

**CATARINA DE OLIVEIRA NEVES**

**NEOPLASIAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO  
MIOEPITELIAL: estudo da imunoexpressão do CD10  
(CALLA/NEP 24.11) e da podoplanina (D2-40)**

**CAMPINAS  
2009**

**CATARINA DE OLIVEIRA NEVES**

**NEOPLASIAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO  
MIOEPITELIAL: estudo da imunoexpressão do  
CD10 (CALLA/NEP 24.11) e da podoplanina (D2-40)**

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.

**ORIENTADOR:** Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

**CAMPINAS  
2009**

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

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

N414n Neves, Catarina de Oliveira  
Neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial: estudo da imunoexpressão do CD10 (CALLA/NEP 24.11) e da podoplanina (D2-40) / Catarina de Oliveira Neves. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

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

1. Neoplasias das glândulas salivares. 2. CD10. 3. Podoplanina. I. Altemani, Albina Messias de Almeida Milani. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Salivary neoplasias with myoepithelial differentiation: immunoexpression study of the CD10 (CALLA/NEP 24.11) and podoplanin (D2-40)**

**Keywords:** • Sallivary gland neoplasms  
• CD10  
• Podoplanin

Titulação: Doutor em Ciências Médicas  
Área de concentração: Anatomia Patológica

Banca examinadora:

**Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani**  
**Profa. Dra. Andresa Borges Soares**  
**Profa. Dra. Ana Paula Dias Demasi**  
**Prof. Dr. Athanase Billis**  
**Prof. Dr. Leandro Lopes de Freitas**

Data da defesa: 18-02-2009

---

## **Banca examinadora da tese de Doutorado**

---

---

**Orientador : Profa. Dra. Albina Messias De Almeida Milani Altemani**

---

---

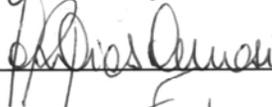
### **Membros:**

---

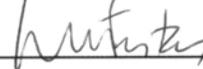
**1. Profa. Dra. Andresa Borges Soares**



**2. Profa. Dra. Ana Paula Dias Demasi**



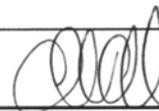
**3. Prof. Dr. Leandro Luiz Lopes de Freitas**



**4. Prof. Dr. Athanase Billis**



**5. Profa. Dra. Albina Messias De Almeida Milani Altemani**



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 18/02/2009**

---

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Justino Bezerra Neves e Maria Geraldina Neves, pelo incondicional Amor que me fortalece, me faz acreditar na Graça da Vida e que se traduz, diariamente, em gestos concretos de incentivo aos meus sonhos.*

*Às minhas avós, Ágida Geraldina de Oliveira e Maria Bezerra Neves (in memoriam), mulheres fortes que me enriqueceram com seus exemplos de vida, cujas lembranças guardo com muito Amor.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

---

**À** Prof.a. Dra. Albina Altemani pelos exemplos de competência e ética profissionais transmitidos e pela inestimável dedicação na orientação deste trabalho.

**Aos** meus queridos irmãos Jussara Huseby e Justino B. Neves Filho, pelo apoio e generoso incentivo, sempre presentes em todas as minhas decisões profissionais, e pelo Amor mútuo que cultivamos; e aos meus cunhados, Luciana Neves e Matthew Huseby, pelo Amor e alegria que acrescentaram a nossa família.

**Aos** meus familiares que, mesmo à distância, sempre me incentivaram com palavras de apoio.

**Aos** novos e queridos amigos, Andresa Soares, Icléia Siqueira, Francisco Pignatáro, Priscila Bianchi, Josemara Neves, Mariana Lira, Ana Flávia Costa e Tânia Benetti, cujo convívio só me trouxe alegrias e que sempre será lembrado com doçura e muitas saudades.

**À** Priscila Bianchi, pelo esmero e competência ao realizar as colorações imunohistoquímicas, colaborando até o final na conclusão deste trabalho.

**Às** amigas e colegas de trabalho, Adriana G. Ferreira e Maria Alice Meira Lins, pelo apoio e incentivo à minha pós-graduação.

**Aos** queridos colegas do Departamento de Patologia da UFPE que fizeram parte da minha formação como patologista e que me ajudaram a galgar mais um degrau na minha carreira profissional.

**Aos** técnicos de histologia da UNICAMP, Luzia, Ismael, Maria Gina, Aparecido e Priscila, pelo preparo cuidadoso das lâminas.

**A** Cláudia Piazza, pela presteza e zelo na realização das colorações de imunohistoquímica, na última fase deste trabalho.

**A** Adilson Piazza, pela colaboração valiosa na documentação das imagens produzidas neste trabalho.

**Às** secretárias do Departamento de Patologia, Maria do Carmo e Elizabeth, pela atenção a mim dispensada.

## **EPIGRAFE**

"E se tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e se eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, mas não tivesse a caridade, não seria nada.

A caridade é paciente; a caridade é bondosa; não é invejosa; a caridade não é arrogante, nem orgulhosa. A caridade nunca passará. Pelo contrário, as profecias vão desaparecer as línguas vão acabar; a ciência desaparecerá. Porque o nosso conhecimento é imperfeito, e nossa profecia também"

I COR 13, 2,8-9

Lista de Abreviaturas .....	xvii
Lista de Tabelas .....	xix
Lista de Figuras .....	xxi
<b>RESUMO</b> .....	xxv
<b>ABSTRACT</b> .....	xxvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	29
1.1 CD10 (CALLA/NEP 24.11) .....	33
1.2 Podoplanina (D2-40) .....	42
1.3 Neoplasias Salivares com diferenciação mioepitelial .....	48
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	55
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	59
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	63
4.1 Grupo de estudo .....	65
4.2 Avaliação histológica .....	65
4.3 Técnica imunistoquímica .....	66
4.4 Avaliação imunistoquímica .....	68
4.5 Avaliação clínica .....	69
4.6 Análise estatística .....	69
<b>5. RESULTADOS</b> .....	71
5.1 Dados gerais .....	73
5.2 Imunoexpressão do CD10 (CALLA/NEP 24.11) .....	77
5.3 Imunoexpressão da podoplanina (D2-40) .....	89
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	99
6.1 Expressão do CD10 .....	102
6.2 Podoplanina (D2-40) .....	111
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	115
7.1 Expressão do CD10 em neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial... ..	117
7.2 Expressão do D2-40 em neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial.. ..	118
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	121
<b>9. APÊNDICE</b> .....	149

<b>ACB</b>	Adenoma de células basais
<b><math>\alpha</math> AML</b>	Actina de músculo liso
<b>AMPc</b>	Adenosina monofostato cíclico
<b>APBG</b>	Adenocarcinoma polimórfico de baixo grau
<b>AP</b>	Adenoma pleomórfico
<b>CAC</b>	Carcinoma adenóide cístico
<b>CALLA</b>	Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen
<b>CD10</b>	Cluster of differentiation number 10
<b>CE</b>	Célula estromatosa
<b>CEME</b>	Carcinoma epithelial-mioepitelial
<b>CME</b>	Carcinoma mioepitelial
<b>CM</b>	Célula mioepitelial
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>EMT</b>	Epithelial-mesenchymal transition
<b>M</b>	Mioepitelioma
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases de matriz
<b>NEP24.11</b>	Endopeptidase neutra 24.11
<b>PCNA</b>	Antígeno de proliferação celular
<b>SMMHC</b>	Miosina de músculo liso de cadeia pesada

<b>Tabela 1:</b> Expressão do CD10 nas células mioepiteliais entre os grupos de carcinomas .....	79
<b>Tabela 2:</b> Correlação dos parâmetros clínicopatológicos com a expressão do CD10 nas células estromatosas associadas à infiltração carcinomatosa .....	81
<b>Tabela 3:</b> Expressão do D2-40 nas células mioepiteliais entre os grupos de carcinomas com diferenciação mioepitelial .....	91
<b>Tabela 4:</b> Dados clínicos e resultados da imunoistoquímica dos carcinomas salivares com diferenciação mioepitelial .....	96
<b>Tabela 5:</b> Dados clínicos e resultados da imunoistoquímica das neoplasias salivares benignas.....	97

<b>Figura 1</b> - Glândula salivar normal – (A e B) – D2-40- expressão nas células mioepiteliais acinares e dos ductos intercalados, mais marcada ao redor dos ductos intercalados. (C e D) – CD10- expressão mais acentuada nas células mioepiteliais acinares .....	75
<b>Figura 2</b> - Frequência dos carcinomas salivares com diferenciação mioepitelial: CAC (carcinoma adenóide cístico); CEME (carcinoma epitelial-mioepitelial); APBG (Adenocarcinoma polimórfico de baixo grau); CME (carcinoma mioepitelial).....	76
<b>Figura 3</b> - Frequência das neoplasias benignas com diferenciação mioepitelial:AP (adenoma pleomórfico); M (mioepitelioma); ACB (adenoma de células basais).....	77
<b>Figura 4</b> - CEME (carcinoma epitelial-mioepitelial – x400) – expressão intensa, nas células mioepiteliais neoplásicas, de padrões membranoso(predominante) e citoplasmático.....	78
<b>Figura 5</b> - xpressão do CD10 nas células mioepiteliais (CM) e do estroma tumoral (CE) entre os grupos de carcinomas.....	80
<b>Figura 6</b> - Expressão do CD10 e da $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais da amostra geral dos carcinomas ( $p < 0.001$ ). .....	82
<b>Figura 7</b> - Expressões do CD10 versus $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais entre os grupos de carcinomas. CM (células mioepiteliais), CAC (carcinoma adenóide cístico); CEME (carcinoma epitelial-mioepitelial); APBG (adenocarcinoma polimórfico de baixo grau); CME (carcinoma mioepitelial). .....	83
<b>Figura 8</b> - Expressão do CD10 e da $\alpha$ -AML na células estromatosas da amostra geral dos carcinomas ( $p = 0.007$ ) .....	84
<b>Figura 9</b> - Expressões do CD10 versus $\alpha$ -AML nas células estromatosas entre os grupos de carcinomas. CE (células estromatosas); CAC (carcinoma adenóide cístico); CEME (carcinoma epitelial-mioepitelial); APBG (adenocarcinoma polimórfico de baixo grau); CME (carcinoma mioepitelial).....	84

<b>Figura 10</b> - Expressões do CD10 e da $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais (CM) e estromatosas (CE) dos carcinomas adenóides císticos. ....	85
<b>Figura 11</b> - Carcinoma adenóide cístico- (A e C): CD10 – marcada expressão nas células do estroma tumoral; (B e D): $\alpha$ -AML – negatividade nas células do estroma tumoral e positividade nas células mioepiteliais malignas.....	86
<b>Figura 12</b> - Adenocarcinoma polimórfico de baixo grau – (A) – CD10: ausência de expressão nas células estromatosas e mioepiteliais. (B) – $\alpha$ -AML – expressão nas células mioepiteliais neoplásicas, padrão de membrana e citoplasmático.....	87
<b>Figura 13</b> - Expressão do CD10 nas células mioepiteliais (CM) e estromatosas (CE) das neoplasias benignas. ....	88
<b>Figura 14</b> - Expressões do CD10 e da $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais das neoplasias benignas. ....	89
<b>Figura 15</b> - Expressão do D2-40 nas células mioepiteliais do carcinoma epitelial-mioepitelial (A) e do carcinoma adenóide cístico (B). ....	90
<b>Figura 16</b> - Expressões do D2-40 nas células mioepiteliais e estromatosas na amostra geral dos carcinomas.....	92
<b>Figura 17</b> - Expressões do D2-40 e da $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais entre os grupos de carcinomas.....	93
<b>Figura 18</b> - Expressões do D2-40 e da $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais (CM) e estromatosas (CE) da amostra geral das neoplasias salivares benignas.....	95

CD10 e Podoplanina (D2-40), além de expressos nas células mioepiteliais, estão envolvidos na progressão tumoral e podem ser utilizados como marcadores prognósticos. Em 79 neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial (44 malignas e 35 benignas), analisamos a expressão dessas proteínas nas células neoplásicas, na reação desmoplásica tumoral e, nos carcinomas adenóides císticos (CAC), verificamos possível correlação com fatores prognósticos. CD10 foi negativo nas células epiteliais em 100% dos casos. Nas mioepiteliais, foi positivo em 25,71% das lesões benignas e em 27,27% das malignas, sendo esses resultados significativamente inferiores àqueles da  $\alpha$ -SMA (60% e 88,64%, respectivamente). CD10 foi positivo em 83,33%, 30%, 27,7% e 40% dos carcinomas epiteliais-mioepiteliais (CEME), adenomas pleomórficos, mioepiteliomas e carcinomas mioepiteliais, respectivamente, e negativo em 100% dos CAC, adenocarcinomas polimórficos de baixo grau (APBG) e adenomas de células basais. No estroma tumoral, a expressão do CD10 (38,64%) foi significativamente maior ( $p=0.007$ ) que a da  $\alpha$ -SMA (11,36%). Entretanto, a expressão do CD10 não apresentou correlação com os fatores prognósticos do CAC. O D2-40 foi negativo, nas células epiteliais e estromais, e positivo nas mioepiteliais em 59% dos carcinomas e em 42,86% das lesões benignas. Concluimos que, ao contrário do D2-40, o CD10 tem pouca utilidade para identificar células mioepiteliais malignas, exceto no CEME onde pode ser útil no diagnóstico diferencial com a variante tubular do CAC. Sua expressão estromal ocorre em células de fenótipo distinto dos miofibroblastos, está associada com invasão tumoral e não se correlaciona com fatores prognósticos do CAC.

**Palavras-chave:** Neoplasias de glândulas salivares, CD10, Podoplanina (D2-40)

CD10 and Podoplanin (D2-40) are expressed in myoepithelial cells and, in addition, are involved in tumoral progression and can be utilized as prognostic markers. In a series of 79 salivary neoplasias with myoepithelial differentiation (44 malignant and 35 benign), the expression of these proteins was analyzed in tumor cells as well as in tumor-associated stromal cells and it was correlated with prognostic factors in a select group of lesions (adenoid cystic carcinomas). In epithelial cells, CD10 was negative in 100% of the cases. In myoepithelial cells, CD10 was positive in 25.71% of the benign neoplasias and in 27.27% of the malignant ones and this expressions was significantly lower in comparison to that of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (60% and 88.64%, respectively). In neoplasias classified according to histological subtype, CD10 was positive in 83.33%, 30%, 27.27% and 40% of epithelial-myoepithelial carcinomas (EMC), pleomorphic adenomas, myoepitheliomas and myoepithelial carcinomas, respectively and negative in 100% of adenoid cystic carcinomas (ACC), polymorphic low-grade adenocarcinomas (PLGA) and basal adenomas. In tumor-associated stromal cells, CD10 expression was significantly higher ( $p=0.007$ ) than that of  $\alpha$ -SMA (38.64% versus 11.36%). However, no correlation was detected between CD10 expression and prognostic factors in ACC. D2-40 was negative in epithelial cells and in tumor-associated stromal cells as well and positive in myoepithelial cells of carcinomas (59%) and benign lesions (42.86%). This reactivity in myoepithelial cells did not differ significantly of that using  $\alpha$ -SMA as a marker, except for PLGA where D2-40 was negative. In conclusion, CD10 differs of D2-40 once it shows low utility to detect neoplastic myoepithelial cells. However, EMC is an exception and in this tumor, CD10 could be useful to separate this lesion from tubular variant of ACC. In the tumor-associated stroma, CD10 expression in non-myofibroblast cells seems to be associated with tumor invasion but it does not show correlation with prognostic factors in ACC.

**Keywords:** Salivary glands neoplasia, CD10, Podoplanin (D2-40).

# 1. Introdução

---

As neoplasias de glândula salivar constituem um grupo de tumores com características histológicas peculiares devidas, principalmente, à composição bicelular, isto é, epitelial e mioepitelial, de alguns deles (Ogawa, 2003).

Na **glândula salivar normal**, as **células mioepiteliais** formam as camadas mais externas, circundando ácinos e ductos intercalados (Ellis et al.,1991; Young, 1997) e nelas co-existem aspectos ultraestruturais de células epiteliais e musculares (Ogawa, 2003). Funcionalmente, além de ajudar na propulsão da saliva, graças à sua capacidade contrátil, também, contribuem para a síntese da membrana basal que circunda as estruturas túbulo-ductais (Sternlicht e Barsky, 1997). Morfologicamente, a célula mioepitelial normal é difícil de ser visualizada por ter o núcleo pequeno e alongado, porém é facilmente detectada com anticorpos para actina músculo específica e citoceratina 14, através de coloração imunoistoquímica (Ellis et al.,1991).

As **células mioepiteliais neoplásicas** apresentam diferenças importantes em relação às células normais e participam da composição de uma série de neoplasias das glândulas salivares (Hubner, 1971; Palmer, 1986). Células interpretadas como mioepiteliais, por conterem microfilamentos com corpos densos, foram encontradas em tumores benignos, como Mioepitelioma (M), Adenoma Pleomórfico (AP) e Adenoma de Células Basais (ACB); e malignos, como Carcinoma Mioepitelial (CME), Carcinoma Epitelial-Mioepitelial (CEME), Carcinoma Adenóide Cístico (CAC), Adenocarcinoma de Células Basais (APCB) e Adenocarcinoma Polimórfico de Baixo Grau (APBG) (Chisholm et al.,1974; Jao et al.,1976; Sciubba e Brannon, 1982; Suzuki, 1982; Batsakis et al.,1983; Erlandson

et al.,1984; Dardick e van Nostrand, 1985; Orenstein et al.,1985; Palmer et al.,1985; Chaudhry et al.,1986; Nikai et al.,1986; Luna et al.,1987; Nicolatou et al.,1988; Dardick et al.,1992; Takeda,1992; Quddus et al.,1999).

