fato da maioria dos pacientes ter seu seguimento interrompido.

Um dos subtipos histológicos mais freqüentes dos CXAPs é o carcinoma dos ductos salivares (TORTOLEDO et al., 1984, GNEPP et al., 2000, DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001, LEWIS et al., 2001). Considerado como neoplasia agressiva e carcinoma de alto grau histológico, este tumor caracteriza-se por apresentar arranjo ductal, cribriforme ou sólido e estruturas túbulo-ductais, as quais lhe conferem um aspecto de carcinoma *in situ* (GRENKO et al., 1995, DE ARAÚJO et al., 2002). Pode originar-se *de novo*, a partir de um AP prévio ou ainda como evolução de um carcinoma de baixo grau histológico (DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001). Assemelha-se morfologicamente ao carcinoma ductal mamário, com células grandes, de citoplasma amplo e eosinófilo, com núcleos vesiculosos, nucléolo evidente e, por vezes,

com áreas de necrose comedo-símile (GRENKO et al., 1995, LEWIS et al., 1996, SKALOVA et al., 2001). Caracteriza-se também pela expressão freqüente de p53, c-erbB-2 e receptor de andrógeno (FELIX et al., 1996, NASSER et al., 2003), porém, é usualmente negativo para receptores hormonais de estrógeno e progesterona (LEWIS et al., 1996, SKALOVA et al., 2001, NASSER et al., 2003).

Sete dos nossos 8 CXAPs precoces apresentavam áreas malignas com fenótipo agressivo, com estruturas túbulo-ductais revestidas por células luminais moderada a intensamente atípicas e, em determinados trechos, com revestimento mioepitelial preservado (dando a estas áreas o aspecto de carcinoma *in situ*). Em cinco destes casos, tais células foram positivas para c-erbB-2 e p53. Todos estes achados tornam nossos carcinomas precoces de alto grau histológico semelhantes ao carcinoma dos ductos salivares, um subtipo sabidamente mais agressivo (GRENKO et al., 1995, DELGADO e ALBORES-SAAVEDRA, 2001). Assemelha-se também ao carcinoma previamente descrito por FELIX et al. (2002), o qual apresentou metástase mesmo estando completamente confinado à cápsula do AP, aos carcinomas de alto grau histológico descritos por COSTA ROSA et al. (1996) e também aos 9 casos c-erbB-2-positivos descritos por DI PALMA et al. (2005). Apesar de ainda em fases precoces, estes tumores deste subtipo usualmente tão agressivo, não estão livres de um comportamento mais agressivo, como no inusitado relato de FELIX et al. (2002), e necessitam de uma correta classificação.

6.1.2.3- bcl-2

Proteína de ação inibitória da apoptose, a bcl-2 tem sido demonstrada em células indiferenciadas em associação com imaturidade (HOCKENBERY et al., 1993). Em glândulas salivares normais, foi demonstrada em células basais de ductos excretores e estriados, conferindo-lhes um aspecto de células de reserva (PAMMER et al., 1995). Em CXAP, sua expressão tem sido raramente estudada, não havendo trabalhos na literatura com tumores em fases precoces de malignização. SUNARDHI-WIDYAPUTRA e VAN DAMME (1995) encontraram forte expressão desta proteína na periferia de áreas

malignas e benignas de CXAP. Entretanto, apenas 2 (25%) de nossos CXAPs mostraram positividade fraca e focal, ao passo que nos APs do grupo controle a positividade foi observada em 11 casos (64,7%), preferencialmente em células mioepiteliais das estruturas túbulo-ductais e de áreas sólidas, como previamente descrito (SOINI et al., 1998, DEBIEC-RICHTER et al., 2001, DA CRUZ PEREZ et al., 2004).

Apesar da proteína bcl-2 ter sido considerada de ação importante na gênese do AP (PAMMER et al., 1995, DA CRUZ PEREZ et al., 2004), os nossos achados não apóiam que o acúmulo de bcl-2 tenha participação na transformação maligna deste tumor.

6.2- CXAPs francamente invasivos

6.2.1- Critérios Morfológicos e Proliferação Celular

Como já mencionado, os trabalhos na literatura com séries exclusivas de CXAP são poucos (RIGHI et al., 1994, BRANDWEIN et al., 1996, COSTA ROSA et al., 1996, YAMAMOTO et al., 1996, YAMAMOTO et al., 1998, EL-NAGAR et al., 2000, LEWIS et al., 2001, DI PALMA et al., 2005), sendo a maioria com carcinomas ou em vários estágios de evolução (intracapsulares, minimamente invasivos e francamente invasivos) ou apenas francamente invasivos. Entre nossos casos, 7 (46,7%) apresentavam-se já ao diagnóstico com invasão além de 1,5 mm da cápsula do AP prévio, alguns dos quais infiltrando até o osso.