Nestas neoplasias, em contraposição ao aspecto discreto da célula mioepitelial normal, são notórias: a) a enorme plasticidade morfológica da célula mioepitelial transformada (estrelada, fusiforme, plasmocitóide, clara, basalóide e epitelióide) e b) a positividade imunoistoquímica para uma série de anticorpos, alguns deles não detectáveis em células normais (Ogawa, 2003). Além disso, as células mioepiteliais neoplásicas apresentam uma reatividade variável aos anticorpos que as identificam, de tal modo que é recomendado sempre usar um painel contendo vários deles (Ellis et al.,1991, De Araujo et al., 2000). Recentemente, além dos anticorpos que são dirigidos para as proteínas do aparato mióide das células mioepiteliais (actina músculo liso alfa, calponina básica, h-caldesmon, SMMHC), outros tais como, p63 (Reis-Filho e Schmitt, 2002), maspin (Reis-Filho et al., 2001), p-cadherin (Kovács et al.,2003), **CD10** (Cheuk e Chan, 2007) e **D2-40** (Soares, 2007) são utilizados, permitindo um refinamento maior na detecção da célula mioepitelial neoplásica.

CD10 é uma glicoproteína transmembrana, da família das metaloendopeptidases de matriz (MMPs) e D2-40 é um anticorpo monoclonal que reconhece a podoplanina humana, que é uma glicoproteína transmembrana, sialomucina-símile (Wicki e Christofori, 2007; Atsumi et al., 2008). Além das células mioepiteliais, CD10 e D2-40 podem ser expressos nas células normais e neoplásicas de outros órgãos e em fibroblastos e miofibroblastos da reação

desmoplásica induzida por vários tipos de carcinomas (Zameenik et al., 2006; Huang W-B et al., 2005; Kawase et al., 2008). Na literatura, ambas proteínas são utilizadas para fins diagnósticos e, portanto, úteis na identificação de certas neoplasias (por exemplo, expressão de CD10 em sarcoma do endométrio e de D2-40 em sarcoma de Kaposi). Além disso, em vários tipos de câncer (próstata, mama, estômago, etc), a alteração de expressão destas proteínas nas células neoplásicas e/ ou no estroma tumoral é correlacionada com comportamento biológico e progressão neoplásica.

A seguir, apresentamos revisão de literatura sobre estes dois marcadores.

### **1.1 CD10 (CALLA/NEP 24.11)**

O CD 10, também conhecido como antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA), endopeptidase neutra (NEP 24.11), nefrilisina (Moritani et al., 2002; Ogawa et al., 2002) ou encefalinase (Chu e Arber, 2000) é uma glicoproteína transmembrana, da família das metaloendopeptidases de matriz (MMPs), da qual também fazem parte o CD13 e o CD26 (McIntosh et al., 1999; Dall'Era et al., 2007; Luukkaa et al., 2008). Seu peso molecular varia entre 90-110KD e o zinco é utilizado como cofator. Esta proteína está envolvida na clivagem e inativação de certos hormônios peptídeos, importantes para os sinais de transdução, regulando suas concentrações locais (LeBien e McCormack, 1989; Ship et al., 1990; Chu e Arber, 2000; Dall'Era et al., 2007). O locus do CD10, é o braço longo do cromossomo 3q21-27 (Borscheri et al., 2001). O CALLA, foi

inicialmente extraído do bordo em escova dos túbulos proximais renais de coelhos em 1974 (LeBien e McCormack,1989), identificado sorologicamente em 1975 e designado como “cluster of differentiation” número 10 (CD10) em 1984 (Metzgar et al.,1981; LeBien e McCormack,1989). No início dos anos 80, estudos identificaram que a encefalinase, enzima encontrada no tecido cerebral, era idêntica à NEP, o que foi confirmado através de estudos funcionais de clonagem e de sequenciamento gênico (LeBien e McCormack, 1989; Shipp et al., 1989). Em 1980, Ritz e colaboradores (1980) produziram o primeiro anticorpo monoclonal (J-5) (Metzgar et al., 1981; LeBien e McCormack,1989). Em 1999, foi descrito um anticorpo monoclonal (clone 56C6), disponível para uso em secções embebidas em parafina (McIntosh et al., 1999).

O CD10 foi inicialmente identificado como um antígeno de superfície celular expresso nas células das leucemias linfoblásticas agudas, justificando a sua designação de CALLA (do inglês, Common Acute Lymphoblastic Leukemias Antigen). Sua expressão também pode ser vista em vários tipos de linfomas, especialmente o linfoblástico, o folicular, o linfoma de Burkitt (Harris et al., 1985) e na crise blástica da leucemia mielóide crônica (Greaves et al.,1983; LeBien e McCormack,1989; McIntosh et al.,1999; Kaufmann et al.,1999; Chu e Arber, 2000; Barcus et al., 2000; Dogan et al., 2000).

Inicialmente, acreditava-se que o CD10 era um antígeno tumor-específico (Chu e Arber, 2000) mas, estudos demonstraram sua expressão em células não neoplásicas em uma grande variedade de tecidos tais como:

- Mama e glândulas salivares – nas células mioepiteliais, da mama e da glândula salivar, e células ductais da mama com metaplasia apócrina;
- Intestinos delgado e grosso – na superfície apical glandular normal;
- Rim – nas células glomerulares e túbulos contorcidos proximais dos rins;
- Próstata – na superfície apical dos grandes ductos prostáticos e na superfície apical dos ductos do epidídimo;
- Endométrio – nas células estromais;
- Medula óssea – nas células do estroma;
- Fígado – nos canalículos biliares;
- Pulmões – nas células do epitélio alveolar pulmonar;
- Células trofoblásticas e remanescentes mesonéricos.

O CD 10 possui função enzimática, hidrolizando uma variedade de peptídeos (substância P, fator natriurético atrial, endotelina, neurotensina, ocitocina, bradicinina, angiotensinas, peptídeos bombesina símile, peptídeos relacionados à calcitonina e à encefalina (Lebien e McCormack, 1989, Shipp et al., 1991), reduzindo suas concentrações disponíveis para ligação aos receptores e aos sinais de transdução (Shipp et al.,1990; Arber e Weiss, 1997). Estudos demonstraram que o CD10 tem papel direto nas vias dos sinais de transdução que regulam o crescimento celular e a apoptose (Shipp et al.,1990).

A função do CD10, nos tecidos não-hematopoiéticos e neoplásicos, está intimamente relacionada com os processos secretórios (Erdös et al.,1985).

Postula-se que a função do CD10 nos rins seja a de clivar peptídeos tais como, a bradicinina e a angiotensina que funcionam na auto-regulação renal do metabolismo da água e do sódio (Erdős et al.,1985). Nos outros tecidos, entretanto, o papel funcional do CD10 ainda não foi desvendado.

Além da sua função enzimática, o CD10 tem muitos efeitos biológicos tais como: atenuação da resposta inflamatória dos neutrófilos, modulação da hipotensão e da diurese mediada pelo fator natriurético atrial e redução das respostas encefalinérgicas. Nos tecidos hematopoiéticos, regula o desenvolvimento inicial das células B, inativando os peptídeos que estimulam a proliferação e a diferenciação destas células (Chu e Arber, 2000). Também está envolvido na promoção do desenvolvimento inicial das células T, na modulação dos tímocitos e na proliferação das células epiteliais tímicas (Guerin S et al.,1997; Barcus et al., 2000).

Dados da literatura referem seu envolvimento na regulação da proliferação, peptídeo-mediada, das células do epitélio brônquico (Johnson et al., 1985, Shipp et al.,1991; Sunday et al.,1992; King et al.,1993). O CD10/NEP hidroliza os peptídeos similares à bombesina tornando-os inativos biologicamente (Shipp et al.,1991). Estes são: potentes mitógenos para fibroblastos, células do epitélio brônquico normal e células neuroendócrinas (Rozengurt et al.,1983; Willey et al.,1984; Cohen et al.,1996) e servem como fatores de crescimento autócrinos essenciais para muitos carcinomas de pequenas células do pulmão (Cuttitta et al.,1985). O crescimento de carcinomas de pequenas células do pulmão responsivos aos peptídeos bombesina-like é inibido pelo CD10 e potencializado

por sua inibição, implicando esta enzima na regulação autócrina do crescimento de células tumorais mediadas por estes peptídeos (Shipp et al.,1991).

Estes resultados são de particular interesse pois: o cigarro inativa o CD10 da superfície das células epiteliais brônquicas (Dusser et al.,1989), fumantes apresentam níveis elevados de peptídeos bombesina-like nos seus fluidos bronco-alveolares (Aguayio,1989) e os carcinomas de pequenas células pulmonares ocorrem quase que exclusivamente em tabagistas (Minna et al.,1985). A redução da atividade enzimática do CD10 na superfície celular pode promover a proliferação de células neuroendócrinas pulmonares mediadas pelos peptídeos bombesina-like, facilitando o desenvolvimento dos carcinomas pulmonares de pequenas células (Shipp et al.,1991). A expressão e a regulação desta enzima, também, foram avaliadas nos carcinomas não pequenas células do pulmão, tornando possível determinar sua relação com a proliferação celular e identificar seus potenciais substratos nestes tumores (Canju et al., 1994).

Chu e Arber (2000) estudaram a expressão do CD10 em 505 neoplasias não-hematopoiéticas, entre as quais, os carcinomas dos tratos gastro-intestinal e genito-urinário mostraram maior expressão. Neste mesmo estudo, identificaram sua expressão em 40% (12/30) dos melanomas e em 100% (5/5) dos sarcomas examinados.

Estes autores afirmam que a positividade do CD10, nos carcinomas estudados, tem origem nos tecidos que normalmente o expressam, pois entendem que, durante a tumorigênese, as células malignas ainda mantêm certas funções e

moléculas das suas predecessoras. Os seguintes padrões de expressão foram descritos (Chu e Arber, 2000):

- Apical/luminal – nos bordos em escova dos intestinos delgado e grosso, túbulos contorcidos proximais dos rins e nos adenocarcinomas bem e moderadamente diferenciados, do cólon, pâncreas e próstata.
- Citoplasmático (difuso) – principalmente nos carcinomas de células transicionais, adenocarcinomas pouco diferenciados de várias origens, melanomas e sarcomas.
- Membranoso/Golgi – na maioria dos casos de carcinoma de células renais.

Murali e Delprado (2005), estudando o papel desta enzima na tumorigênese urotelial, relataram que as neoplasias de alto grau mostraram expressão mais intensa e distribuição mais difusa que as neoplasias de baixo grau, padrões opostos àqueles encontrados nos carcinomas pulmonares, prostáticos e endometriais. Estes achados podem indicar que a contribuição do CD10 na tumorigênese urotelial seja diferente daquela observada nesses tumores, onde funcionaria como supressor tumoral (Shipp et al.,1991; Papandreou et al.,1998; Kanitakis et al., 2002).

Alterações em numerosos loci genéticos foram identificadas nos tumores uroteliais , ressaltando que aberrações no braço longo do cromossomo 3, que é a localização do gene do CD10, foram vistas em 7% a 24% dos carcinomas uroteliais infiltrantes e em 1% a 5% das neoplasias não invasivas da bexiga

(Murali e Delprado, 2005) mas, não foram documentadas mutações dos locus do gene do CD10. Assim, é provável que ocorram expressões aberrantes de um tipo selvagem do CD10 como resultado de mutações nas vias celulares, que afetam ou que são afetadas pelo CD10 (Murali e Delprado, 2005). O acúmulo de CD10 mutado, não-funcional é uma outra possibilidade que justificaria o aumento de expressão imunoistoquímica vista nos tumores uroteliais de grau mais alto (Murali e Delprado, 2005).

Estudos da expressão do CD10 nos melanomas também mostraram expressão aumentada relacionada com a progressão e metástase destes tumores, sugerindo haver diferentes papéis desta proteína nos diferentes tipos de tumores. Segundo Velazquez e colaboradores (2007), a super-expressão do CD10 é rara nos melanomas primários e comum nos metastáticos. Estes autores sugerem que o acúmulo de proteína é secundário ao aumento da produção, como ocorre com outros oncogens tais como o receptor do fator de crescimento e a ciclina D1, nos carcinomas de pulmão e esôfago respectivamente.

A ampla expressão do CD10 em diferentes tipos de neoplasias limita sua utilização como marcador diagnóstico. No entanto, pode ser útil no diagnóstico diferencial dos carcinomas renais versus carcinomas adrenocorticais e metastáticos, bem como na diferenciação dos sarcomas do estroma endometrial de outros sarcomas, uma vez que os carcinomas de células renais e do estroma endometrial não possuem marcadores específicos (Avery et al., 2000; Chu e Arber, 2000).

A expressão do CD10 na mama está bem descrita no relato de Moritani e colaboradores (2002) que apontam esta proteína como útil marcador das células mioepiteliais que, quando associada à actina de músculo liso, fornece informação mais sofisticada sobre a presença ou ausência das células mioepiteliais nas lesões de difícil diagnóstico.

Vários relatos da literatura correlacionam a **expressão do CD10 na resposta estromal associada ao tumor** com progressão neoplásica.

Iwaya e colaboradores (2002) descreveram a expressão estromal do CD10 nos carcinomas invasivos da mama e sua correlação com o curso clínico destas lesões. Segundo estes autores, este tipo de expressão está intimamente relacionada a comportamento biológico agressivo e tem valor preditivo superior ao estado dos linfonodos, tamanho do tumor, grau histológico ou estadio clínico. Neste trabalho, demonstraram que o CD10 foi expresso mais intensamente nas células estromais, em torno das células malignas, nas áreas de carcinoma ductal invasivo, sugerindo haver interação entre estes dois tipos celulares. O modo como as células estromais CD10 positivas aumentam a agressividade dos carcinomas da mama, permanece desconhecido. Pelo fato do CD10 ser uma metaloproteinase de matriz, ela poderia criar um micro-ambiente favorável à invasão e/ou metástases (Basset et al.,1994; Talvensaaari-Mattila et al.,1998). As células estromais CD10 positivas também poderiam interagir com as células malignas para acelerar o ciclo celular e ativar a locomoção celular. Iwaya e colaboradores (2002) sugeriram que estes achados poderiam ser aplicados para novas terapias

do câncer que bloqueiam a produção de células estromais CD10 positivas no tecido mamário carcinomatoso.

Ogawa e colaboradores (2002) foram os primeiros a investigar a expressão do CD10 nas células estromais na carcinogênese colon-retal. Seus resultados demonstraram que quase todos os casos com células estromais “difusamente” CD10 positivas, eram carcinomas invasivos, sugerindo associação desta expressão com a invasão. Estes achados são fortemente indicativos de que a proliferação de células estromais CD10 positivas é parte do mecanismo de crescimento invasivo. Estes autores ainda sugerem que exista interação tumor-estroma entre as células tumorais do carcinoma colon-retal e as células estromais CD10 positivas e que a secreção de CD10 pelas células estromais é, provavelmente, induzida por fatores solúveis produzidos pelas células tumorais. Além disso, este estudo demonstrou que a expressão de CD10 nas células do estroma tumoral está significativamente associada com características histopatológicas do carcinoma, tamanho dos tumores e acúmulo anormal da proteína p53 no carcinoma.

Numa série de carcinomas gástricos, Huang (2005) sugeriu que a expressão do CD10 pelas células estromais poderia estar relacionada à promoção de invasão e metástase nos carcinomas diferenciados.

Em carcinomas nasofaríngeos, Braham (2006) identificou maior expressão de CD10 nas células estromais dos tumores que ocorrem em adultos, sugerindo haver características biológicas distintas entre as formas adultas e

juvenis, tanto quanto às vias da carcinogênese como quanto à progressão tumoral.

## **1.2 PODOPLANINA (D2-40)**

O D2-40 é um anticorpo monoclonal recente que reconhece a podoplanina humana, produzido originalmente contra um antígeno gonadal fetal, o antígeno M2A (Bailey et al,1986). Estudos demonstraram que este antígeno era expresso por certos tipos de tumores, incluindo os carcinomas epiteliais de ovário, mas, estava ausente em muitas outras linhagens celulares de origem extra-gonadal (Marks et al.,1999). Análises bioquímicas mostraram que o antígeno M2A consiste de uma sialoglicoproteína de 40-KDa com estrutura de carboidrato do tipo mucina simples, *O*-glicosilada, necessária para a antigenicidade do anticorpo e que também corava as células endoteliais dos vasos linfáticos, mas não as dos vasos sanguíneos (Marks et al., 1999; Kahn et al., 2002; Choi et al., 2005). Esta proteína é semelhante à podoplanina, que é uma glicoproteína transmembrana, sialomucina-símile, de 38KD que apresenta extensa *O*-glicosilação e alto teor de ácido siálico. Ela é composta por um domínio extracelular, uma porção transmembrana e uma cauda citoplasmática para a proteína kinase C e para fosforilação do AMPc (Martin-Villar et al., 2005; Wicki e Christofori, 2007). A podoplanina é altamente expressa como gene linfático-específico em culturas de células endoteliais linfáticas (Hirakawa et al.,2003) e considerada gene alvo do Prox-1, que controla o desenvolvimento dos progenitores linfáticos das veias embriônicas (Hong et al., 2002). A expressão da podoplanina, *in vivo*, foi

inicialmente descrita por Wetterwald e colaboradores (1996) que a denominaram de “antígeno E11”. Posteriormente, foi identificada na superfície dos podócitos de camundongos e que, por estar envolvida nos processos podais da nefrose induzida pela puromicina, recebeu a denominação de podoplanina (Breiteneder-Geleff et al., 1997; Ordóñez, 2006).

Destas observações, foi levantada a hipótese de que o antígeno M2A, reconhecido pelo anticorpo D2-40, poderia ser idêntico à podoplanina humana. Tal hipótese foi confirmada por estudos de *Western blotting* e *Elisa*, concluindo que o **D2-40 é um anticorpo específico contra a podoplanina humana** (Schacht et al., 2005).

Schacht e colaboradores (2005), mostraram que a podoplanina, detectada pelo anticorpo D2-40, é um marcador específico para vasos linfáticos associados aos tumores humanos, como confirmado pela co-expressão da podoplanina, LYVE-1 e Prox-1 nos vasos linfáticos associados ao melanoma. É interessante ressaltar que camundongos com deficiência de podoplanina desenvolvem linfedema congênito e têm defeitos no desenvolvimento dos vasos linfáticos, mas não nos dos vasos sanguíneos (Schacht et al., 2003; Fukunaga, 2005).

A podoplanina também está expressa em grande número de células não endoteliais de tecidos normais, particularmente, em alguns tipos celulares que são expostos ao fluido de interface, sendo interessante ressaltar a expressão da podoplanina nas células epiteliais dos ductos biliares hepáticos que estão expostos à bile alcalina (Schacht et al., 2005).

Vários homólogos da podoplanina foram reconhecidos, entre eles o T1 alpha, expresso na superfície apical das células alveolares tipo 1 dos pulmões de rato (Dobbs et al.,1988), o OTS-8 (Nose et al.,1990), RTI40 (Gonzalez et al.,1998), gp38 (Farr et al.,1992), gp40 canino (Zimmer et al.,1997), gp36 humano (Zimmer et al.,1999) e PA2.26 murino (Gandarillas et al.,1997). No entanto, a função biológica da podoplanina ainda é pouco compreendida. A expressão da podoplanina/T1 alfa nas células alveolares tipo I e nos podócitos glomerulares do rim, indicam que a extensa porção O –glicosilada da podoplanina, com seu alto conteúdo de ácido siálico e sua estrutura negativa alterada, pode ter função protetora nos compartimentos com fluidos internos e externos (Rishi et al.,1995; Kato et al., 2003; Kato et la., 2004, Kato et al., 2005, Schacht et al., 2005 e) .

No Sistema Nervoso Central, a podoplanina é expressa por células epiteliais ependimárias ciliadas que revestem o sistema ventricular e o canal central, e pelas células do plexo coróide que representam um epêndima modificado recobrando um core de tecido conjuntivo altamente vascularizado (Roy et al., 2005; Mishima K et al., 2006). Estes achados estão de acordo com a expressão relatada do marcador alveolar tipo I, T1 alfa nas células do plexo coróide pelo fato da podoplanina e o T1 alfa serem proteínas idênticas (Roy et al., 2005).

Outra função proposta para a podoplanina relaciona-se à reorganização do citoesqueleto celular e seu importante papel na mediação das propriedades contráteis celulares (Wicki e Christofori, 2007). Ross e colaboradores (1989), demonstraram que a super-expressão da podoplanina nas células endoteliais

vasculares cultivadas promoveu a formação de extensões celulares alongadas, aumento da adesão das células endoteliais, migração e formação de túbulos, indicando importante participação na reorganização cito-esquelética. Esta potencial função da podoplanina é sustentada pelos resultados destes autores, que observaram forte expressão da proteína nos miofibroblastos da próstata, nas células mioepiteliais da mama e das glândulas salivares, nos fibromiócitos dos testículos e nas células do perineuro. Todos estes tipos celulares são contráteis, apresentando freqüentes alterações na sua forma, mediadas por miofilamentos.

Em relação à utilidade do **D2-40 como ferramenta diagnóstica**, vale ressaltar que ao contrário da maioria dos marcadores endoteliais utilizados na rotina da Patologia Cirúrgica, que também são expressos em vasos sanguíneos, a podoplanina é uma proteína seletivamente expressa no endotélio linfático, sendo marcador útil para determinar invasão linfática tumoral (Kahn et al., 2002; Dadras et al., 2003 e Schmid et al., 2005) e para demonstrar a diferenciação linfática de tumores vasculares benignos e malignos (Breiteneder et al.,1999; Kahn et al., 2002 e Ordóñez, 2005). A forte expressão da podoplanina nas lesões viscerais e em todos os diferentes estágios da progressão cutânea do Sarcoma de Kaposi clássico e daqueles relacionados à AIDS e ao transplante, confirmaram a origem endotelial destas lesões, indicando que a identificação desta proteína pode ajudar no diagnóstico destas neoplasias, antes consideradas de origem controversa (Breiteneder-Geleff et al.,1999 e Kahn et al., 2002).

A podoplanina também é útil no diagnóstico diferencial de várias neoplasias não-vasculares, entre elas os mesoteliomas epitelióides (Ordóñez,

2005) e os tumores de células germinativas gonadais e extra-gonadais (Bailey et al.,1991; Marks et al.,1999; Schach et al., 2003; e Kato et al., 2004). Além disso, Roy e colaboradores. (2005) relataram a expressão da podoplanina em 23/23 hemangioblastomas (tumor cerebral de histogênese incerta, caracterizado pela presença de células tumorais vacuolizadas) e Ordóñez (2006) em 4/6 sarcomas sinoviais bifásicos (no componente epitelíode) e em 2 sarcomas sinoviais monofásicos. Entretanto, a utilidade diagnóstica prática da podoplanina nestes tumores requer estudos posteriores (Ordóñez, 2006).

Em relação ao papel da **podoplanina na progressão tumoral**, a observação da super-regulação do homólogo da podoplanina, PA 2.26, durante a carcinogênese epidérmica nos murinos, e os achados prévios de que sua super-expressão promoveu a motilidade e a migração celulares, indicam que esta proteína pode desempenhar papel significativo no comportamento dos tumores (Gandarillas et al.,1997).

Estudo recente de Wicki e Christofori (2006), sobre a invasão tumoral na ausência da transição epitelial mesenquimal (do inglês EMT), demonstra que a podoplanina provoca a formação de filopodia, por modular a atividade da família das Rho-GTPases, levando à invasão celular coletiva, fenótipo frequentemente observado nos carcinomas humanos.

Além disso, há relatos que descrevem a podoplanina como sendo fator de agregação plaquetária. Assim, as células tumorais que a expressam são circundadas pelas plaquetas que facilmente aderem-se ao endotélio, primeiro passo para a saída do vaso, sendo protegidas da vigilância imunológica,

facilitando as metástases (Gasic et al.,1984; Honn et al.,1988; Crissman et al.,1988). Nesta mesma linha de ação, Mahalingam e colaboradores (1988) sugeriram que a atividade de agregação plaquetária pelas células tumorais está correlacionada com a taxa de metástases ao observarem que as células tumorais que agregavam plaquetas fortemente, apresentavam alta taxa de metástases à distância em contraste com aquelas cuja agregação era fraca (Mahalingam et al.,1988). Estes achados sugerem que as plaquetas podem desempenhar importante papel na promoção da invasão tumoral (Suzuki et al., 2004).

Outro aspecto a ser ressaltado é a expressão de podoplanina pelos carcinomas escamosos. Segundo Schacht e colaboradores. (2005), em seus estudos com pele de ratos, a expressão da podoplanina, embora negativa na maioria dos queratinócitos da pele humana normal, era fraca e focal nos queratinócitos basais. No entanto, a maioria dos carcinomas escamosos da pele humana expressava fortemente a podoplanina, particularmente os recorrentes. Além disso, identificaram que sua expressão estava ausente nos carcinomas escamosos bem diferenciados e aumentada nos moderadamente e pouco diferenciados.

Kawase e colaboradores (2008) estudaram a expressão da **podoplanina nos fibroblastos associados ao câncer**, ou seja, naqueles recrutados pelo tecido carcinomatoso e observaram que, no adenocarcinoma pulmonar, esta expressão ocorreu apenas nos tumores invasivos e que estava significativamente associada com sobrevida mais curta. Suzuki e colaboradores (2004) descreveram que a expressão da podoplanina pelas células malignas

promove a agregação plaquetária e que esta pode estar envolvida na migração das células malignas, invasão, metástase e progressão maligna; e sugeriram que os fibroblastos associados ao câncer, podoplanina positivos, também poderiam ter habilidade de agregar plaquetas e assim, contribuir para um comportamento agressivo da neoplasia.

### 1.3 NEOPLASIAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL

Entre os tumores de glândula salivar com componente mioepitelial estão principalmente aqueles que apresentam certa semelhança com a composição celular do ducto intercalado da glândula, ou seja, contém dupla população de células (epitelial e mioepitelial) ou apenas células mioepiteliais. Deste grupo de tumores fazem parte neoplasias benignas e malignas, nas quais a participação da célula mioepitelial ocorre de modo variado, tanto em termos de morfologia como em quantidade (Dardick e Nostrand, 1985; Martinez-Madrigal, 1989; Dardick, 1991; Dardick, 1993; Garrett et al., 1998; Furuse, 2005; Skálová, 1996).

No **Adenoma pleomórfico** (neoplasia com diferenciação epitelial ductal e mioepitelial), as células mioepiteliais tendem a ser o elemento predominante e podem ser fusiformes, poligonais, claras, plasmocitóides e estreladas. São elas que produzem a matriz mucopolissacarídea, que sofre metaplasia condróide e óssea, formando áreas com aspecto mesenquimatoso. Das neoplasias com diferenciação mioepitelial, o Adenoma pleomórfico é a mais comum das glândulas salivares maiores e menores, representando 45% a 76% de todos os tumores (Dardick, 1983 a; Dardick, 1992; Margaritescu et al., 2004; Erlandson et al., 1984).

O **Adenoma de células basais (ACB)** é constituído por proliferação uniforme de células neoplásicas com aspecto basalóide, o que contrasta com o aspecto histológico variado do adenoma pleomórfico. Os ACB são histologicamente classificados como tubulares, trabeculares, sólidos e membranosos. As células neoplásicas são epiteliais ductais e mioepiteliais e estão presentes em quantidades variadas nos diferentes subtipos histológicos, sendo que o tubular tem a diferenciação ductal mais proeminente. As células estromais e a camada mais externa dos ninhos epiteliais são as que apresentam diferenciação mioepitelial (Jao et al.,1976; Dardick et al.,1986; Ogawa et al.,1990; Takahashi et al.,1991; Dardick, 1992; Ferreiro, 1994).

O **Mioepitelioma (M) deve ser distinguido do** adenoma pleomórfico rico em células mioepiteliais e, na literatura, os critérios são variáveis em relação à quantidade de ductos que o mioepitelioma pode conter (Simpson, 1995). As quantidades possíveis de ductos no mioepitelioma, propostas pelos diversos autores, são: a) até 5 a 10% de uma secção microscópica do tumor, b) não mais do que um ducto por cada campo de maior aumento ou não mais do que um pequeno agrupamento de ductos e c) ausência total de ductos (critério adotado no fascículo de tumores das glândulas salivares da AFIP e no nosso estudo). Focos de diferenciação condróide ou osteóide não devem ser encontrados nos mioepiteliomas e, se isto ocorrer, o tumor deve ser classificado como adenoma pleomórfico. Microscopicamente, as células mioepiteliais podem apresentar-se formando 5 padrões citoarquiteturais: tipo células plasmocitóides, células claras,

fusocelulares, reticulares ou uma combinação deles (Scuibba e Brannon, 1982; Dardick et al.,1989; Skálová e Michal, 1994).

O **Carcinoma adenóide-cístico** é a neoplasia maligna com diferenciação mioepitelial mais freqüente da glândula salivar. É um tumor de curso indolente mas persistente, que desenvolve recidivas locais e metástases à distância, mesmo muitos anos após um tratamento inicial aparentemente bem sucedido (somente 10% dos pacientes sobrevivem até 15 anos). É constituído predominantemente por células com diferenciação mioepitelial e aspecto basalóide e por quantidades menores de células epiteliais ductais. As células neoplásicas organizam-se em 3 padrões de crescimento principais: tubular, cribriforme e sólido, sendo que os 3 estão presentes em quase todos os tumores (Perzin et al.,1978). Os sistemas de graduação histopatológica de malignidade são baseados principalmente na proporção do padrão de crescimento sólido, visto que vários estudos têm mostrado que tumores com este componente teriam um curso clínico desfavorável, com recidivas e metástases precoces e curso fatal. Nos dois sistemas mais usados, o grau III é constituído respectivamente por a) tumores com 30% ou mais de áreas sólidas (Szanto et al.,1984) e b) tumores em que o padrão sólido é predominante (Eby et al.,1972). No nosso estudo, utilizamos o sistema proposto por Szanto e colaboradores (1984). No carcinoma adenóide-cístico, o pior prognóstico está associado à:

- Histologia - forma sólida em mais que 30% do tumor;
- Tamanho - maior que 4 cm;

- Sítio anatômico: tumores em glândula submandibular e salivares menores;
- Margens cirúrgicas comprometidas;
- Presença de metástases (40 – 60% dos casos);
- Estadio clínico III e IV;
- Conteúdo de DNA - aneuploidia e fração S alta;
- Atividade proliferativa alta (Ki 67).

**Carcinoma epitelial-mioepitelial** (CEME) de glândula salivar é uma neoplasia de baixo grau, composta de proporções variáveis de células ductais e mioepiteliais. As células mioepiteliais estão localizadas perifericamente às células ductais ,geralmente são poliédricas e claras, mas também podem ser fusiformes. As células ductais são semelhantes às células epiteliais do ducto intercalado e apresentam citoplasma eosinófilo. Na maioria dos tumores, as células mioepiteliais constituem o componente predominante, sendo que as células ductais podem estar quase ausentes (Seethala et al., 2007). Cerca de 30 a 50% dos casos apresentam recidiva local, 18% metástases ganglionares, 8% metástases à distância e 8% morrem da doença. As metástases e recidivas podem ocorrer após longo intervalo de anos seguindo o tratamento inicial. O carcinoma epitelial-mioepitelial pode se originar num adenoma pleomórfico e, nestes casos, o seu reconhecimento é freqüentemente difícil devido à semelhança morfológica das duas neoplasias e a falta de atipias celulares. Nesta situações é importante observar a presença de extensa área com padrão morfológico do carcinoma

epitelial-mioepitelial e a presença de crescimento infiltrativo (Corio et al.,1982; Daley et al.,1984; Luna et al.,1985; Litman et al.,1987; Fonseca, 1993).

O **Carcinoma mioepitelial** deve apresentar diferenciação mioepitelial exclusiva e evidência inequívoca de malignidade. Em relação ao primeiro ítem são **excluídos** os tumores com diferenciação para células luminares, ou seja, que contenham túbulos bem formados, com bordo celular luminal rígido, como ocorre no carcinoma epitelial-mioepitelial com predomínio de células mioepiteliais. A natureza mioepitelial das células pode ser confirmada pelo método imunohistoquímico (positividade para citoceratina e um ou mais marcadores mioepiteliais - proteína S-100, actina músculo liso, actina músculo específica ou calponina) e/ou ultraestrutural (filamentos intermediários intracitoplasmático com corpos densos, membrana basal extracelular e complexos juncionais (Takai et al.,1995; Morinaga et al.,1987). Em relação à evidência inequívoca de malignidade, o **critério mínimo** é infiltração tumoral na glândula salivar ou tecidos adjacentes (Savera et al., 2000). Microscopicamente, é constituído por um tipo ou mais de células mioepiteliais, que podem ser: epitelióides, claras, hialinas (plasmocitóides), fusocelulares ou mistas. O padrão de crescimento é freqüentemente multinodular, mas pode ser sólido, difuso ou cordonal ou com ninhos pequenos. A matriz relacionada ao tumor pode ser mixóide e hialinizada (Dipalma e Guzzo, 1993; El-Mofty et al.,1994)

O **Adenocarcinoma polimórfico de baixo grau (APBG)** neoplasia originada das células do ducto intercalado terminal, descrita simultaneamente em 1983 como **adenocarcinoma do ducto terminal** (Batsakis et al.,1983) e como

**carcinoma lobular** (Freedman e Lumerman, 1983), recebeu a denominação atual por Evans e colaboradores. (1984 e 2002). Estudos ultraestruturais demonstraram que alguns tumores apresentam apenas células luminais, outros apresentam células luminais e mioepiteliais ou basais, enquanto outros são compostos quase que exclusivamente por células mioepiteliais (Luna et al.,1987; Dardick et al.,1988; Nicolatou et al.,1988; Norberg et al.,1991). Em um relato de caso com achados ultraestruturais, Dardick e colaboradores (1988) descreveram que o excesso de lâmina basal foi uma característica relevante do **APBG com diferenciação mioepitelial**. A neoplasia é quase exclusiva das glândulas salivares menores, acometendo o palato em cerca de 60% dos casos, sendo mais frequente em mulheres com idade entre 16-94 anos. (Ellis e Auclair, 1996). Apresenta padrão de crescimento infiltrativo com neurotropismo, grande variedade de padrões morfológicos (sólido, trabecular, cribriforme, tubular e papilar), que dificulta o diagnóstico em biópsias incisionais, e marcada uniformidade citológica (Beltran e Faquin, 2006). O Carcinoma Adenóide Cístico e o Adenoma Pleomórfico são as principais neoplasias envolvidas no seu diagnóstico diferencial pela significativa superposição de padrões morfológicos entre eles. O adenocarcinoma polimórfico de baixo grau geralmente apresenta excelente prognóstico após excisão cirúrgica completa (Anderson et al., 1990; Norberg et al.,1991). No entanto, há relatos de transformação para lesão de alto grau (Pogodzinski et al.,2006) e de associação do padrão papilar com agressividade biológica (Evans e Batsakis,1984; Godoy et al., 2007). Speigth e Barret (2002), consideram o APBG uma lesão controversa, de difícil diagnóstico e comportamento imprevisível, cujo nome mais apropriado deveria ser Adenocarcinoma Polimórfico.



## **2. Justificativa**

---

Nas neoplasias de glândulas salivares, a morfologia e a quantidade de células mioepiteliais são muito variadas, o que contribui tanto para a diversidade como para as semelhanças histológicas que compartilham. Um mesmo tumor pode apresentar vários padrões morfológicos e neoplasias diferentes, inclusive benignas e malignas, podem mostrar padrões semelhantes em áreas distintas. Portanto, embora o diagnóstico diferencial destas lesões possa ser fácil em certas ocasiões, principalmente em peças cirúrgicas, onde a farta representação do material permite analisar os diversos padrões morfológicos, em outras, particularmente em biópsias incisionais, onde a representação é mais restrita, o diagnóstico correto pode ser impossível. Nas ocasiões de dificuldades diagnósticas, o exame imunoistoquímico tem um papel importante para a sua elucidação. Neste contexto, embora CD10 e D2-40 já tenham sido demonstrados em células mioepiteliais normais, ainda não foi verificada a sensibilidade destes marcadores para detectar células mioepiteliais transformadas numa série de neoplasias salivares com tal diferenciação e nem a utilidade (se alguma) na distinção destas neoplasias entre si. Além disso, nestas neoplasias, ainda não foi investigado se a expressão de CD10 e D2-40 ocorreria em células não mioepiteliais (incluindo as células da resposta estromal associada ao tumor) e se esta poderia ter correlação com progressão tumoral (metástase, recidiva, estadiamento, transformação para alto grau). Portanto, o estudo da expressão do CD10 e do D2-40 em neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial pode propiciar uma melhora da acuidade diagnóstica destas lesões e detecção de

fatores relacionados ao comportamento biológico, sendo que ambos são importantes para o manejo adequado das neoplasias.