Na série de 73 CXAPs de LEWIS et al. (2001) foram encontrados oito subtipos histológicos de carcinoma, sendo a maioria representada por carcinomas de alto grau histológico (adenocarcinomas s.o.e. e carcinoma ductal) e apenas alguns poucos casos com diferenciação mioepitelial: 3 CAC, 2 CMi, um CEM e um CSa. Na série de COSTA ROSA et al. (1996) 6 entre 19 casos (31,5%) apresentavam isolada ou concomitantemente componente neoplásico com feição mioepitelial. Entre nossos casos francamente invasivos, encontramos dois subgrupos distintos: um composto por 3 carcinomas com diferenciação luminal exclusiva e outro constituído por 4 carcinomas com diferenciação mioepitelial, sendo 2 CEMs, um CMi e um CSa.

Carcinomas mioepiteliais originados de AP são raros (McCLUGGAGE et al., 1998). Na série de LEWIS et al. (2001) foram 2 casos, na de COSTA ROSA et al. (1996) apenas um. Apesar de serem tidos como de comportamento mais indolente do que quando surgem *de novo* (DI PALMA e GUZZO, 1993, McCLUGGAGE et al., 1998), o nosso único caso de carcinoma mioepitelial teve um comportamento agressivo, com óbito pela doença.

Apesar da parótida também ser a glândula mais acometida entre estes carcinomas (3 casos), observamos aqui um acometimento de glândulas salivares menores do palato em dois casos de carcinomas com diferenciação mioepitelial (um CEM e um CMi). Estes tumores apresentavam-se já ao diagnóstico com invasão óssea e comportaram-se agressivamente, levando ambos os pacientes ao óbito. O sexo feminino também foi o mais acometido (71,5%) e a idade média, conforme já comentado, foi de 70 anos (variou de 55 a 86 anos).

A hialinização estromal, um achado morfológico relacionado à malignização do AP (AUCLAIR e ELLIS, 1996) e encontrado em 92% da série de LEWIS et al. (2001), foi encontrada também em 6 (85,7%) dos nossos casos francamente invasivos. Esta frequência é bem maior que a encontrada entre os tumores em fases precoces (37,5%) e deve correlacionar-se muito provavelmente ao tempo de evolução destas neoplasias. Assim, entendemos porque a transformação maligna é dependente de tempo (DI PALMA et al., 2005) e corroboramos as conclusões de AUCLAIR e ELLIS (1996) quanto aos critérios morfológicos associados à malignização do AP. Nos 3 CXAPs com diferenciação luminal, o AP prévio restringia-se a pequenos nódulos escleróticos acelulares, onde não se pôde avaliar nenhum outro critério morfológico ou imunoistoquímico.

Entre os carcinomas em fases precoces de malignização, as atipias celulares foram importantes para se distinguir entre áreas benignas e malignas. Já neste grupo de carcinomas, os tumores com diferenciação luminal, o CMi e o CSa apresentavam atipias citológicas moderadas ou intensas. Porém, os dois casos de CEM não apresentam atipias que diferenciavam as áreas benignas das malignas. No entanto, o caráter invasivo era evidente e, em um deles, foi decisivo para o diagnóstico. Segundo DI PALMA e GUZZO (1993), índice mitótico elevado e caráter invasivo são os critérios mais importantes para o diagnóstico de malignidade em neoplasias com diferenciação mioepitelial-símile.

Apesar dos tumores com diferenciação mioepitelial serem considerados neoplasias de baixo grau histológico (ROSA et al., 1997), em nossa série a maioria destes tumores já era francamente invasiva no momento do diagnóstico. Provavelmente, o maior número de casos nesta fase evolutiva se justifique exatamente pela dificuldade de se identificar morfológicamente estes tumores em etapas mais precoces, uma vez que atipias citológicas podem ser inexistentes ou comparáveis às usualmente encontradas nos APs. Nestas neoplasias com diferenciação mioepitelial, o caráter infiltrativo seria o único critério seguro de malignidade (GNEPP et al., 2000), o qual, entretanto, está ausente nas lesões intracapsulares. Conforme anteriormente comentado, o único caso de CXAP em fase precoce de malignização com diferenciação mioepitelial concomitante, apesar de não exibir atipias citológicas importantes, mostrou alta expressão de p53, sendo este um importante critério diagnóstico.

Os índices mitótico e proliferativo (avaliado pelo Ki-67) também foram diferentes entre os dois subgrupos desta categoria. Enquanto os carcinomas com diferenciação luminal apresentavam numerosas mitoses (em média 16,6 em 10 campos de maior aumento) e alto índice proliferativo (em média 18,1%), o subgrupo com diferenciação mioepitelial exibia números menores (índice mitótico médio de 9,25 e índice proliferativo médio de 7,2%). Porém, as áreas benignas deste último subgrupo apresentavam valores médios menores ainda, semelhantes aos do grupo controle. Comparando-se as áreas malignas do CXAP francamente invasivos e o grupo controle, observamos diferenças significativas nos índices mitótico e proliferativo (p: 0.003 e p: 0.016, respectivamente).