## **3. Objetivos**

---

### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar a imuno-expressão do CD10 (NEP) e da podoplanina (D2-40) em neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial, subdivididas em benignas e malignas, com a finalidade de verificar: a) sua utilidade como marcadores de células mioepiteliais, comparando a expressão destas proteínas com a  $\alpha$ -actina de músculo liso (AML) e b) sua possível expressão em células não mioepiteliais, incluindo as estromatosas da reação desmoplásica associada ao carcinoma, correlacionando-a com fatores prognósticos.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Em neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial, subdivididas em benignas (adenoma pleomórfico, adenoma de células basais e mioepitelioma) e malignas (carcinoma adenóide cístico, carcinoma epitelial-mioepitelial, carcinoma mioepitelial e adenocarcinoma polimórfico de baixo grau) visamos:

3.2.1 - Avaliar a frequência e a intensidade de expressões do CD10 e da Podoplanina (D2-40) nas células neoplásicas (mioepiteliais e epiteliais) e nas estromatosas associadas aos carcinomas;

3.2.2 - Comparar a frequência e a intensidade de expressões do CD10 e do D2-40 (podoplanina) em relação à da  $\alpha$ -actina de músculo liso (AML) nas células mioepiteliais e nas estromatosas associadas ao carcinoma;

3.2.3 - Correlacionar as expressões do CD10 e do D2-40 (podoplanina) nas células não mioepiteliais com variáveis clínico-patológicas, associadas ao prognóstico: recidiva local, metástase, estadiamento e transformação para alto grau.

## **4. Material e Métodos**

---

## 4.1 GRUPO DE ESTUDO

Foram analisados, retrospectivamente, 79 casos de neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial sendo 44 casos de carcinomas e 35 casos de neoplasias benignas, todos provenientes dos Arquivos do Departamento de Anatomia Patológica (DAP) da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP.

Os **carcinomas salivares** com diferenciação mioepitelial foram distribuídos em 4 grupos:

1. Carcinoma Adenóide Cístico (CAC) - 20 casos;
2. Carcinoma Epitelial-Mioepitelial (CEME) – 12 casos;
3. Carcinoma Mioepitelial (CME) – 5 casos;
4. Adenocarcinoma Polimórfico de Baixo Grau (APBG) – 7 casos

As **neoplasias benignas** foram distribuídas em 3 grupos:

1. Adenoma Pleomórfico (AP) – 20 casos;
2. Mioepitelioma (M) – 11 casos e
3. Adenoma de Células Basais (ACB) – 4 casos.

## 4.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os diagnósticos de todos os casos foram revistos por dois patologistas (CN e AA) e, em cada um deles, os blocos que continham os fragmentos mais representativos do tumor, foram selecionados para exame imunoistoquímico.

### 4.3 TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

O Estudo imunistoquímico, utilizando os anticorpos D2-40 (Dako), CD10 (Neomarkers/Labvision – Clone 56C6) e actina músculo liso (Dako – clone 1A4), foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental (CAISM, UNICAMP), seguindo protocolos previamente estabelecidos, conforme segue:. Nos blocos selecionados, de cada caso, foram feitas secções de 4µm de espessura e o material colocado em lâminas tratadas com solução de organossilano a 4% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, SIGMA código A3648). A seguir, foram colocadas em estufa a 110°C por uma hora, antes do início do processo de coloração imunistoquímico. A desparafinização foi feita com três banhos de xilol, o primeiro à 110°C e os dois últimos à temperatura ambiente, para retirar o excesso de parafina. Em seguida, foi realizada a hidratação em dois banhos de álcool absoluto, posteriormente, em banhos de álcool, em concentrações decrescentes de 80% e 50%, depois foram lavadas em água corrente e em seguida, em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito através de três banhos de imersão em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 10% à temperatura ambiente, por três minutos cada, seguidos de lavagem em água corrente e passagem por água destilada. A recuperação antigênica foi realizada pela imersão das lâminas em solução tampão de Tris - EDTA, pH 8.9, para o CD10 e o D2-40 e em citrato, pH 6.0, para a α- actina de músculo liso (1A4) utilizando-se o calor úmido da panela a vapor T-fal (Steam Cuisine Hi-Speed 700) à 95°C por 30 minutos, para os três anticorpos. Após esfriarem durante 15 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, permanecendo

em solução tampão fosfato (PBS). Posteriormente, pingou-se sobre os cortes o bloqueador de proteínas (Dako x0909) deixando-o agir por 30 minutos a 37°C. Em seguida, realizou-se a reação antígeno-anticorpo primário, na qual os anticorpos primários D2-40, CD10 e  $\alpha$ -actina músculo liso (1A4) foram gotejados sobre os cortes histológicos nas diluições de 1:200, de 1:50 e de 1:200, respectivamente e incubados em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37°C, permanecendo, em seguida, em câmara úmida a 4°C por 16-18 horas (“overnight”). Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em solução salina tampão (PBS), por três minutos cada, à temperatura ambiente, para retirada do excesso do anticorpo primário. A detecção do anticorpo primário foi efetuada utilizando-se o Sistema EnVision Plus (Dako). O sistema foi gotejado sobre os cortes histológicos que permaneceram, durante uma hora, em câmara úmida a 37°C. Em seguida, as lâminas foram submersas em solução salina tampão (PBS), à temperatura ambiente. A coloração foi realizada utilizando o DAB (3,3-tetra-hidroclorato de diaminobenzidina, SIGMA, código D5637), cromógeno de cor marron que impregnou os locais onde ocorreu a seguinte reação:  $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ . As lâminas foram mergulhadas na seguinte solução: 60mg de DAB, 1500 mL de peróxido de hidrogênio e 1000 mL de DMSO – todos diluídos em 100 mL de solução salina tampão PBS por 5 minutos à 37°C. A seguir, foram submetidas novamente à lavagem em água corrente e passagem por água destilada. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris (Merck), durante 15 segundos, à temperatura ambiente, com posteriores lavagens em água corrente e destilada. A seguir, a desidratação foi feita pela passagem das lâminas em três banhos de álcool absoluto e de xilol. A montagem foi feita colocando-se as lamínulas sobre

os cortes histológicos utilizando-se a resina histológica Entellan (Merck, código 7961), estando então, prontas para leitura ao microscópico óptico.

#### 4.4 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

A positividade dos marcadores foi evidenciada pela coloração marrom. Nos casos corados com os anticorpos CD10 e D2-40, as células positivas exibiam os padrões de coloração dos tipos membrana/luminal e citoplasmático. Nos casos corados com o anticorpo 1A4, a positividade foi apenas citoplasmática.

Os controles internos, para o anticorpo CD10, foram células mioepiteliais de glândula salivar normal e para o D2-40 foram endotélio dos vasos linfáticos e células mioepiteliais de glândulas salivares normais. Para o 1A4, os controles internos foram células musculares lisas de vasos sangüíneos e células mioepiteliais da glândula salivar normal.

A avaliação de positividade e de intensidade da reação imunoistoquímica foi realizada em pequeno aumento (4x):

**a) as células tumorais positivas** foram classificadas quanto a sua histogênese (mioepitelial ou epitelial) e foi utilizada uma escala semi-quantitativa para estabelecer os seguintes scores:

- Negativa: coloração ausente ou  $\leq 10\%$  (das células examinadas);
- 1+ :  $\geq 10\%$  -  $< 25\%$  (das células examinadas) – fraca intensidade;
- 2+ :  $\geq 25\%$  -  $< 50\%$  (das células examinadas) – média intensidade;
- 3+ :  $\geq 50\%$  (das células examinadas) – forte intensidade.

**b) as células estromais da reação desmoplásica** à infiltração carcinomatosa foram avaliadas, sendo consideradas positivas apenas os casos que continham mais de 10% de células coradas.

#### **4.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA**

As informações clínicas foram obtidas dos prontuários médicos do SAME (Serviço de Arquivo Médico) do Hospital das Clínicas – UNICAMP. O Carcinoma Adenóide Cístico (CAC), por representar o grupo com maior número de casos desse estudo, foi o único no qual a expressão dos marcadores CD10 e D2-40 pôde ser correlacionada com fatores prognósticos (estadiamento, recidiva local e metástases).

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Realizada pelo Serviço de Estatística da Comissão de Pesquisa da FCM/UNICAMP. Foram utilizados os seguintes testes:

1. Qui-quadrado e exato de Fisher - para comparar as variáveis categóricas entre os grupos (para valores esperados menores que 5);
2. Mann-Witney - para comparar as variáveis contínuas entre os grupos;
3. Cochran - para comparar a expressão da positividade entre os três marcadores nas células tumorais (de forte intensidade >50%) e no estroma.

4. Friedman - para comparar a expressão da positividade entre os três marcadores, nas células tumorais das neoplasias malignas e benignas, tanto para as amostras gerais, como para os grupos do Carcinoma Adenóide Cístico (CAC), Carcinoma Epitelial Mioepitelial (CEME), Adenoma Pleomórfico (AP) e Mioepitelioma (M), que foram as neoplasias mais freqüentes.
5. McNemar – para comparar amostras dependentes, relacionadas ou pareadas, ou seja, para comparar a expressão entre dois marcadores num mesmo grupo de neoplasias.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .

## **5. Resultados**

---

## **5.1 DADOS GERAIS**

### **5.1.1 EXPRESSÃO DE CD10 E D2-40 EM ESTRUTURAS NORMAIS DAS GLÂNDULAS SALIVARES**

Estes dois anticorpos são expressos nas células mioepiteliais normais das estruturas acinares e dos ductos intercalados, sendo que CD10 apresenta maior expressão nas células mioepiteliais acinares e D2-40 nas células dos ductos intercalados. Os padrões de expressões observados foram predominantemente citoplasmáticos e/ou de membrana para o CD10 e citoplasmático para D2-40 (Fig 1).

### **5.1.2 CARCINOMAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL:**

Dos 44 carcinomas examinados, 71,87% (23/32) eram mulheres e 28,12% (9/32) homens, as idades variaram de 19 a 72 anos (Mo= 49 anos). Destes, 58,83% (17/31) acometeram as glândulas salivares menores e 45,16% (14/31) as maiores. As freqüências entre os quatros grupos examinados estão demonstradas na figura 2 e os seguintes achados foram observados:

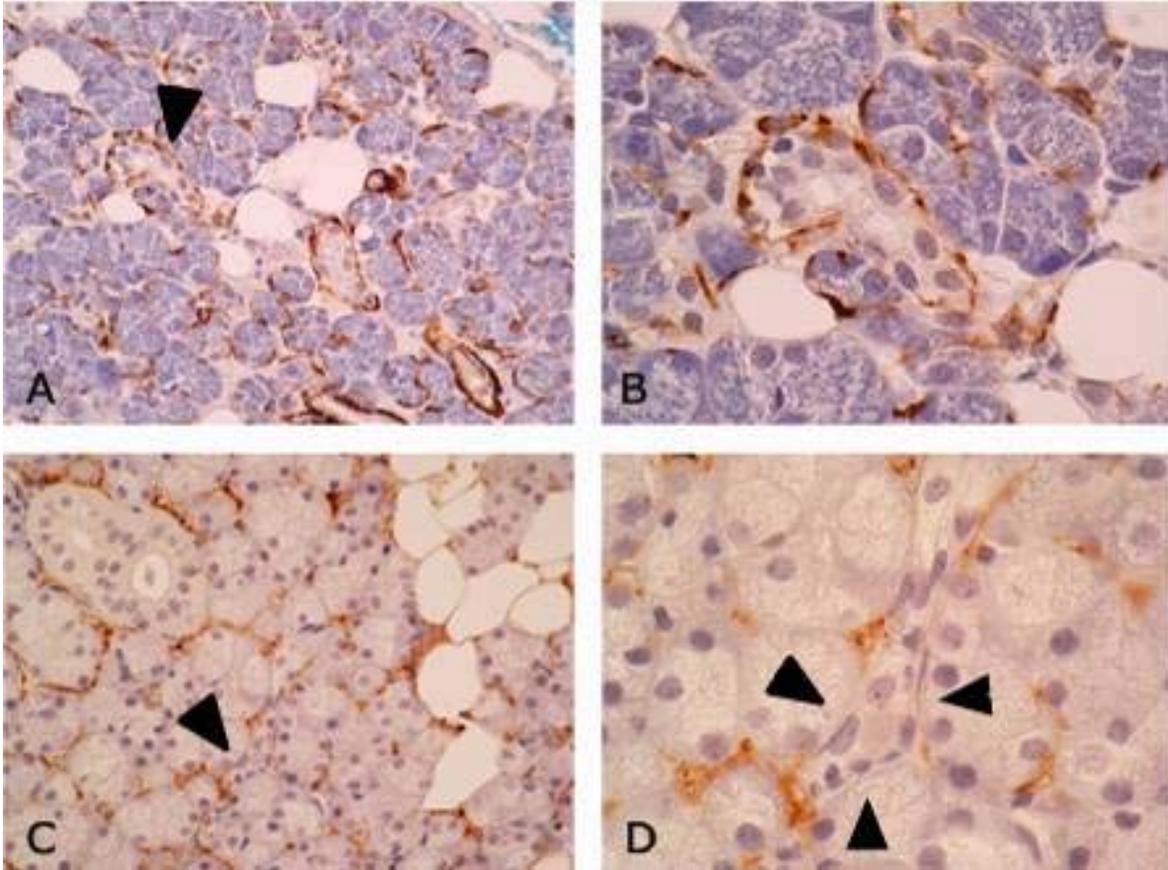
**5.1.2.1 - Carcinomas Adenóides Císticos (CAC)** – corresponderam a 45,45% (20/44) dos carcinomas, sendo 73,68% (14/19) mulheres e 26,31% (5/19) homens, com idades entre 19 e 65 anos (Mo= 47 anos). Destes, 52,94% (9/17) acometeram as glândulas salivares maiores e 47,06% (8/17) as menores. As proporções entre os tipos histológicos tubulares/cribriformes e sólidos (Barnes et al., 2005), foram semelhantes (50% para cada tipo). O estágio T4 foi mais

freqüente, correspondendo a 53,33% (8/15) dos casos. As recidivas locais ocorreram em 20% (3/15) dos casos e as metástases em 40% (6/15).

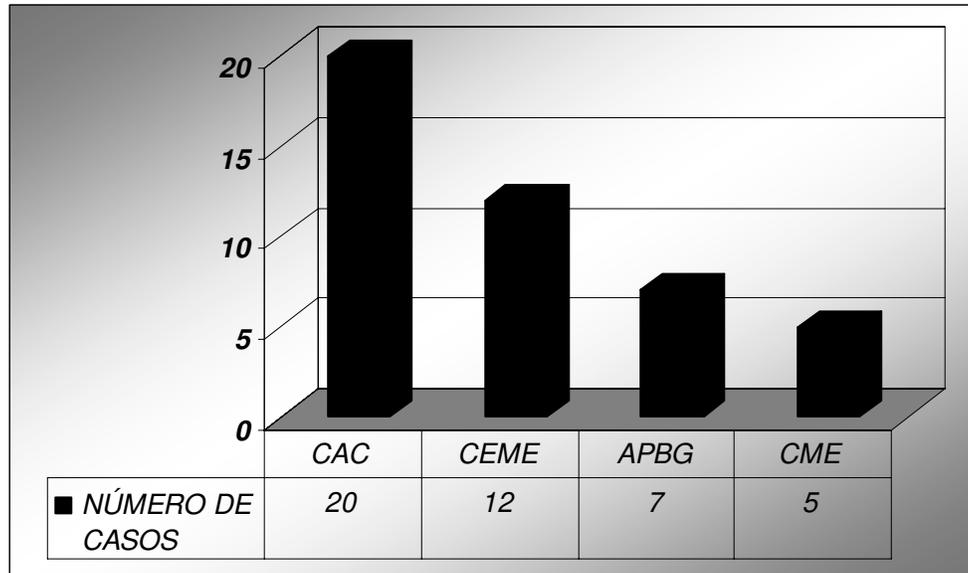
**5.1.2.2 - Carcinomas Epiteliais-Mioepiteliais (CEME)** – corresponderam a 27,27% (12/44) dos casos, sendo 60% mulheres e 40% homens. As idades variaram entre 37 a 72 anos (Mo= 55 anos). Destes, 83,33% acometeram as glândulas salivares maiores e 16,66% as menores.

**5.1.2.3 - Adenocarcinomas Polimórficos de Baixo Grau (APBG)** - representaram 15,91% (7/44) dos casos, sendo 83,33% mulheres e 16,67% homens. As idades variaram entre 25 a 56 anos (Mo= 46 anos). Destes, 100% ocorreram nas glândulas salivares menores, sendo 85,71% localizadas no palato e 14,29% na língua.

**5.1.2.4 - Carcinomas Mioepiteliais (CME)** – corresponderam a 11,36% (5/44) dos casos. Nestes, as informações clínicas foram escassas e em apenas dois casos, um deles acometendo um homem e o outro uma mulher de 69 anos de idade, cuja lesão acometia glândula salivar menor.



**Figura 1** – Glândula salivar normal – (A e B)- D2-40 expressão nas células mioepiteliais acinares e dos ductos intercalados, mais acentuada ao redor dos ductos intercalados. (C e D)- CD10 – expressão mais acentuada nas células mioepiteliais acinares (40X e 400X).



**Figura 2** – Frequência dos carcinomas salivares com diferenciação mioepitelial. CAC: (Carcinoma Adenóide Cístico); CEME:(Carcinoma Epitelial-Mioepitelial); APBG:(Adenocarcinoma Polimórfico de Baixo Grau); CME: (Carcinoma Mioepitelial).

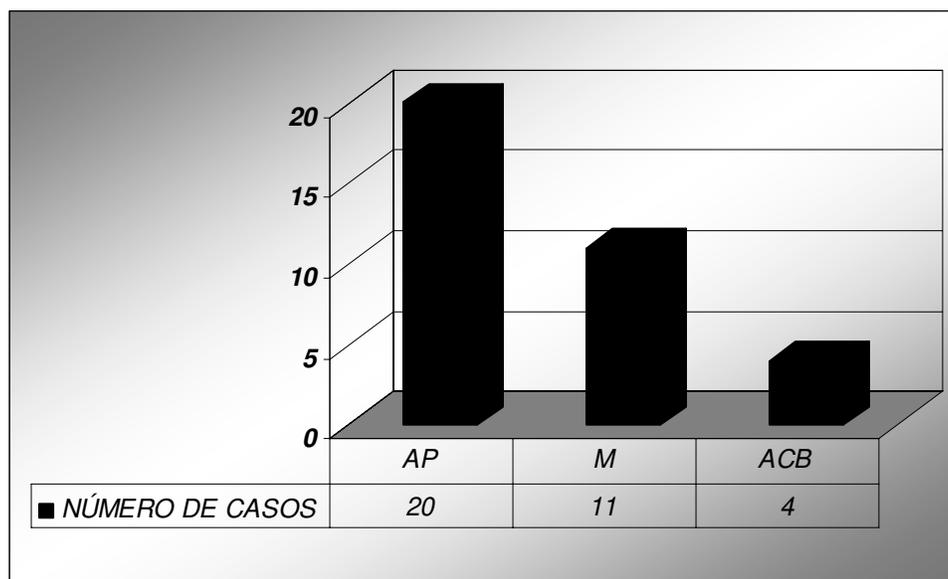
### 5.1.3 NEOPLASIAS BENIGNAS COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL

Dos três grupos de neoplasias estudados, 56,52% (13/23) dos casos eram mulheres e 43,48% (10/23) homens. As idades variaram entre 18 e 79 anos (Mo= 48 anos), sendo as glândulas salivares maiores afetadas em 85,19% (23/27) dos casos e as menores em 14,81% (4/27). As frequências entre os grupos estão demonstradas na figura 3 e os achados encontrados foram os seguintes:

**5.1.3.1- Adenomas Pleomórficos (AP)** – corresponderam a 57,14% (20/35) das neoplasias benignas com idades entre 18 e 79 anos (Mo= de 46 anos). Destes, 52,94% (9/17) eram mulheres e 47,06% (8/17) eram homens. As glândulas salivares maiores foram acometidas em 100% dos casos.

**5.1.3.2 - Mioepiteliomas (M)** – corresponderam a 31,43% (11/35) dos casos, sendo 75% mulheres e 25% homens, com idades entre 57 e 60 anos (Mo= 58 anos). A localização foi equitativa entre as glândulas salivares maiores (50%) e menores (50%).

**5.1.3.3 - Adenomas de Células Basais (ACB)** - menor grupo, correspondendo a 11,43% (4/35) dos casos com proporções equitativas (50%) entre homens e mulheres. A faixa etária variou entre 41 e 65 anos (Mo= 53 anos) e 75% das lesões localizavam-se nas glândulas salivares maiores.



**Figura 3** – Frequência das Neoplasias Benignas com diferenciação mioepitelial. AP (Adenoma Pleomórfico); M (Mioepitelioma); ACB (Adenoma de Células Basais).

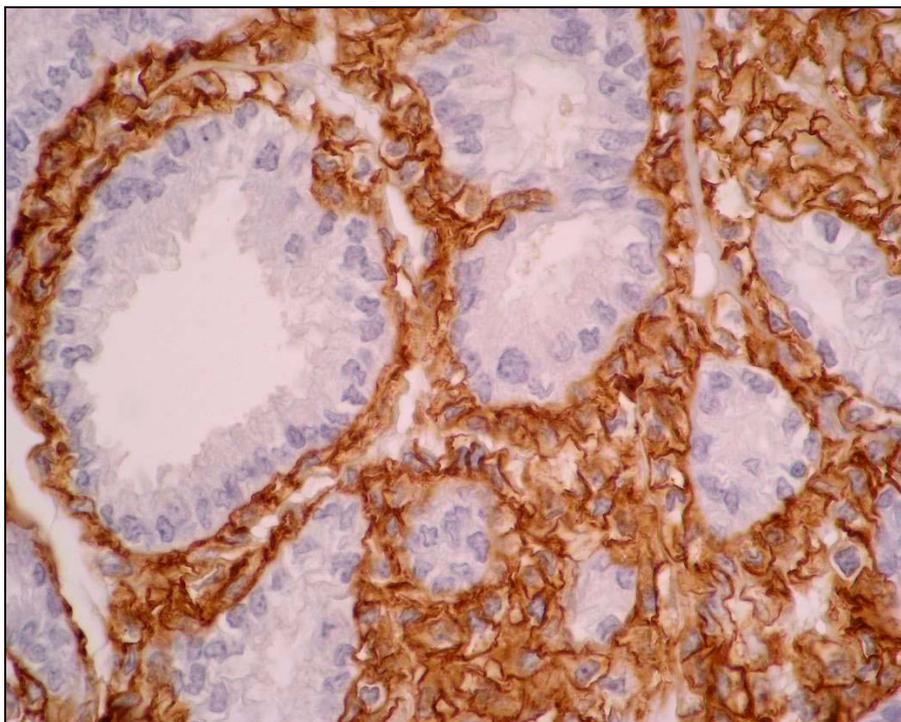
## 5.2 IMUNOEXPRESSION DO CD10 (CALLA/NEP 24.11)

A expressão de CD10 foi detectada apenas em células com morfologia mioepitelial e em células fusiformes do estroma associado ao carcinoma. Em algumas neoplasias, pequena quantidade de células com morfologia epitelial

(<10% das células neoplásicas) foram CD10 positivas e, portanto, a imunopressão deste marcador foi considerada negativa neste tipo celular.

## 5.2.1 - NOS CARCINOMAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL

**5.2.1.1- Nas Células Mioepiteliais:** considerando os carcinomas em geral, a negatividade para esse marcador ocorreu em 72,73% (32/44) dos casos. No entanto, entre os quatro grupos estudados, houve diferença significativa ( $p < 0.001$ ). O Carcinoma Epitelial-Mioepitelial (CEME) apresentou expressão nessas células em 83,33% (10/12) dos casos (Fig.4), sendo de forte intensidade em 33,33% (4/12) deles (Tabela 1). Os Carcinomas Adenóides Císticos e os Adenocarcinomas Polimórficos de Baixo Grau não expressaram esse marcador.



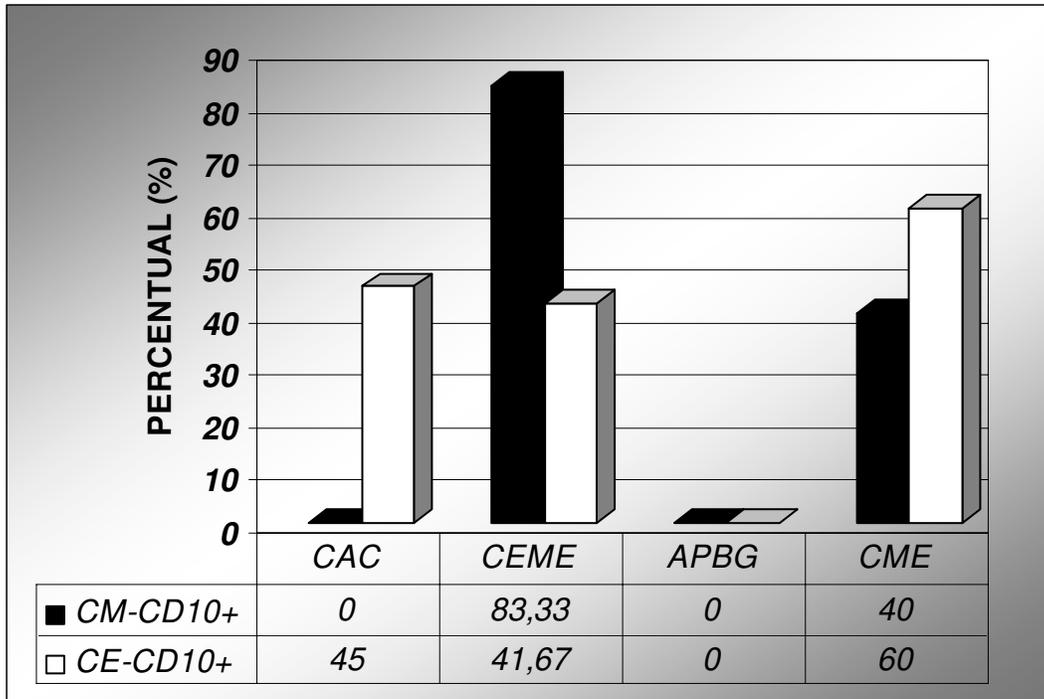
**Figura 4** – CEME (carcinoma epitelial-mioepitelial –400X)- CD10 - expressão intensa, nas células mioepiteliais neoplásicas, de padrões membranosos (predominante) e citoplasmático.

**TABELA 1** – Expressão do CD10 nas células mioepiteliais entre os grupos de carcinomas

CD10 NAS CÉLULAS MIOEPITELIAIS	GRUPOS DE CARCINOMAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL (No. de casos (%))			
	CAC	CEME	CME	APBG
0	20/20 (100%)	2/12 (16.67%)	3/5 (60%)	7/7 (100%)
≥10-50%	0	6/12 (50%)	2/5 (40%)	0
>50%	0	4/12 (33,33%)	0	0

Teste exato de fisher .(p< 0.001).

**5.2.1.2- No estroma tumoral** - considerando os carcinomas em geral, foram observadas células estromatosas positivas, na borda invasiva ou no interior da neoplasia, em 38,64% (17/44) dos casos. Entre os quatro grupos de carcinomas, apenas o Adenocarcinoma Polimórfico de Baixo Grau não expressou esse marcador. Os demais carcinomas o expressaram, porém, a diferença entre eles não foi significativa (p=0.097). A correlação entre a expressão do CD10 nas células mioepiteliais e do estroma tumoral, entre os grupos de carcinomas, está demonstrada na figura abaixo (Fig.5).



**Figura 5** – Expressão do CD10 nas células mioepiteliais (CM) e do estroma tumoral (CE) entre os grupos de carcinomas.

**5.2.1.3 – No Carcinoma Adenóide Cístico** – um dos tipos mais comuns em glândulas salivares e o mais freqüente nesse estudo, o CD10 foi expresso em 45% (9/20) dos casos apenas nas células estromatosas associadas à infiltração carcinomatosa. A análise estatística entre os casos CD10 positivos e CD10 negativos, nas células estromatosas, não apresentou diferenças significantes quando comparadas com os parâmetros clínico-patológicos dos pacientes (tipo histológico, gênero, local, tamanho do tumor, recidiva local e metástases). Em relação à transformação maligna para alto grau (desdiferenciada), em três casos coexistiam áreas convencionais com áreas desdiferenciadas, nas quais o padrão morfológico era de adenocarcinoma ou de carcinoma sólido pouco diferenciado. Em nenhum desses casos foi observada

diferença de expressão do CD10 entre a área desdiferenciada e a convencional (tabela 2).

**TABELA 2 –** Correlação dos parâmetros clínico-patológicos com a expressão do CD10 nas células estromatosas associadas à infiltração carcinomatosa.

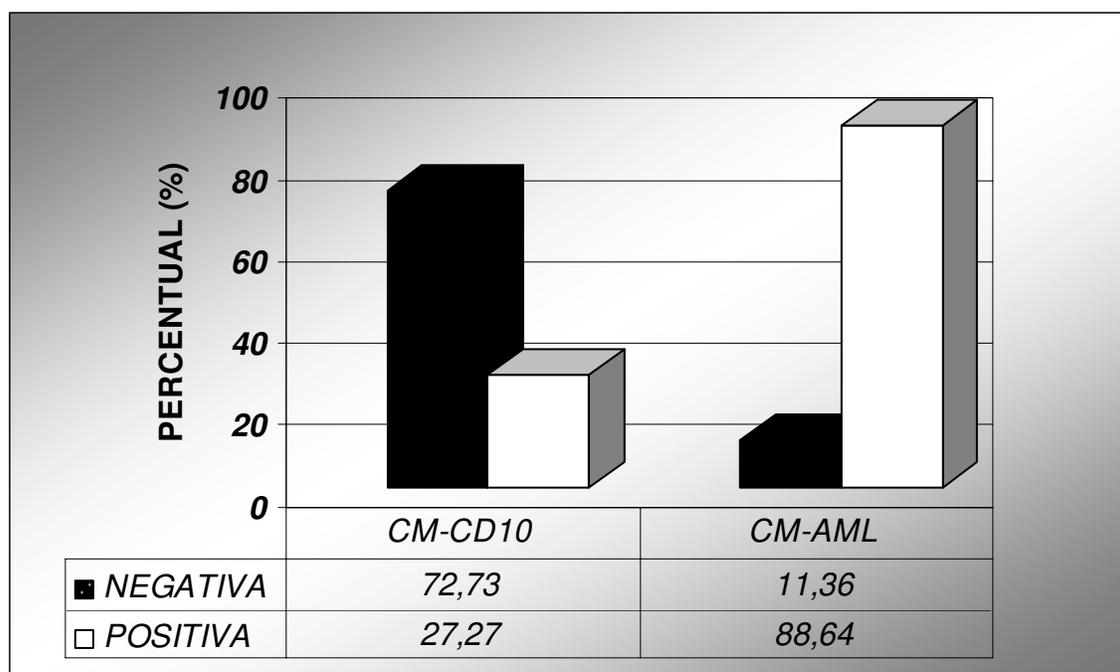
PARÂMETROS CLÍNICOS	EXPRESSION DO CD10		VALOR DE p
	No de casos. (%)		
	NEGATIVA	POSITIVA	
*Tipo			
1	4/10 (40%)	6/10 (60%)	0.370
2	7/10 (70%)	3/10 (30%)	
Gênero			
F	10/14 (71,43%)	4/14 (28,57%)	0.111
M	1/5 (20%)	4/5 (80%)	
**Local			
GSMaior	4/9 (44,44%)	5/9 (55,56%)	0.637
GSMenor	5/8 (62,50%)	3/8 (37,50%)	
Estadio			
T1/T2	5/7 (71,43%)	2/7 (28,57%)	0.315
T4	3/8 (37,50%)	5/8 (62,50%)	
Recidiva Local			
Sim	2/3 (66,67%)	1/3 (33,33%)	1.000
Não	7/12 (58,33%)	5/12 (41,67%)	
Metástases			
Sim	4/6 (66,67%)	2/6 (33,33%)	1.000
Não	5/9 (55,56%)	4/9 (44,44%)	

\*Tipo 1 (CAC tubular/cribriforme); Tipo 2 (CAC sólido); \*\*GS (glândula salivar).

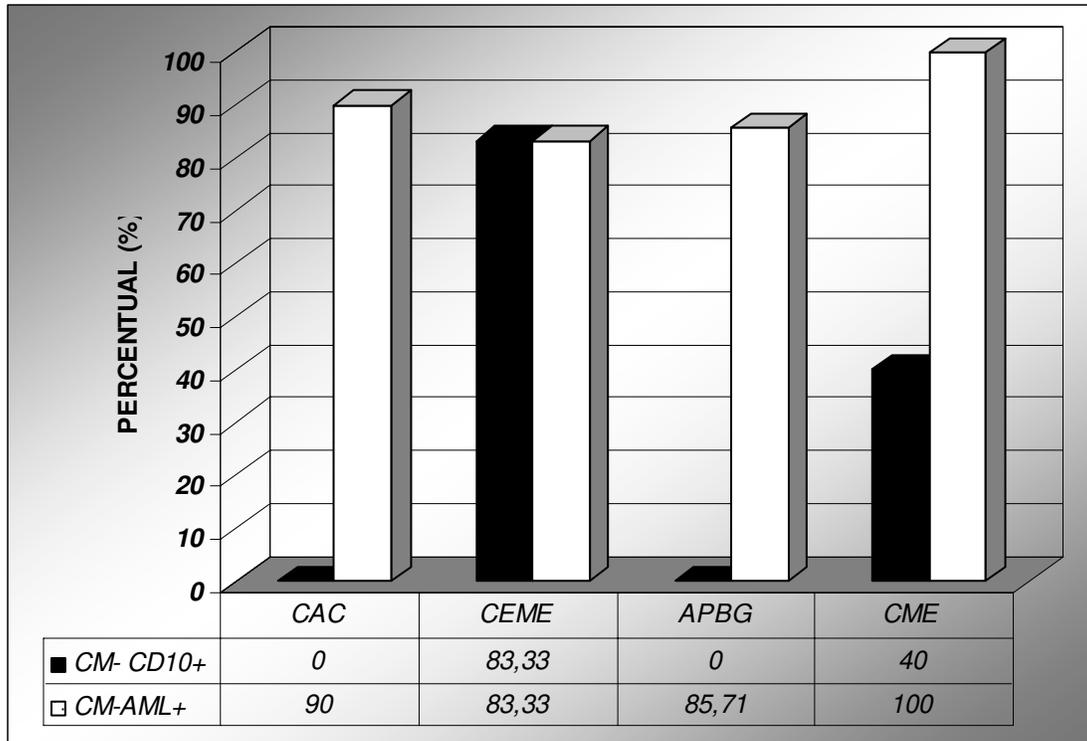
## 5.2.3 – COMPARAÇÃO ENTRE AS EXPRESSÕES DO CD10 E DA $\alpha$ -AML NOS CARCINOMAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL

**5.2.3.1- Nas células mioepiteliais** – houve diferença significativa ( $p < 0.001$ ) entre os dois marcadores, considerando a amostra geral dos carcinomas. A  $\alpha$ -AML foi expressa em 88,64% (39/44) dos casos e o CD10 em

apenas 27,27% (12/44) (Fig 6). Considerando os grupos de carcinomas, as diferenças foram significantes no grupo dos carcinomas adenóides císticos ( $p < 0.001$ ) e dos adenocarcinomas polimórficos de baixo grau ( $p = 0.014$ ) (Fig.7).