6.2.2- Marcadores Moleculares (p53, c-erbB-2 e bcl-2)

6.2.2.1- p53

Cerca de 50% dos tumores humanos têm mutações no gene *p53* e, nos demais, parece haver defeitos de ativação ou resposta ao *p53*. Assim, pode-se supor que todas as células cancerígenas têm o “sistema p53” disfuncional, englobando tanto a própria

p53 como as proteínas a ela associadas, bem como os seus sistemas reguladores e efetores (YANG et al., 2004). A participação da proteína p53 na transformação maligna do AP ficou bem demonstrada quando avaliamos os CXAPs precoces, com alta positividade especialmente em células luminais. Além disso, as lesões precursoras destes CXAPs (suas áreas benignas) também já demonstravam alta porcentagem de células luminais p53-positivas, diferentemente do grupo controle. À semelhança do que ocorreu com os CXAPs precoces, esperávamos encontrar alta expressão de p53 entre os tumores francamente invasivos com diferenciação luminal isolada, fato que não ocorreu.

A não expressão de p53 por estes três CXAPs francamente invasivos com diferenciação luminal exclusiva poderia ser explicada por uma ou mais das seguintes hipóteses: 1) ativação ou inibição de algum outro gene ou proteína relacionado ao “sistema p53”, fazendo com que a expressão da proteína p53 fosse mascarada nesta fase evolutiva da doença; 2) falha no método imunistoquímico em detectar a proteína levando a resultados falso-negativos, apesar das reações terem sido realizadas com controles externos positivos e da existência de outros casos positivos na mesma bateria imunistoquímica; e 3) tratam-se, simplesmente, de casos realmente negativos.

Favorecendo a primeira hipótese, a de que a ativação ou inibição de algum outro gene ou proteína poderia ter mascarado a expressão da p53, sabe-se que a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas onde podem ocorrer alterações cromossômicas, genéticas e de expressão de várias proteínas (LI et al., 1997). O próprio controle dos níveis celulares da p53 é complexo, envolvendo vários genes e proteínas. Quando ativada, a proteína p53 liga-se ao DNA e ativa uma série de genes, que resultam tanto na interrupção do ciclo celular em G1 como na deflagração da apoptose. Genes como o *p21* são ativados no primeiro processo, enquanto outros como o *bax*, entram em atividade na regulação da apoptose. A regulação dos níveis celulares de p53 se faz em grande parte por genes que ele mesmo ativa, como é o caso do *Mdm2* (*mouse double minute 2*). O *Mdm2* atua promovendo a ubiquitinação (ligação com a ubiquitina, uma proteína envolvida na degradação e/ou estabilização de proteínas intracelulares) da p53 e o seu transporte para o citoplasma, onde então é degradada (INOUE et al., 2004). A superexpressão da proteína Mdm2 pode, então, levar a níveis reduzidos de p53

(YANG et al., 2004). Outra proteína intracelular que se liga à p53 e promove sua ubiquitinação, independentemente da Mdm2, é a Pirh2. Uma diminuição da quantidade de Pirh2 eleva a de p53, enquanto um aumento de sua expressão diminui a de p53 (YANG et al., 2004). Até mesmo proteínas virais (como a E6 do papilomavirus humano), podem levar a degradação da p53 (YANG et al., 2004).

Favorecendo a segunda hipótese, a de uma falsa-negatividade para p53, sabe-se que nem sempre a expressão imunoistoquímica da proteína correlaciona-se com a mutação do gene *p53* (KARJA et al., 1997). RIGHI et al. (1994) foram os primeiros a demonstrar a mesma mutação em um CXAP e no AP de origem. Desde então, vários trabalhos têm demonstrado a expressão baixa de proteína p53 em AP e alta em CXAP (SOINI et al., 1992, DEGUCHI et al., 1993, ISHII e NAKAJIMA, 1994, RIGHI et al., 1994, GALLO et al., 1995, KAMIO, 1996, KARJA et al., 1997, LI et al., 1997, ROSA et al., 1997, YAMAMOTO et al., 1998, NORDKVIST et al., 2000, LEWIS et al., 2001, OHTAKE et al., 2002). No entanto, KARJA et al. (1997), avaliando a expressão da proteína e as mutações no gene *p53* em tumores de glândula salivar, encontraram 20 carcinomas com expressão imunoistoquímica e apenas 4 com mutações genéticas, enquanto que dos 20 carcinomas negativos para p53, dois apresentavam mutações. YAMAMOTO et al. (1996), comparando a imunoexpressão de p53 e a perda de heterozigose no gene *p53* em casos de CXAP que apresentavam lado a lado áreas carcinomatosas e benignas, observaram sempre uma maior frequência da alteração genética do que imunoistoquímica, tanto nas áreas malignas como, apesar de em menor número, nas benignas. Com isto, demonstraram uma maior sensibilidade do primeiro método e uma maior susceptibilidade do método imunoistoquímico a fatores como fixação do tecido, qualidade do anticorpo, método de recuperação antigênica etc.

Por fim, a favor da terceira possibilidade, que os casos são realmente negativos, mesmo na maior série exclusiva de CXAP da literatura, LEWIS et al. (2001) não encontraram expressão de p53 na maioria dos casos. Entre os 73 casos com diversos subtipos histológicos (oito no total), apenas 28 (41%) foram p53-positivos.