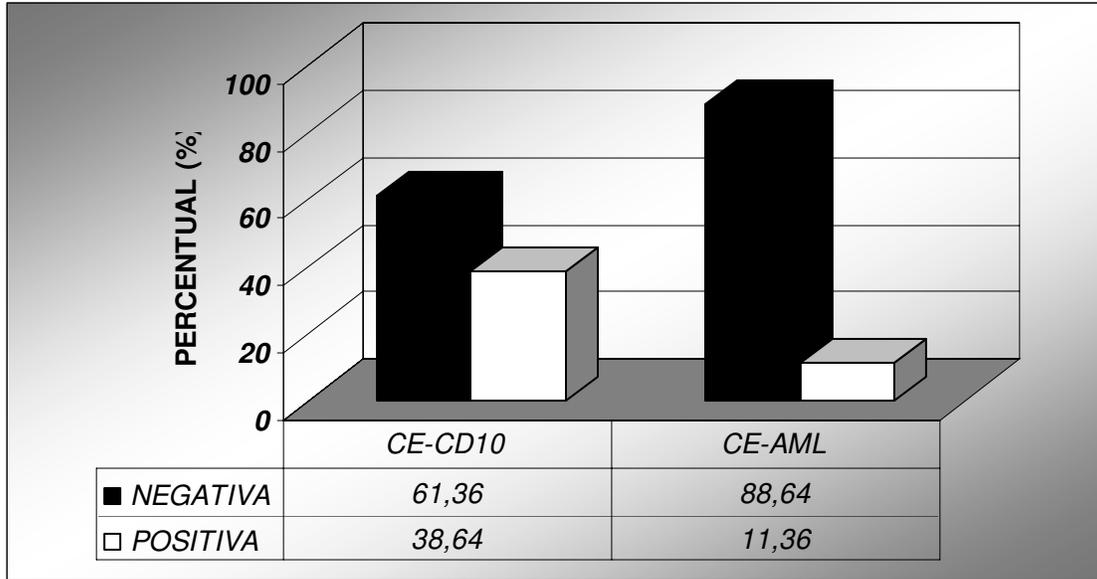


**Figura 6** – Expressão do CD10 e da  $\alpha$ - AML nas células mioepiteliais da amostra geral dos carcinomas ( $p < 0.001$ )

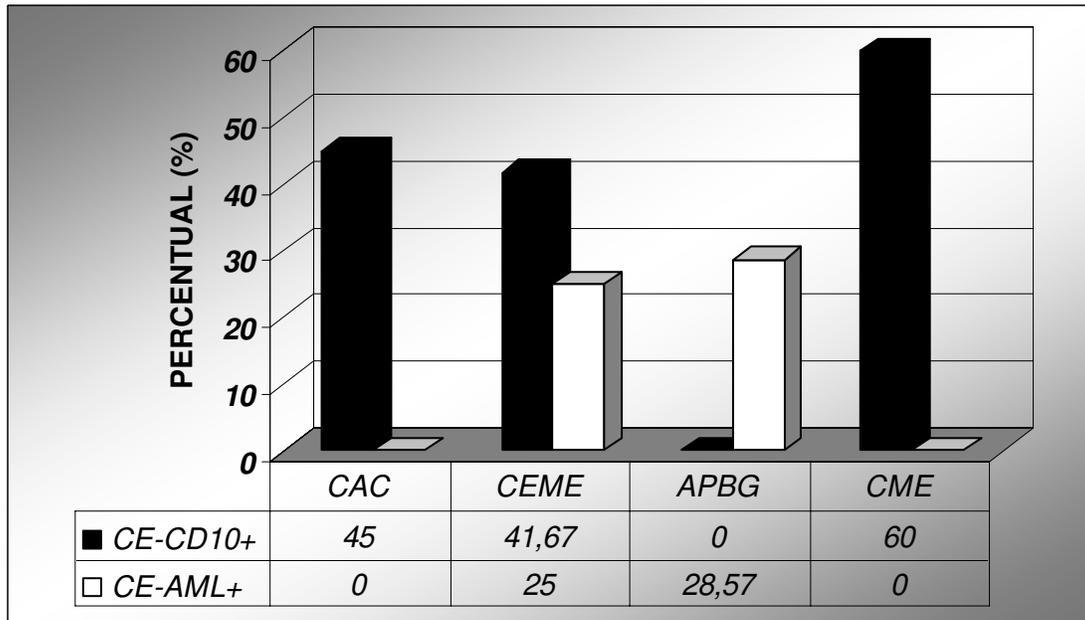


**Figura 7** – Expressões do CD10 versus  $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais entre os grupos de carcinomas. CM (células mioepiteliais), CAC (carcinoma adenóide cístico); CEME (carcinoma epitelial-mioepitelial); APBG (adenocarcinoma polimórfico de baixo grau); CME (carcinoma mioepitelial).

**5.2.3.2- Nas células estromatosas da reação desmoplásica ao tumor** – também houve diferença significativa ( $p=0.007$ ) entre ambos, considerando a amostra geral. O CD10 foi expresso em 38,64% (17/44) dos casos e a  $\alpha$ -AML em apenas 11,36% (5/44) (Fig.8). Considerando os grupos de carcinomas, a diferença entre ambos marcadores foi significativa ( $p<0.003$ ) apenas no carcinoma adenóide cístico (Fig.9). Observamos que as áreas que expressaram positividade para o CD10 não coincidiram com aquelas que expressaram a  $\alpha$ - actina de músculo liso.

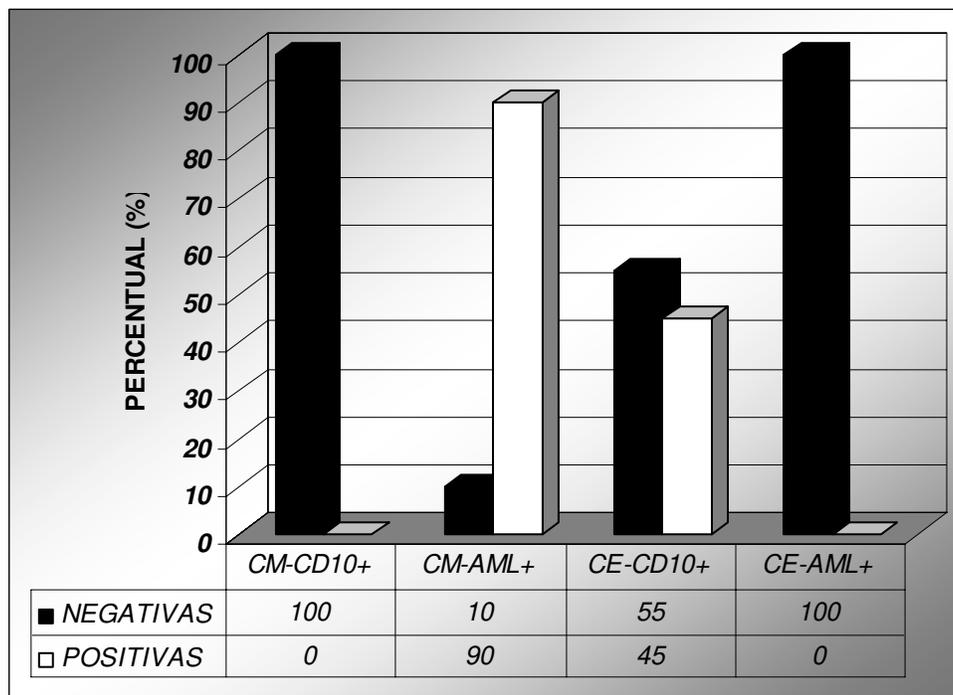


**Figura 8** – Expressão do CD10 e da  $\alpha$ - AML nas células estromatosas da amostra geral dos carcinomas ( $p=0.007$ )

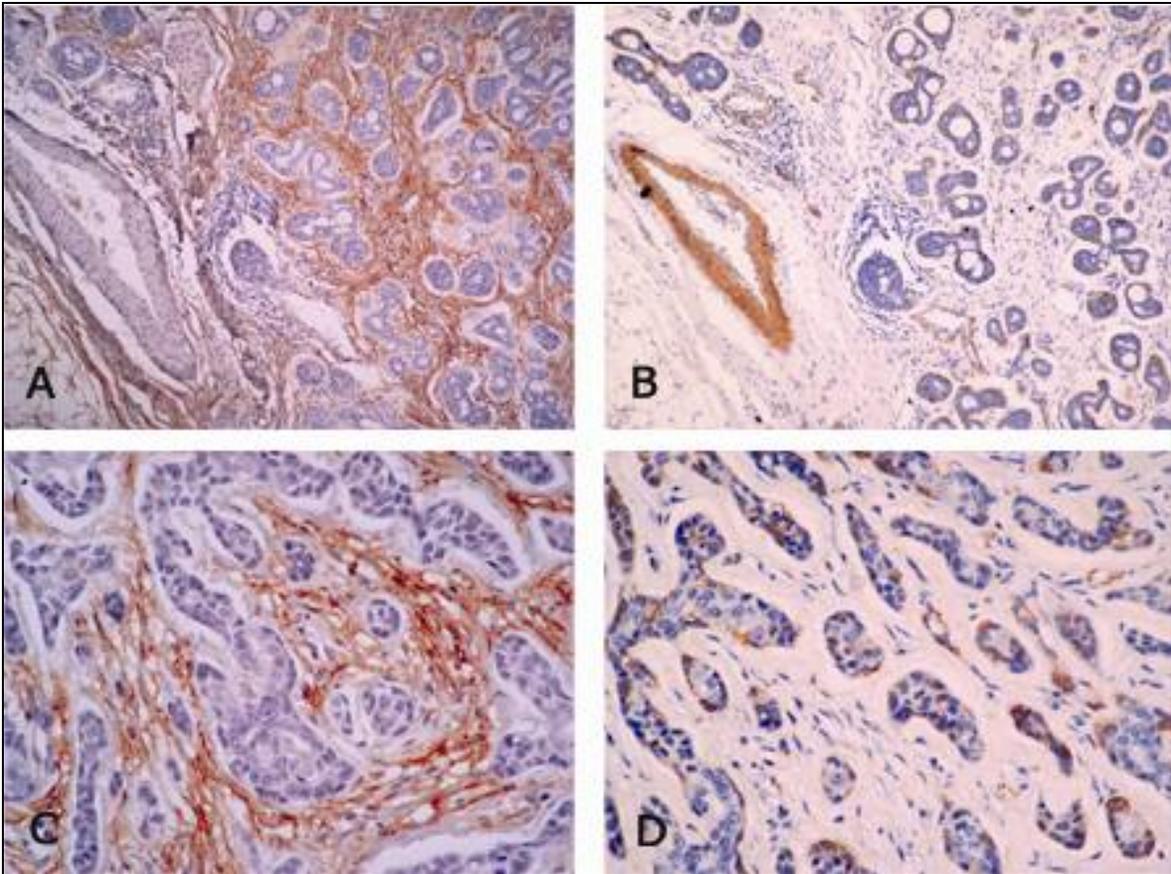


**Figura 9** – Expressões do CD10 versus  $\alpha$ -AML nas células estromatosas entre os grupos de carcinomas. CE- (células estromatosas); CAC (carcinoma adenóide Cístico); CEME (carcinoma epitelial-mioepitelial); APBG (adenocarcinoma polimórfico de baixo grau); CME (carcinoma mioepitelial).

**5.2.3.3 Nos Carcinomas Adenóides Císticos (CAC)** – houve diferença estatisticamente significativa entre estes dois marcadores, tanto nas células mioepiteliais ( $p < 0.001$ ), quanto nas células estromatosas ( $p = 0.003$ ). As células mioepiteliais foram 100% negativas para CD10 e em 90% (18/20) dos casos expressaram  $\alpha$ -AML sendo que, com este marcador, a positividade foi de forte intensidade em 40% das neoplasias (Fig.10). Nas células estromatosas, o CD10 foi expresso em 45% (9/20) e o  $\alpha$ -AML foi negativo em 100% dos casos (reforçando que o CD10 e o  $\alpha$ -AML marcam células estromatosas distintas) (Fig. 11).



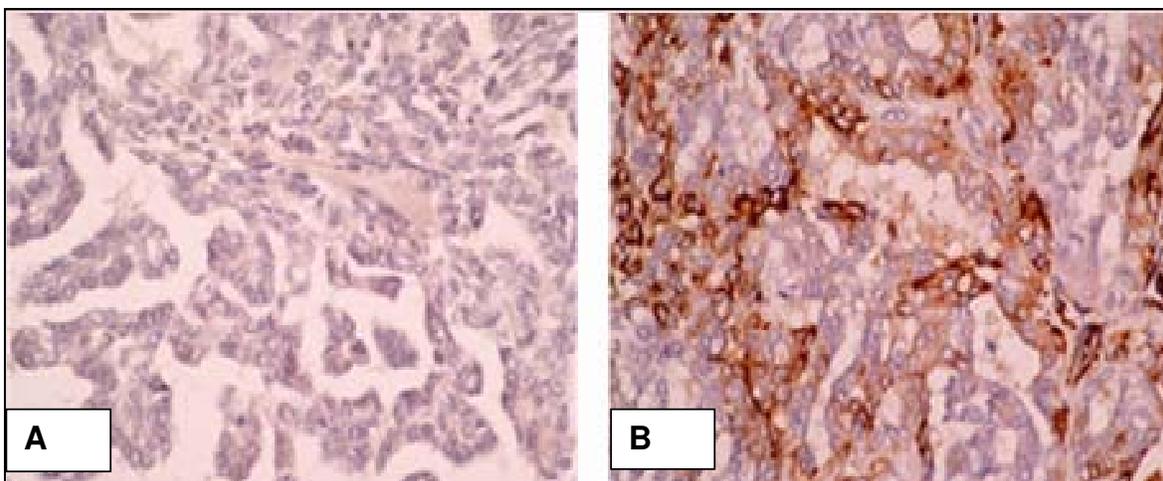
**Figura 10** – Expressões do CD10 e da  $\alpha$ - AML nas células mioepiteliais (CM) e estromatosas (CE) dos carcinomas adenóides císticos.



**Figura 11** – Carcinoma adenóide cístico - (A e C): CD10 – marcada expressão nas células do estroma tumoral; (B e D):  $\alpha$ - AML – negatividade nas células do estroma tumoral e positividade nas células mioepiteliais malignas (40x).

**5.2.3.4 - Nos Carcinomas Epiteliais-Mioepiteliais (CEME)** – não houve diferença significativa entre ambos marcadores, tanto nas células mioepiteliais ( $p=1.000$ ), quanto nas estromatosas ( $p=0.414$ ).

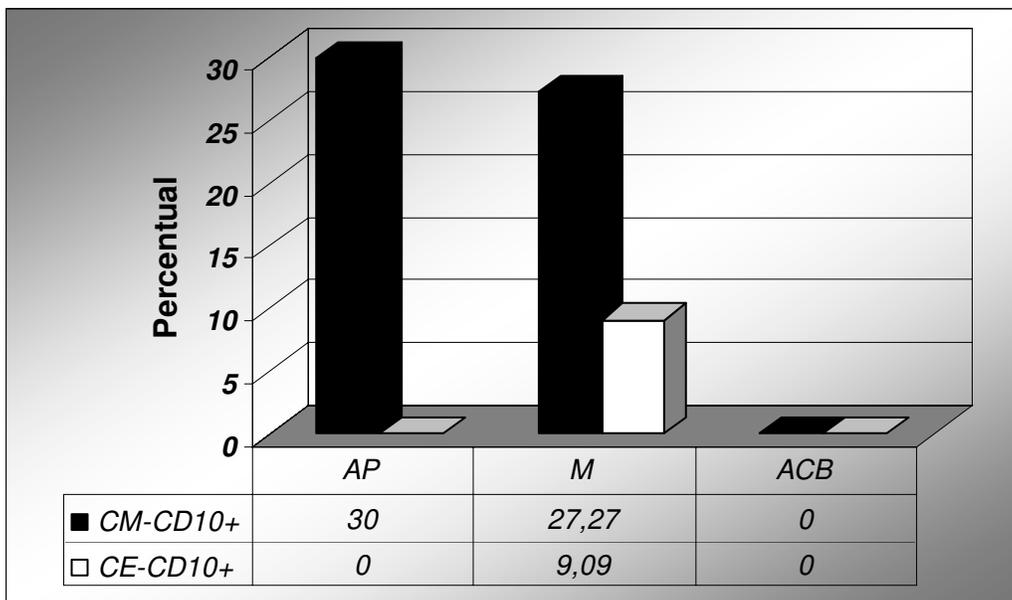
**5.2.3.5 - Nos Adenocarcinomas Polimórficos de Baixo Grau (APBG)** - CD10 foi negativo em 100% das células mioepiteliais e estromatosas. Entretanto, a  $\alpha$ -AML foi expressa em 85,72% (6/7) dos casos nas células carcinomatosas e em 28,57% (2/7) nas células estromatosas (Fig.12).



**Figura 12** – Adenocarcinoma polimórfico de baixo grau. (A) – CD10: ausência de expressão nas células estromatosas e mioepiteliais. (B)-  $\alpha$ - AML – expressão nas células mioepiteliais neoplásicas, padrão de membrana e citoplasmático (100x).

#### 5.2.4 NAS NEOPLASIAS BENIGNAS COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL

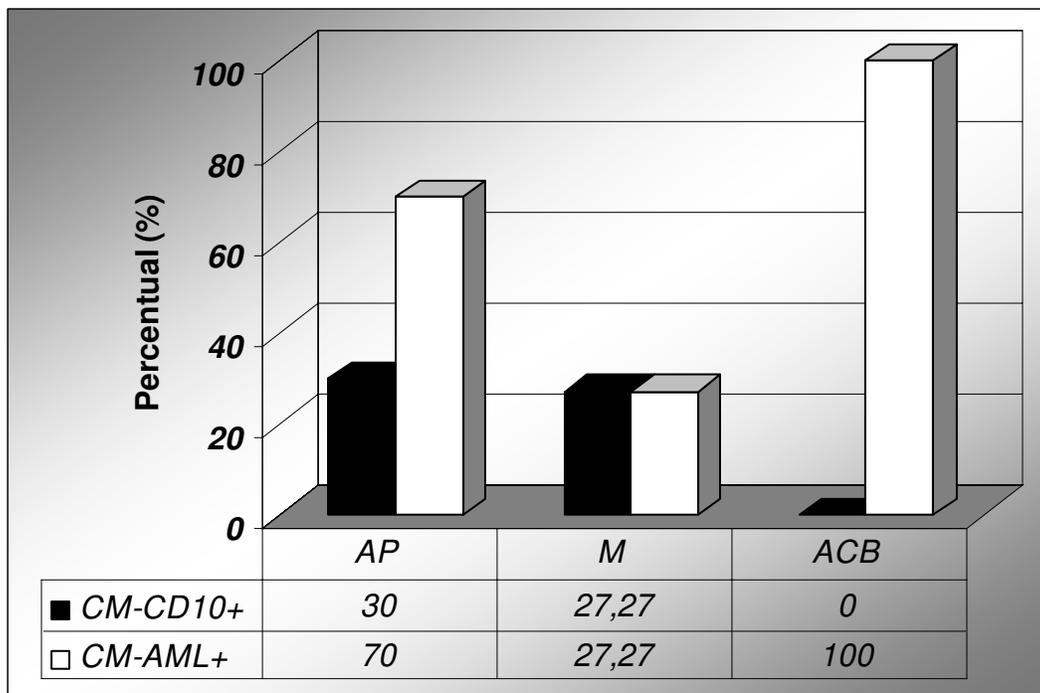
Na amostra geral, a maioria destes tumores não expressou CD10, nem nas células mioepiteliais (74,29% dos casos), nem nas estromatosas (97,14% dos casos). Entre os grupos de neoplasias, não houve diferença significativa ( $p=0.734$ ) na sua expressão que foi discreta, sendo maior no Adenoma Pleomórfico (30% dos casos) e totalmente negativa no Adenoma de Células Basais (Fig.13).