Em nossa série, 67% dos casos foram p53-positivos, tanto nos tumores precoces quanto nos francamente invasivos, o que está dentro da variação observada na literatura (DEGUCHI et al., 1993, ISHII e NAKAJIMA, 1994, RIGHI et al., 1994, GALLO et al.,

1995, KAMIO, 1996, KARJA et al., 1997, LI et al., 1997, YAMAMOTO et al., 1998, LEWIS et al., 2001). Além disso, os três CXAPs com diferenciação mioepitelial que expressaram p53, o fizeram em maior quantidade que o grupo controle. Associando isto ao fato que o único tumor intracapsular com diferenciação epitelial mista (luminal e mioepitelial) exibiu altíssima positividade para p53 (59,4%), acreditamos que a proteína p53 esteja realmente envolvida na malignização do AP, independente do tipo celular proliferado.

6.2.2.2 c-erbB-2

Ao contrário do ocorrido com o p53, a expressão de c-erbB-2 pelas células neoplásicas nas áreas malignas dos CXAPs francamente invasivos foi de acordo com o encontrado também entre os tumores precoces. Como havia dois subgrupos bem distintos, a diferença de expressão quanto ao tipo celular proliferado foi mais nítida. Os três tumores sem diferenciação mioepitelial, aqueles com diferenciação luminal exclusiva, expressaram c-erbB-2, ao passo que todos os tumores com diferenciação mioepitelial foram negativos, corroborando os dados da literatura (COSTA ROSA et al., 1996, ROSA et al., 1997, DI PALMA et al., 2005).

A expressão de c-erbB-2 entre todos os nossos 15 casos foi de 46,6%, valor que se enquadra dentro daqueles da literatura (LEWIS et al., 2001), e sempre em tumores com diferenciação luminal exclusiva. Exceto pelos três casos francamente invasivos com diferenciação luminal exclusiva, a positividade para c-erbB-2 acompanhou a forte expressão de p53.

6.2.2.3- bcl-2

Corroborando os dados da literatura que mostram freqüente expressão de proteína bcl-2 em tumores benignos de GS, especialmente nos APs e mioepiteliomas, observamos 64,7% de positividade entre os nossos casos do grupo controle, preferencialmente em células mioepiteliais das estruturas túbulo-ductais e de áreas sólidas

(SOINI et al., 1998, DEBIEC-RICHTER et al., 2001, DA CRUZ PEREZ et al., 2004). Alguns autores têm mostrado uma diminuição da expressão desta proteína em carcinomas de GS à medida que o tumor adquire um fenótipo mais agressivo, como, por exemplo, na evolução de um carcinoma mucoepidermóide de baixo grau para alto grau, ou então na evolução de adenoma de células basais para carcinoma de células basais (DA CRUZ PEREZ et al., 2004). Em nossa série, observamos uma ausência de expressão desta proteína nas 4 áreas benignas dos CXAP francamente invasivos com diferenciação mioepitelial, havendo diferença com o grupo controle (p: 0.024), mostrando, talvez, um possível desequilíbrio no controle da apoptose na gênese destes APs que mais tarde evoluiriam para CXAP. Apesar de não ter havido diferença estatística entre o grupo controle e as áreas francamente invasivas destes CXAPs, observamos positividade para a proteína bcl-2 em apenas um caso de CEM, nas células mioepiteliais.

7- CONCLUSÕES

- 7.1- As proteínas p53, c-erbB-2 e Ki-67 apresentam expressão significativamente aumentada já nas fases precoces da carcinogênese do Carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico, isto é, nos carcinomas intracapsulares e minimamente invasivos, com provável participação neste processo.
- 7.2- A expressão imunohistoquímica de p53 precede a aquisição do fenótipo morfológico maligno, estando presente nas áreas benignas residuais do Carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico.
- 7.3- A expressão da proteína p53 mostrou-se maior tanto em células mioepiteliais como em epiteliais luminares na maioria dos diferentes tipos de Carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico, enquanto que a c-erbB-2 restringiu-se às células epiteliais luminares que sofreram transformação maligna.
- 7.4- A expressão imunohistoquímica de bcl-2 não foi útil para a diferenciação entre áreas benignas e malignas dos Carcinomas ex-Adenomas Pleomórficos, com positividade limitada a poucos casos, especialmente em células mioepiteliais.
- 7.5- Não houve diferença de expressão das proteínas c-erbB-2, Ki-67 e bcl-2 entre as diferentes fases evolutivas do Carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico.
- 7.6- As expressões de p53 e c-erbB-2 e a taxa de proliferação celular são úteis no diagnóstico de Carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico em fases iniciais de transformação maligna.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGNER, T.; NEUREITER, D.; VOLKER, U.; BELKE, J.; KIRCHNER, T. Epithelial-mesenchymal transdifferentiation and extracellular matrix gene expression in pleomorphic adenomas of the parotid salivary gland. **J Pathol**, **186(2): 178-85, 1998.**

ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. **Manual de Imuno-Histoquímica.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 270 p., 1999.

AOKI, T.; TSUKINOKI, K.; KARAKIDA, K.; OTA, Y.; OTSURU, M.; KANEKO, A. Expression of cyclooxygenase-2, bcl-2 and Ki-67 in pleomorphic adenoma with special reference to tumor proliferation and apoptosis. **Oral Oncol**, **40(9): 954-9, 2004.**

ARAÚJO, V. C.; CARVALHO, Y. R.; ARAUJO, N. S. Actin versus vimentin in myoepithelial cells of salivary gland tumors. A comparative study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, **77: 387-91, 1994.**

AUCLAIR, P. L.; ELLIS, G. L. Atypical features in salivary gland mixed tumors: their relationship to malignant transformation. **Mod Pathol**, **9: 652-7, 1996.**

AZUMA, M.; KASAI, Y.; TAMATANI, T.; SATO, M. Involvement of p53 mutation in the development of human salivary gland pleomorphic adenomas. **Cancer Lett**, **65(1): 61-71, 1992.**

BATSAKIS, J. G.; REGEZI, J. A.; LUNA, M. A.; EL-NAGAR, A. Histogenesis of salivary gland neoplasms: a postulate with prognostic implications. **J Laryngol Otol**, **103: 939-44, 1989.**

BRANDWEIN, M.; HUVOS, A. G.; DARDICK, I.; THOMAS, M. J.; THEISE, N. D. Noninvasive and minimally invasive carcinoma ex mixed tumor. A clinicopathologic and ploidy study of 12 patients with major salivary tumors of low (or no?) malignant potential. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, **81: 655-64, 1996.**

CHEUK, W.; CHAN, J. K. C. Salivary Gland Tumors. In: FLETCHER, C. D. M. (ed): **Diagnostic Histopathology of Tumors.** London: Churchill Livingstone, p. 231-312, 2000.

COSTA ROSA, J.; FONSECA, I.; FELIX, A.; SOARES, J. Immunohistochemical study of c-erbB-2 expression in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. **Histopathology**, **28: 247-52, 1996.**

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins. Patologia Estrutural e Funcional**. Tradução de Jane B. Barbosa, Marcio M. de Vasconcelos e Patrícia J. Voeux. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 1251 p. Título original: Robbins Pathologic Basis of Disease.

DA CRUZ PEREZ, D. E.; PIRES, F. R.; ALVES, F. A.; ALMEIDA, O. P.; KOWALSKI, L. P. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, **68(7): 895-902, 2004**.

DAKO CORPORATION. **HercepTest (Proceeding Manual)**, 3 ed., Glostrup, Denmark, 2001.

DARDICK, I.; VAN NOSTRAND, A. W. P. Morphogenesis of salivary gland tumors: a prerequisite to improving classification. **Pathol Annu**, **22: 1-53, 1987**.

DARDICK, I.; BYARD, R.W.; CARNEGIE, J.A. A review of the proliferative capacity of major salivary glands and the relationship to current concepts of neoplasia in salivary glands. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, **69(1): 53-67, 1990**.

DE ARAUJO, V. C.; LODUCCA, S. V. L.; SOBRAL, A. P. V.; KOWALSKI, L. P.; SOARES, F.; DE ARAUJO, N. S. Salivary duct carcinoma: cytokeratin 14 as a marker of in-situ intraductal growth. **Histopathology**, **41: 244-9, 2002**.

DEBIEC-RYCHTER, M.; VAN VALCKENBORGH, I.; VAN DEN BROCHE, C.; HAGEMEIJER, A.; VAN DE VEN, W. J. M.; KAS, K. et al. Histologic localization of PLAG-1 (pleomorphic adenoma gene 1) in pleomorphic adenoma of the salivary gland: cytogenetic evidence of common origin of phenotypically diverse cells. **Lab Invest**, **81(9): 1289-97, 2001**.

DEGUCHI, H.; HAMANO, H.; HAYASHI, Y. c-myc, ras, p21 and p53 expression in pleomorphic adenoma and its malignant form of the human salivary glands. **Acta Pathol Jpn**, **43: 413-22, 1993**.

DELGADO, R.; ALBORES-SAAVEDRA, J. Salivary Gland. In: HENSON , D.E.; ALBORES-SAAVEDRA, J. (ed.): **Pathology of Incipient Neoplasia**. New York: Oxford University Press, p. 86-122, 2001.

DI PALMA, S.; GUZZO, M. Malignant myoepithelioma of salivary glands: clinicopathological features of ten cases. **Virchows Archiv A Pathol Anat**, **423: 389-96, 1993**.

DI PALMA, S.; SKALOVA, A.; VANIEEK, T.; SIMPSON, R. H. W.; STAREK, I.; LEIVO, I. Noninvasive (intracapsular) carcinoma ex pleomorphic adenoma: recognition of focal carcinoma by HER-2/neu and MIB1 immunohistochemistry. **Histopathology**, **46: 144-52, 2005**.