**Figura 13** – Expressão do CD10 nas células mioepiteliais (CM) e estromatosas (CE) das neoplasias benignas.

## 5.2.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS EXPRESSÕES DO CD10 E DA $\alpha$ - AML NAS NEOPLASIAS BENIGNAS COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL

**5.2.5.1 Nas células mioepiteliais** – considerando a amostra total, houve diferença significativa ( $p=0.005$ ) entre esses dois marcadores, sendo a  $\alpha$ - AML expressa em 60% (21/35) dos casos e o CD10 em 25.71% (9/35). Entre os grupos de neoplasias, o Adenoma Pleomórfico (neoplasia mais freqüente nesse estudo) apresentou diferença significativa ( $p=0.011$ ), entre esses dois marcadores nas células mioepiteliais (Fig 14).



**Figura 14** – Expressões do CD10 e da  $\alpha$ - AML nas células mioepiteliais das neoplasias benignas

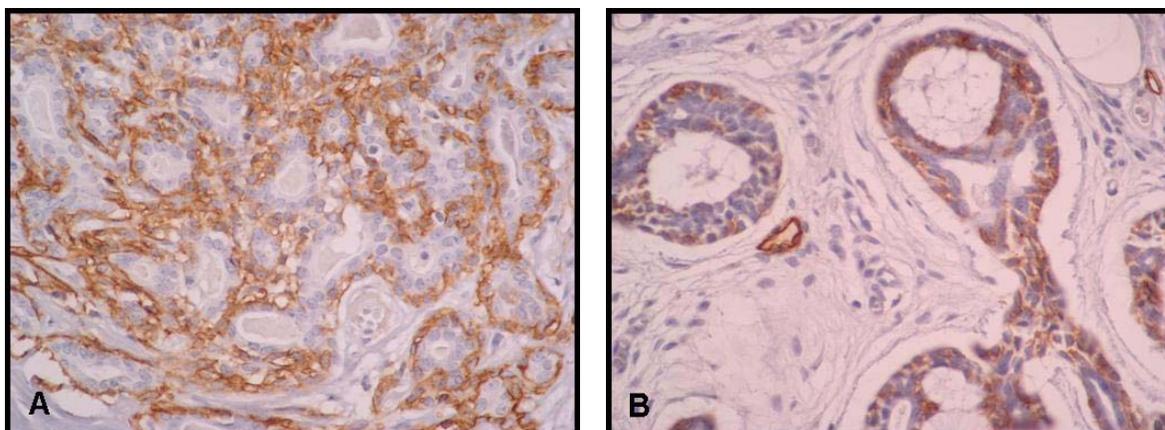
**5.2.5.2 Nas células estromatosas** – esses dois marcadores apresentaram expressões mínimas, sem significância estatística, tanto na amostra geral ( $p=0.607$ ) como entre os grupos mais frequentes, Adenomas Pleomórficos e Mioepiteliomas ( $p=0.368$ ).

### 5.3 IMUNOEXPRESSÃO DA PODOPLANINA (D2-40)

Expressão de D2-40 foi observada apenas nas células com morfologia mioepitelial. Nas células epiteliais e estromatosas associadas ao carcinoma, a expressão foi negativa em todos os casos.

### 5.3.1 NOS CARCINOMAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL

As maiores expressões foram verificadas nas células mioepiteliais dos carcinomas adenóides císticos (80% dos casos) que apresentaram forte positividade (em mais de 50% das células mioepiteliais) em 30% dos casos. Nos Carcinomas Mioepiteliais e Epiteliais-Mioepiteliais, a positividade foi cerca de 60% para ambos (Fig 15). O Adenocarcinoma Polimórfico de Baixo Grau (APBG) foi o único que não expressou esse marcador e, portanto, a diferença em relação aos demais foi significativa ( $p= 0,002$ ). Não houve expressão nas células estromatosas em nenhum dos grupos de carcinomas. (Tab.3).



**Figura 15** – Expressão do D2-40 nas células mioepiteliais do carcinoma epitelial-mioepitelial (A) do carcinoma adenóide cístico (B) (100x).

**TABELA 3** - Expressão do D2-40 nas células mioepiteliais entre os grupos de carcinomas com diferenciação mioepitelial

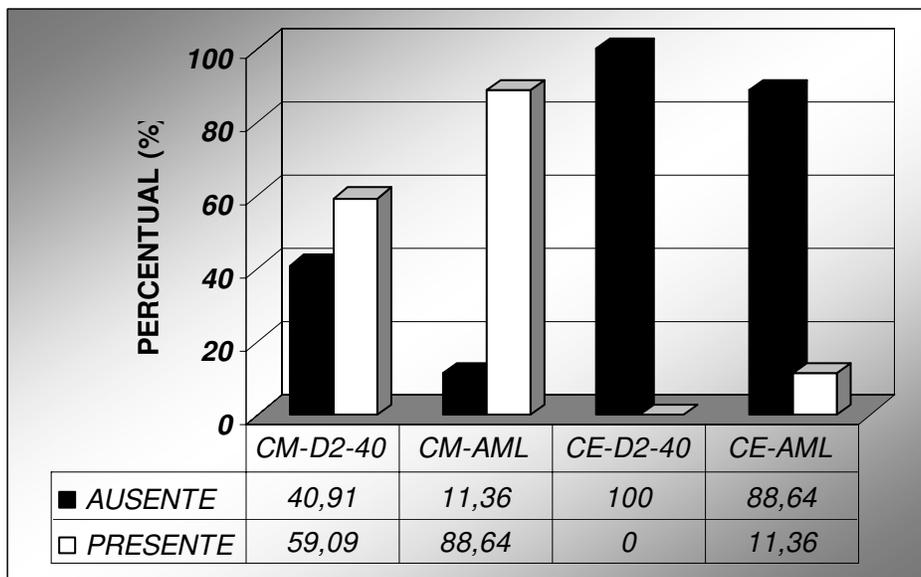
EXPRESSÃO DO D2-40	CAC No. (%)	CEME No. (%)	CME No. (%)	APBG (No.%)
0	4/20 (20%)	5/12 (41.67%)	2/5 (40%)	7/7 (100%)
≥10-25%	3/20 (15%)	2/12 (16.67%)	2/5 (40%)	0 (0%)
26-50%	7/20 (35%)	2/12 (16.67%)	1/5 (20%)	0 (0%)
>50%	6/20 (30%)	3/12 (25%)	0 (0%)	0 (0%)

Teste exato de Fisher(  $p=0.047$ )

### 5.3.2 – COMPARAÇÃO ENTRE AS EXPRESSÕES DO D2-40 E DA $\alpha$ - AML NOS CARCINOMAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL

**5.3.2.1 - Nas células mioepiteliais** – houve diferenças significativas entre esses dois marcadores ( $p=0.003$ ), na amostra total, devido a ausência de expressão de D2-40 nos APBG e a positividade da  $\alpha$ - AML em 85.71% deles. Considerando os quatro tipos de carcinoma em conjunto, o D2-40 foi expresso em 59,09% (26/44) dos casos e a  $\alpha$ - AML em 88,64% (39/44).

**5.3.2.2 - Nas células estromatosas da reação desmoplásica ao tumor** - na amostra total, também houve diferenças significativas entre esses marcadores ( $p=0.025$ ). O D2-40 foi negativo em 100% dos casos, enquanto que a  $\alpha$ -AML foi positivo em 11,36% (5/44). As expressões do D2-40 nas células mioepiteliais e estromatosas, na amostra geral dos carcinomas, comparadas às expressões da  $\alpha$ -AML, estão dispostas no gráfico abaixo (Fig.16)



**Figura 16** – Expressões do D2-40 versus  $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais e estromatosas na amostra geral dos carcinomas

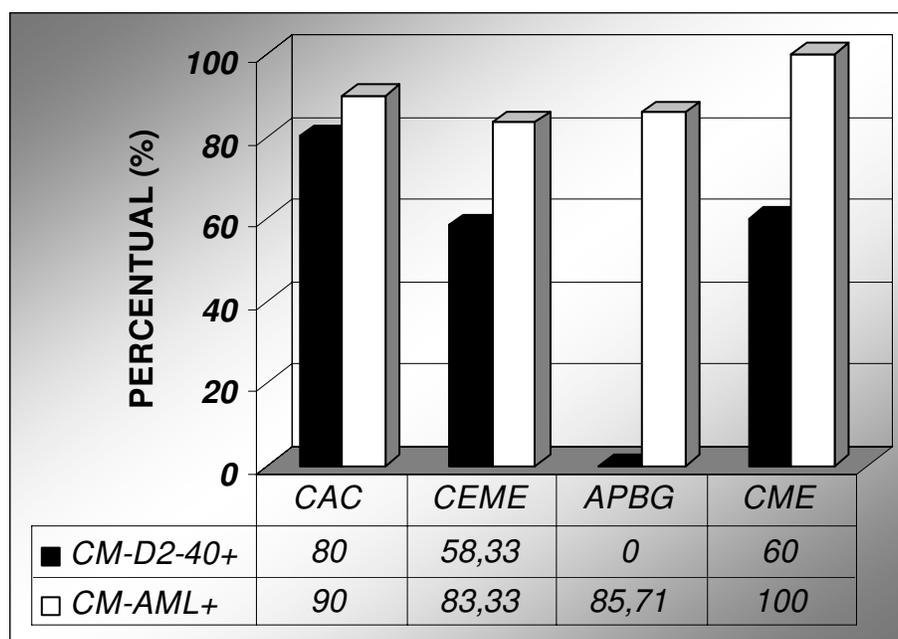
**5.3.2.3 - Nos Carcinomas Adenóides Císticos (CAC)** – não houve diferenças significativas nas expressões desses dois marcadores, tanto nas células mioepiteliais quanto nas estromatosas. Nas células mioepiteliais, o D2-40 foi expresso em 80% (16/20) dos casos e a  $\alpha$ - AML em 90% (18/20). Nas células estromatosas da infiltração carcinomatosa, ambos marcadores foram negativos. Não foi encontrada correlação entre expressão do D2-40 nas células mioepiteliais e fatores prognósticos do CAC (tipo histológico, gênero, local, tamanho do tumor, recidiva local e metástases). Nos três casos com transformação para alto grau, apenas as células mioepiteliais residuais expressaram D2-40.

**5.3.2.4 - No Carcinoma Mioepitelial (CME)**- o D2-40 foi positivo em 60% (3/5) dos casos e a  $\alpha$ - AML em 100% deles. As células do estroma tumoral foram negativas para ambos os marcadores.

**5.3.2.5 - No Carcinoma Epitelial-Mioepitelial (CEME)** – não houve diferença significativa entre esses marcadores, embora a expressão do D2-40 nas células mioepiteliais tenha sido menor (58,33% dos casos) do que a da  $\alpha$ - AML (83,33% dos casos). Nas células estromatosas, não houve expressão do D2-40 e o  $\alpha$ - AML foi expresso em apenas 25% (3/12) dos casos.

As expressões do D2-40 e da  $\alpha$ - AML nas células mioepiteliais entre os grupos de carcinomas estão dispostas no gráfico abaixo (Fig. 17).

**5.3.2.6 – No Adenocarcinoma Polimórfico de Baixo Grau (APBG)** – este foi o único tipo de carcinoma que não expressou o D2-40, nem nas células mioepiteliais , nem nas estromatosas.



**Figura 17** – Expressões do D2-40 e da  $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais entre os grupos de carcinomas.

### **5.3.3 - NAS NEOPLASIAS BENIGNAS COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL**

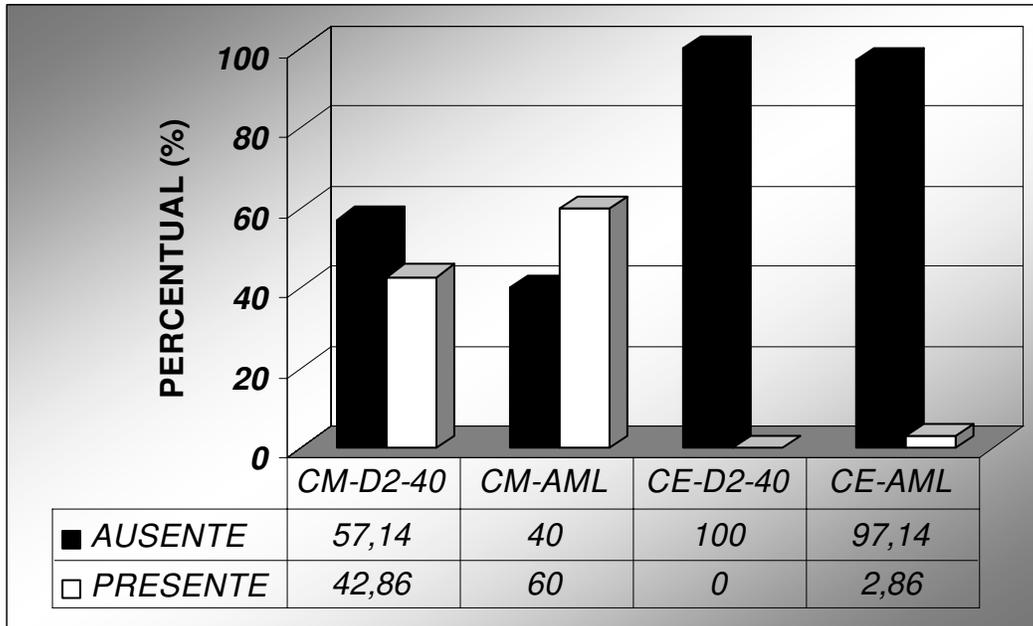
**5.3.3.1- Nas células mioepiteliais** – não houve diferença significativa entre os três grupos de neoplasias. O Adenoma de Células Basais foi o grupo com a maior expressão (50% dos casos).

**5.3.3.2 - No estroma tumoral** – não houve expressão em nenhum dos três grupos de neoplasias.

### **5.3.4 - COMPARAÇÃO ENTRE AS EXPRESSÕES DO D2-40 E DA $\alpha$ -AML NAS NEOPLASIAS BENIGNAS COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL**

**5.3.4.1- Nas células mioepiteliais (Fig.18)** – não houve diferença significativa entre esses dois marcadores, na amostra total. Entre os grupos, a diferença foi significativa no grupo dos adenomas de células basais ( $p=0,046$ ).

**5.3.4.2- Nas células estromatosas (Fig.18)** – também não houve diferenças significativas entre ambos, tanto na amostra total, quanto entre os tumores. A expressão do D2-40 foi negativa em todas as neoplasias e a  $\alpha$ - AML foi expressa em apenas 5% dos casos dos Adenomas Pleomórficos (AP).