EL-NAGGAR, A. K.; CALLENDER, D.; COOMBES, M. M.; HURR, K.; LUNA, M. A.; BATSAKIS, J. G. Molecular genetic alterations in carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a putative progression model? **Genes Chromosomes Cancer**, **27(2): 162-8, 2000**.

ELLIS, G. L.; AUCLAIR, P. L. Malignant Epithelial Tumors. In: ROSAI, J.; SOBIN, L. H. (eds): **Atlas of Tumor Pathology (série 3), seção 5, fascículo 17**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 155-373, 1996.

ENEROTH, C.M. Mixed tumor of major salivary glands: prognostic role of capsular structure. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, **74: 944-53, 1965**.

ERLANDSON, R. A.; CARDON-CARDO, C.; HIGGINS, P. J. Histogenesis of benign pleomorphic adenoma (mixed tumor) of the major salivary glands. An ultrastructural and immunohistochemical study. **Am J Surg Pathol**, **8(11): 803-20, 1984**.

FEARON, E. R.; VOLGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, **61: 759-97, 1990**.

FELIX, A.; EL-NAGGAR, A. K.; PRESS, M. F.; ORDONEZ, N. G.; FONSECA, I.; TUCKER, S. L. et al. Prognostic significance of biomarkers (c-erbB-2, p53, proliferating cell nuclear antigen, and DNA content) in salivary duct carcinoma. **Hum Pathol**, **27: 561-6, 1996**.

FELIX, A.; ROSA-SANTOS, J.; MENDONÇA, M. E.; TORRINHA, F.; SOARES, J. Intracapsular carcinoma ex pleomorphic adenoma. Report of a case with unusual metastatic behaviour. **Oral Oncol**, **38**: 107-110, 2002.

FONSECA, I.; MARTINS, A. G.; SOARES, J. Epithelial salivary gland tumors of children and adolescents in southern Portugal. A clinicopathological study of twenty-four cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, **72** (6): 696-701, 1991.

FURUSE, C.; SOUSA, S. O.; NUNES, F. D.; MAGALHAES, M. H.; ARAUJO, V. C. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. **Int J Surg Pathol**, **13**: 57-65, 2005.

GALLO, O.; FRANCHI, A.; BIANCHI, S.; BODDI, V.; GIANELLI, E.; ALAJMO, E. p53 oncoprotein expression in parotid gland carcinoma is associated with clinical outcome. **Cancer**, **75**: 2037-44, 1995.

GNEPP, D. R.; BRANDWEIN, M. S.; HENLEY, J. D. Salivary and Lacrimal Glands. In: GNEPP, D. R. (ed): **Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 325-430, 2000.

GRENKO, R. T.; GEMRYD, P.; TYTOR, M.; LUNDQVIST, P-G.; BOERYD, B. Salivary duct carcinoma. **Histopathology**, **26**: 261-6, 1995.

HELLQUIST, H. B.; SUNDELIN, K.; DI BACCO, A.; TYTOR, M.; MANZOTTI, M.; VIALE, G. Tumour growth fraction and apoptosis in salivary gland acinic cell carcinomas. Prognostic implications of Ki-67 and bcl-2 expression and of in situ end labeling (TUNEL). **J Pathol**, **181**: 323-9, 1997.

HILL, A. G. Major salivary gland tumours in a rural Kenyan hospital. **East Afr Med J**, **79**(1): 8-10, 2002.

HOCKENBERY, D. M.; OLTVAI, Z. N.; YIN, X. M.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, **75**: 241-51, 1993.

HUVOS, A. G.; PAULINO, A. F. G. The Salivary Glands. In: STERNBERG, S. S. (ed): **Diagnostic Surgical Pathology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 853-84, 1999.

INOUE, T.; GEYER, R. K.; HOWARD, D.; YU, Z. K.; MAKI, C. G. Mdm2 can promote the ubiquitination, nuclear export, and degradation of p53 in the absence of direct binding. **J Biol Chem**, **276(48): 45255-60, 2001**.

ISHII, K.; NAKAJIMA, T. Evaluation of malignant grade of salivary gland tumors: studies by cytofluorometric nuclear DNA analysis, histochemistry for nucleolar organizer regions and immunohistochemistry for p53. **Pathol Int**, **44: 287-96, 1994**.

KAMIO, N. Coexpression of p53 and c-erbB-2 proteins is associated with histological type, tumour stage, and cell proliferation in malignant salivary gland tumours. **Virchows Arch**, **428: 75-83, 1996**.

KARJA, V. J.; SYRJANEN, K. J.; KURVINEN, A-K.; SYRJANEN, S. M. Expression and mutations of p53 in salivary gland tumours. **J Oral Pathol Med**, **26: 217-23, 1997**.

KERNOHAN, N. M.; BLESSING, K.; KING, G.; CORBETT, I. P.; MILLER, I. D. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in salivary gland tumours: an immunohistochemical study. **J Pathol**, **163: 77-80, 1991**.

LEONG, A. S-Y.; COOPER, K.; LEONG, F. J. W-M. **Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology**. London: Greenwich Medical Media Ltd., 349 p., 1999.

LEWIS, J. E.; MCKINNEY, B. C.; WEILAND, L. H.; FERREIRO, J. A.; OLSEN, K. D. Salivary duct carcinoma. Clinicopathologic and immunohistochemical review of 26 cases. **Cancer**, **77(2): 223-30, 1996**.

LEWIS, J. E.; OLSEN, K. D.; SEBO, T. J. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathology analysis of 73 cases. **Human Pathol**, **32: 596-604, 2001**.

LI, X.; TSUJI, T.; WEN, S.; MIMURA, Y.; SASAKI, K.; SHINOZAKI, F. Detection of numeric abnormalities of chromosome 17 and p53 deletions by fluorescence in situ hybridization in pleomorphic adenomas and carcinomas in pleomorphic adenoma. Correlation with p53 expression. **Cancer**, **79(12): 2314-9, 1997**.

LIM, L. H.; CHAO, S. S.; GOH, C. H.; NG, C. Y.; GOH, Y. H.; KHIN, L. W. Parotid gland surgery: 4-year review of 118 cases in an Asian population. **Head Neck, 25(7): 543-8, 2003.**

MARTINEZ-MADRIGAL, F.; MICHEAU, C. Histology of the major salivary gland. **Am J Surg Pathol, 13(10): 879-99, 1989.**

MARUYA, S.; KIM, H. W.; WEBER, R. S.; LEE, J. J.; KIES, M.; LUNA, M. A. et al. Gene expression screening of salivary gland neoplasms: molecular markers of potential histogenetic and clinical significance. **J Mol Diagn, 6(3): 180-90, 2004.**

McCLUGGAGE, W. G.; PRIMROSE, W. J.; TONER, P. G. Myoepithelial carcinoma (malignant myoepithelioma) of the parotid gland arising in a pleomorphic adenoma. **J Clin Pathol, 51: 552-6, 1998.**

NAGLER, R. M.; LAUFER, D. Tumors of the major and minor salivary glands: review of 25 years of experience. **Anticancer Res, 17 (1B): 701-7, 1997.**

NASSER, S. M.; FAQUIN, W. C.; DAYAL, Y. Expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in salivary gland tumors. **Am J Clin Pathol, 119: 801-6, 2003.**

NORDKVIST, A.; ROIJER, E.; BANG, G.; GUSTAFSSON, H.; BEHRENDT, M.; RYD, W. et al. Expression and mutation of p53 in benign and malignant salivary gland tumors. **Int J Oncol, 16(3): 477-83, 2000.**

OHTAKE, S.; CHENG, J.; IDA, H.; SUZUKI, M.; OHSHIRO, K.; ZHANG, W. et al. Precancerous foci in pleomorphic adenoma of the salivary gland: recognition of focal carcinoma and atypical tumor cells by p53 immunohistochemistry. **J Oral Pathol Med, 31: 590-7, 2002.**

PAMMER, J.; HORVAT, R.; WENINGER, W.; ULRICH, W. Expression of bcl-2 in salivary glands and salivary gland adenomas. A contribution to the reserve cell theory. **Pathol Res Pract, 191: 35-41, 1995.**

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

PRESS, M. F.; PIKE, M. C.; HUNG, G.; ZHOU, J. Y.; MA, Y., GEORGE, J. et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. **Cancer Res**, **54(21): 5675-82, 1994.**

RIBEIRO, K. C.; KOWALSKI, L. P.; SABA, L. M.; DE CAMARGO, B. Epithelial salivary glands neoplasms in children and adolescents: a forty-four-year experience. **Med Pediatr Oncol**, **39(6): 594-600, 2002.**

RIGHI, P. D.; LI, Y.Q.; DEUTSCH, M.; McDONALD, J. S.; WILSON, K. M.; BEJARANO, P. et al. The role of the p53 gene in the malignant transformation of pleomorphic adenomas of the parotid gland. **Anticancer Res**, **14(5B): 2253-7, 1994.**

RO, J. S.; EL-NAGGAR, A.; RO, J. Y.; BLICK, M.; FRYE, D.; FRASCHINI, G. et al. c-erbB-2 amplification in node-negative human breast cancer. **Cancer Res**, **49: 6941-4, 1989.**

ROSA, J.C.; FELIX, A.; FONSECA, I.; SOARES, J. Immunoexpression of c-erbB-2 and p53 in benign and malignant salivary neoplasms with myoepithelial differentiation. **J Clin Pathol**, **50: 661-3, 1997.**

SANTOS, G. C.; MARTINS, M. R.; PELLACANI, L. B.; VIEIRA, A. C. T.; NASCIMENTO, L. A.; ABRAHAO, M. Neoplasias de glândulas salivares: estudo de 119 casos. **J Bras Patol Med Lab**, **39(4): 371-5, 2003.**

SEIFERT, G.; SOBIN, L. H. (ed): **WHO International Classification of Tumours. Histological Typing of Salivary Gland Tumours.** 2ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1991.

SKALOVA, A.; STAREK, I.; KUCEROVA, V.; SZEPE, P.; PLANK, L. Salivary duct carcinoma – a highly aggressive salivary gland tumor with HER-2/neu oncoprotein overexpression. **Pathol Res Pract**, **197: 621-6, 2001.**

SKALOVA, A.; STAREK, I.; VANECEK, T.; KUCEROVA, V.; PLANK, L.; SZEPE, P. et al. Expression of HER-2/neu gene and protein in salivary duct carcinomas of parotid gland as revealed by fluorescence in-situ hybridization and immunohistochemistry. **Histopathology**, **42(4): 348-56, 2003.**

SOINI, Y.; KAMEL, D.; NUORVA, K.; LANE, D. P.; VAHAKANGAS, K.; PAAKKO, P. Low p53 protein expression in salivary gland tumours compared with lung carcinomas. **Virchows Archiv A Pathol Anat**, **421**: 415-20, 1992.

SOINI, Y.; TORMANEN, U.; PAAKKO, P. Apoptosis is inversely related to bcl-2 but not to bax expression in salivary gland tumours. **Histopathology**, **32**: 28-34, 1998.

SPIRO, R. H.; HUVOS, A. G.; STRONG, E. W. Malignant mixed tumor of salivary origin: a clinicopathologic study of 146 cases. **Cancer**, **39**: 388-96, 1977.

STENNERT, E.; GUNTINAS-LICHIUS, O.; KLUSSMAN, J. P.; ARNOLD, G. Histopathology of pleomorphic adenoma in the parotid gland: a prospective unselected series of 100 cases. **Laryngoscope**, **111**: 2195-200, 2001.

SUGANO, S.; MUKAI, K.; TSUDA, H.; HIROHASHI, S.; FURUYA, S.; SHIMOSATO, Y. et al. Immunohistochemical study of c-erbB-2 oncoprotein overexpression in human major salivary gland carcinoma: an indicator of aggressiveness. **Laryngoscope**, **102**: 923-7, 1992.

SUNARDHI-WIDYAPUTRA, S.; VAN DAMME, B. Immunohistochemical pattern of bcl-2 and PTHrP-positive cells in primary, in recurrent and in carcinoma in pleomorphic adenomas. **Pathol Res Pract**, **191**: 1186-91, 1995.

SWELAN, W.; IDA-YONEMOCHI, H.; MARUYAMA, S.; OHSHIRO, K.; CHENG, J.; SAKU, T. Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. **Virchows Arch**, **446**: 653-62, 2005.

TAKAECHI, N.; HIROSE, F.; YAMAMOTO, H.; EZAKI, H.; FUJIKURA, T. Salivary gland tumors in atomic bomb survivors, Hiroshima, Japan. II. Pathologic study and supplementary epidemiologic observations. **Cancer**, **52** (2): 377-85, 1983.

THACKRAY, A. C.; LUCAS, R. B. Carcinoma in pleomorphic adenoma. In: THACKRAY, A. C.; LUCAS, R. B. (ed): **Atlas of Tumor Pathology (série 2), fascículo 10**. Washington, DC. Armed Forces Institute of Pathology, p. 107-17, 1974.

TORTOLEDO, M. E.; LUNA, M. A.; BATSAKIS, J. G. Carcinomas ex pleomorphic adenoma and malignant mixed tumors: histomorphologic indexes. **Arch Otolaryngol**, **110**: 172-6, 1984.

TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN, J.; JAFFE, E.; CROCE, C. M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science**, **228**: 1440-3, 1985.

VARGAS, P. A.; GERHARD, R.; ARAUJO FILHO, V. J.; DE CASTRO, I. V. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo**, **57(6)**: 271-6, 2002.

VUHAHULA, E. A. Salivary gland tumors in Uganda: clinical pathological study. **Afr Health Sci**, **4(1)**: 15-23, 2004.

WAHLBERG, P.; ANDERSON, H.; BIORKLUND, A.; MOLLER, T.; PERFEKT, R. Carcinoma of the parotid and submandibular glands – a study of survival in 2465 patients. **Oral Oncol**, **38(7)**: 706-13, 2002.

YAMAMOTO, Y.; KISHIMOTO, Y.; VIRMANI, A. K.; SMITH, A.; VUITCH, F.; ALBORES-SAAVEDRA, J. et al. Mutations associated with carcinomas arising from pleomorphic adenomas of the salivary glands. **Hum Pathol**, **27(8)**: 782-6, 1996.

YAMAMOTO, Y.; KISHIMOTO, Y.; WISTUBA, I. I.; VIRMANI, A. K.; VUITCH, F.; GAZDAR, A. F. et al. DNA analysis at p53 locus in carcinomas arising from pleomorphic adenomas of salivary glands: comparison of molecular study and p53 immunostaining. **Pathol Int**, **48**: 265-72, 1998.

YANG, Y.; LI, C-C. H.; WEISSMAN, A. M. Regulating the p53 system through ubiquitination. **Oncogene**, **23**: 2096-106, 2004.