**Figura 18** – Expressões do D2-40 e da  $\alpha$ -AML nas células mioepiteliais (CM) e estromatosas (CE) da amostra geral das neoplasias salivares benignas

Os dados clínicos e os resultados da imunohistoquímica (CD10, D2-40 e  $\alpha$ -AML), de todos os casos estudados, estão dispostos nas tabelas 4 (neoplasias malignas) e 5 (neoplasias). As legendas utilizadas foram as seguintes:

- Tipo (histológico) 1: Tubular/cribriforme
- Tipo (histológico) 2: Sólido
- Rec. Local (recidiva local): 1- Sim/ 2 - Não
- Metástases: 1- Sim/ 2 - Não
- TU- imunexpressão nas células mioepiteliais tumorais
- E – imunexpressão nas células estromatosas

**TABELA 4 – Dados clínicos e resultados da imunoistoquímica dos carcinomas salivares com diferenciação mioepitelial**

GRUPO TU CAC (20)	BIOPSIA	TIPO	DADOS CLÍNICOS						CD10			D2-40			AML		
			SEXO	IDADE	LOCAL	ESTADIO	REC.LOC.	METAST.	TU	>50%	E	TU	>50%	E	TU	>50%	E
1	13221/94	2	F	48	1	T1	2	1	0	0	0	2	0	0	3	+	0
2	3938/96	1	M	60	2	T4	1	2	0	0	0	3	+	0	2	0	0
3	7687/96	2	F	44	1	T2	2	2	0	0	0	2	0	0	3	+	0
4	6576/98	2	F	55	2	T4	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
5	455/99	1	F	52	1	T4	1	2	0	0	2	1	0	0	3	+	0
6	2742/99	2	M	65	1	T4	0	0	0	0	2	2	0	0	1	0	0
7	210/00	2	F	45	1	T1	2	1	0	0	0	0	0	0	3	+	0
8	5143/00	1	F	29	2	0	1	2	0	0	0	2	0	0	3	+	0
9	1613/03	1	F	49	2	T4	2	1	0	0	2	2	0	0	1	0	0
10	3386/03	1	M	30	1	T1	2	2	0	0	2	2	0	0	0	0	0
11	2156/04	1	M	44	1	T1	2	2	0	0	2	3	+	0	2	0	0
12	6435/04	2	F	63	0	T4	2	1	0	0	0	3	+	0	3	+	0
13	7970/04	2	F	27	1	T4	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0
14	23549/04	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	+	0	1	0	0
15	287/05	1	F	55	2	T1	2	2	0	0	0	2	0	0	2	0	0
16	3894/05	1	F	54	2	0	2	1	0	0	2	3	+	0	1	0	0
17	6404/05	1	F	19	2	0	0	0	0	0	0	3	+	0	3	+	0
18	7885/06	2	F	64	1	T2	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
19	SO4-3054IV	2	F	58	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	+	0
20	20818	1	M	42	2	T4	0	0	0	0	2	1	0	0	2	0	0
CEME ( 12)	BIOPSIA	TIPO	SEXO	IDADE	LOCAL	ESTADIO	REC.LOC.	METAST.	TU	>50%	E	TU	>50%	E	TU	>50%	E
1	13053/94	0	F	0	1	0	0	0	3	+	0	2	0	0	3	+	0
2	2798/98	0	M	70	2	0	0	0	1	0	2	3	+	0	0	0	0
3	10881/00	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	+
4	2101/03	0	M	44	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	+	0
5	4408/04	0	F	72	1	0	0	0	3	+	0	0	0	0	3	+	0
6	6840/05	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	3	+	+
7	485948	0	F	37	1	0	0	0	3	+	2	3	+	0	3	+	0
8	SO1-8014	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	+	0
9	6008541	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	+	0	3	+	0
10	5033/07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	+	0
11	538451	0	0	0	0	0	0	0	3	+	0	0	0	0	3	+	0
12	3252/06	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	2	0	+
CME (5)	BIOPSIA	TIPO	SEXO	IDADE	LOCAL	ESTADIO	REC.LOC.	METAST.	TU	>50%	E	TU	>50%	E	TU	>50%	E
1	SO3-3938	0	F	69	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	+	0
2	2601/04	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0
3	A-04-4722	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0
4	2177/06	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	2	0	0
5	4555/06	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0	3	+	0
APBG (7)	BIOPSIA	TIPO	SEXO	IDADE	LOCAL	ESTADIO	REC.LOC.	METAST.	TU	>50%	E	TU	>50%	E	TU	>50%	E
1	568/94	0	F	25	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	591/94	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
3	12719/95	0	F	50	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
4	4504/96	0	F	50	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
5	7347/98	0	F	48	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
6	4581/99	0	F	56	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
7	22385	0	M	50	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2

**TABELA 5 – Dados clínicos e resultados da imunoistoquímica das neoplasias salivares benignas**

GRUPO DE TU MIOEPITELIOMA(11)	BIOPSIA	TIPO	DADOS CLÍNICOS				CD10			D2-40			AML		
			SEXO	IDADE	LOCAL	REC.LOC.	TU	>50%	E	TU	>50%	E	TU	>50%	E
1	RV 386/00	0	0	0	0	0	3	+	0	3	+	0	0	0	0
2	9872/01	0	F	57	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
3	55059	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	35516	0	F	60	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	62820	0	0	0	1	0	3	+	0	2	0	0	2	0	0
6	1469	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	6203	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	11456	0	M	0	1	0	0	0	+	2	0	0	3	+	0
9	12150	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1429/97	0	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	+	0
11	6192	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ADENOMA DE CÉLS. BASAIS (4)	BIOPSIA	TIPO	SEXO	IDADE	LOCAL	REC.LOC.	TU	>50%	E	TU	>50%	E	TU	>50%	E
1	4105/97	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0
2	3032/05	0	M	65	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
3	1534/96	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
4	9979/06	0	F	41	1	0	0	0	0	2	0	0	3	+	0
ADENOMA PLEOMORF.(20)	BIOPSIA	TIPO	SEXO	IDADE	LOCAL	REC.LOC.	TU	>50%	E	TU	>50%	E	TU	>50%	E
1	5602/94	0	F	40	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0
2	12149/94	0	F	28	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	6642/95	0	F	55	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5902/96	0	M	34	1	0	2	0	0	2	0	0	1	0	0
5	10164/96	0	M	55	0	0	0	0	0	1	0	0	3	+	0
6	5513/97	0	F	33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	12102/97	0	M	47	1	0	0	0	0	0	0	0	3	+	0
8	2811/98	0	M	39	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
9	10635/98	0	M	18	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	2746/99	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
11	5483/99	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
12	11186/99	0	F	38	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
13	11379/99	0	F	67	1	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0
14	4669/00	0	M	53	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0
15	8716/00	0	M	53	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	+
16	1294/01	0	M	34	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
17	6112/02	0	F	78	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
18	11493/02	0	F	79	1	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0
19	180/03	0	F	39	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	705/03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0



## **6. Discussão**

---

O diagnóstico das neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial é sempre uma tarefa desafiadora, mesmo para patologistas experientes. A sobreposição de padrões morfológicos observada entre estas neoplasias favorecem o surgimento de dificuldades no diagnóstico diferencial entre neoplasias malignas e até mesmo entre malignas e benignas (Hubner et al.,1971; Batsakis et al.,1980; 1982, 1999; Speight, 2002). Variações histomorfológicas são freqüentes em áreas distintas de um determinado tipo de carcinoma assim como, também são freqüentes, as semelhanças histológicas entre carcinomas de tipos histológicos e comportamentos clínicos distintos. Quando o material examinado são biópsias incisionais, fragmentadas, principalmente de glândulas salivares menores como as do palato, as dificuldades diagnósticas tornam-se ainda maiores e o risco de erros, uma ameaça concreta (Dardick, 1987; Dardick, 1991).

Vários marcadores imunoistoquímicos têm sido empregados na rotina, alguns com objetivo de esclarecer o diagnóstico e outros como marcadores de prognóstico (Cheuk e Chan, 2007). Nos casos de dificuldades e dúvidas diagnósticas, o patologista poderá recorrer a alguns marcadores que fornecem indícios da histogênese da neoplasia, tais como: a) os marcadores de células luminiais (como as citoqueratinas, o antígeno carcino-embrionário ou antígeno epitelial de membrana), b) os marcadores de células abluminiais - mioepiteliais / basais - (CK14, 34βE12, actina músculo liso, actina músculo específica, calponina, p63) e outros que marcam a proliferação celular ou produtos de oncogens tais como: o Ki-67 (Luukkaa et al., 2005) o p53 (Papadaki et al., 1996, Luukkaa et al., 2005) e o CD43 (Seethala at al, 2004, Woo et al., 2006). Embora tenha havido

significativos avanços na genética molecular, a imunistoquímica continua crescendo, auxiliando no diagnóstico mais preciso das neoplasias. Novos anticorpos são rapidamente lançados no mercado e novas aplicações para velhos anticorpos são testadas, de modo que a investigação nesse campo da patologia continua a avançar e a alterar conceitos previamente estabelecidos.

Dois anticorpos descobertos em períodos distintos, O CD10 (CALLA/NEP) (Ritz et al., 1980) e o D2-40 (Podoplanina) (Marks et al.,1990), apresentam algumas semelhanças quando utilizados no tecido salivar. Ambos são expressos nas células mioepiteliais e, segundo estudos recentes, também estão envolvidos na progressão tumoral, podendo ser utilizados, em alguns carcinomas, como marcadores prognósticos (Dall'Era et al., 2007; Wicki e Christofori, 2007)

Esse estudo foi o primeiro a avaliar a expressão desses dois marcadores nas neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial, tendo como principais objetivos verificar suas expressões nas células mioepiteliais neoplásicas, na reação desmoplásica à infiltração carcinomatosa e sua potencial correlação com fatores prognósticos.

## **6.1 EXPRESSÃO DO CD10**

Este marcador tem se mostrado útil e seguro para solucionar vários problemas diagnósticos (McIntosh et al.,1999), tais como, na distinção entre sarcoma do estroma endometrial e tumores de músculo liso (Chu et al., 2000). Além disso, por ter alta especificidade e sensibilidade para as células mioepiteliais

da mama, tem sido considerado um marcador útil para aquelas lesões de difícil diagnóstico (Moritani et al., 2002).

Nas **glândulas salivares normais**, nosso estudo mostrou que o CD10 marca as células mioepiteliais das estruturas acinares em frequência e extensão semelhante a da  $\alpha$ -actina músculo liso, que é considerada um dos marcadores mais úteis na detecção destas células neste órgão (Ogawa, 2003). Entretanto, nas **neoplasias salivares**, mostramos que o CD10 é um marcador de baixa sensibilidade para as células mioepiteliais transformadas, visto que foi negativo na vasta maioria das neoplasias benignas (74,29%) e malignas (72,73%). Em relação às células epiteliais **neoplásicas**, encontramos positividade para CD10 somente em algumas delas (menos de 10%) e em poucos tumores, de tal modo que consideramos a expressão do CD10 negativa neste tipo celular.

Apesar do CD10 ter sido negativo na maioria das neoplasias com diferenciação mioepitelial, quando estas foram separadas conforme o tipo histológico, tornou-se evidente a significativa diferença de expressão nos carcinomas epiteliais-mioepiteliais. Nestes tumores CD10 estava expresso nas células mioepiteliais em 83,3% dos casos. Este marcador foi negativo em 100% dos casos de carcinomas adenóide císticos, adenocarcinomas polimórficos de baixo grau e adenomas de células basais, enquanto que nos adenomas pleomórficos, mioepiteliomas e carcinomas mioepiteliais foi detectado em 30%, 27,7% e 40%, respectivamente.

Estes achados sugerem que o CD10 poderia ser de grande ajuda apenas na identificação do carcinoma epitelial-mioepitelial. Num estudo recente

compreendendo uma série de carcinomas epiteliais-mioepiteliais (Seethala et al., 2007), foram reportados aspectos histológicos até então desconhecidos desta neoplasia, incluindo formas encapsuladas e microinvasivas, aumentando ainda mais o número de lesões salivares e não salivares, das quais este tumor deve ser diferenciado. De um modo geral, devido à composição bicelular (epitelial e mioepitelial) e ao aspecto claro das células mioepiteliais, esta neoplasia deve ser distinguida de outras neoplasias salivares com diferenciação bicelular (tais como a variante tubular do carcinoma adenóide cístico e o adenoma pleomórfico) e de neoplasias constituídas predominantemente por células claras.

Em relação aos tumores salivares bifásicos, os nossos achados sugerem que o CD10 poderia ser um marcador útil para separar carcinomas epiteliais-mioepiteliais da variante tubular do carcinoma adenóide cístico, pois a diferença de expressão deste marcador nestes tumores é significativa (83% versus 0%). Neste sentido, CD10 poderá ser particularmente valioso em biópsias incisionais, onde, não raro, apenas um padrão da neoplasia está presente, tornando a distinção entre o carcinoma epitelial-mioepitelial e a variante tubular do carcinoma adenóide cístico freqüentemente impossível. Entretanto, em relação ao adenoma pleomórfico, nossos achados não indicam que este marcador possa fornecer uma ajuda relevante, visto que quase um terço deles apresenta positividade para CD10, embora numa extensão tumoral freqüentemente menor do que aquela que foi observada nos carcinomas epiteliais-mioepiteliais.

Em relação aos tumores compostos predominantemente por células claras, particularmente quando a neoplasia é metastática e com sítio primário

desconhecido, CD10 é amplamente usado para separar carcinoma de células renais (que é CD10 positivo) de outras neoplasias com células claras, entre elas o carcinoma epitelial-mioepitelial (Avery et al., 2000). Entretanto, os nossos achados, por mostrarem que este carcinoma pode ser freqüentemente CD10 positivo, indicam que a distinção entre carcinoma epitelial-mioepitelial e carcinoma de células renais deve sempre se apoiar em outros marcadores.

Além da utilidade de CD10 como uma ferramenta auxiliar nos diagnósticos diferenciais, é de interesse ressaltar que esta proteína desempenha papel importante na biologia celular. Como é uma peptidase de superfície celular, ela comporta-se como guardiã das células contra pequenos peptídeos, regulando o acesso destes aos seus receptores de superfície celular e, portanto, participando do controle do crescimento e diferenciação nas células normais. Os estudos sobre CD10 em células cancerosas baseiam-se, principalmente, na comparação entre a expressão na célula normal e na sua correspondente neoplásica. Deste modo, tanto a superexpressão como a diminuição ou perda desta proteína têm sido relatadas por diversos autores. A perda de expressão de uma peptidase de superfície celular, como CD10, poderia resultar em acesso aumentado de peptídeos levando a uma série de eventos, que sinalizariam para um aumento do crescimento celular, migração, invasão e promoção de sobrevivência, contribuindo, portanto, para o fenótipo maligno. Por outro lado, a superexpressão de uma peptidase de superfície celular poderia acarretar uma inativação maior de um peptídeo inibitório ou aumento na ativação de um peptídeo estimulante, através da conversão de um pró-peptídeo para a forma biologicamente ativa (Nanus, 2003).

Nos tumores salivares com diferenciação mioepitelial, nossos resultados mostraram que em relação à correspondente normal, a maioria das células neoplásicas mioepiteliais perde a expressão de CD10. Estudos envolvendo uma série de cânceres pulmonares mostraram que a expressão de CD10 freqüentemente não era detectável nas células cancerosas, fato esse oposto àquele notado nas células normais do epitélio respiratório (Sunday et al.,1992). Além disso, Canju e colaboradores (1994) mostraram que em carcinomas pulmonares não-pequenas células, os níveis de expressão do CD10 eram inversamente relacionados àqueles do antígeno de proliferação nuclear (PCNA), levando à hipótese de que o baixo nível de CD10 poderia conferir vantagens proliferativas para as células neoplásicas. Entretanto, nos nossos casos, a expressão de CD10 esteve ausente em proporções semelhantes tanto nas células mioepiteliais neoplásicas benignas como nas malignas, com exceção do carcinoma epitelial-mioepitelial onde se manteve. Estes achados sugerem que o CD10 poderia ter múltiplos papéis, os quais poderiam variar em função do tipo de neoplasia. Futuros estudos, possivelmente abordando técnicas moleculares, são necessários para definir o papel do CD10 nos tumores salivares.

As células cancerosas e o estroma formam um ecossistema, no qual as interações entre os componentes provocam alterações no estroma, que podem contribuir para a invasão neoplásica (Liotta e Kohn, 2001). Vários cânceres humanos, particularmente os adenocarcinomas, induzem uma reação estromal denominada de desmoplasia, que é semelhante ao tecido que se forma no reparo das feridas (Dvorak, 1986).

Este estroma reacional tem sido estudado nos carcinomas de mama e cólon e, nestas neoplasias, é composto por fibroblastos, miofibroblastos, vasos sanguíneos e células imunes (Martin et al., 1996; Noel e Foidart, 1998). É interessante ressaltar que estudos recentes sobre neoplasias originadas nestes sítios (mama e cólon) e em outros como bexiga, cavidade oral e nasofaringe mostraram que as células estromatosas associadas ao tumor expressaram CD10, numa porcentagem de casos que variou de 18% a 52,1% (Bilalovic et al., 2004; Iwaya et al., 2002; Ogawa et al., 2002; Huang et al., 2005; Braham et al., 2006). Nestes carcinomas, como a expressão de CD10 foi detectada quase que exclusivamente dentro da área do crescimento invasivo, foi sugerido que ela seria característica do crescimento destrutivo das neoplasias malignas e um participante importante da interação tumor-estroma (Ogawa, 2003). Além disso, como em carcinomas do trato gastro-intestinal as células positivas para CD10 aparentemente eram positivas para  $\alpha$ -actina músculo liso (Huang et al., 2005), foi levantada a hipótese de que estas poderiam ser miofibroblastos. Estes são considerados o componente celular predominante na reação desmoplásica induzida por vários tipos de tumores, incluindo aqueles que estão associados à expressão de CD10 no estroma.

O nosso estudo é o primeiro a analisar a expressão de CD10 no estroma reacional associado ao carcinoma salivar. Neste sentido, a nossa série de tumores com diferenciação mioepitelial é de particular interesse pois, nas neoplasias com componente mioepitelial foram descritas diferenças significantes no estroma associado ao tumor em comparação com outros carcinomas. Entre

estas estão maior depósito de matriz extracelular e menor neoangiogênese (Sterlicht and Barsky, 1997; Costa et al., 2008). Na nossa série de carcinomas salivares com diferenciação mioepitelial encontramos que 38,64% deles apresentavam expressão de CD10 nas células estromatosas intratumorais e/ou no fronte invasivo (CAC- 45% CD10 positivo no estroma e 100% negativo no tumor versus CEME- 41,67% positivo no estroma e 83,34% no tumor) e que a freqüência desta alteração era semelhante em tumores positivos e negativos para CD10. Entretanto, a distribuição das células estromatosas CD10 positivas não correspondia àquelas que eram positivas para  $\alpha$ -actina músculo liso. Além disso, exceto pelo APBG, a freqüência de carcinomas com células estromatosas CD10 positivas foi maior que a dos tumores contendo células positivas para  $\alpha$  actina músculo liso. Estes resultados indicam que os carcinomas salivares com diferenciação mioepitelial apresentam proliferação de células estromatosas CD10 positivas: a) associada ao crescimento neoplásico invasivo e independente da expressão de CD10 pelas células tumorais, b) semelhante a dos carcinomas de outros sítios em termos de freqüência, 38% em nossos casos versus 18% a 52% nos outros e c) difere de outros carcinomas em relação ao tipo de célula, visto que estas, possivelmente, não são miofibroblastos. Considerados em conjunto, os nossos achados reforçam que a indução de expressão de CD10 nas células estromatosas é fenômeno relacionado ao mecanismo de invasão neoplásica e, além disso, acrescenta que ela possivelmente independe da composição celular do estroma reacional ao tumor (isto é, pode ocorrer em neoplasias com estroma tanto rico como pobre em miofibroblastos) e da expressão de CD10 pelas células neoplásicas.

A expressão estromal de CD10 tem sido relacionada a comportamentos biológicos agressivos em algumas neoplasias, tais como carcinomas de mama, colo-retal, oral e nasofaríngeo (Iwaya et al., 2002; Ogawa et al., 2002; Bilalovic et al., 2004; Huang et al., 2005; Braham et al., 2006; Piattelli et al., 2006), mas não em outras como carcinomas de bexiga (Abdou, 2007). Em tumores com correlação positiva, a expressão de CD10 tem sido associada com aumento da taxa de metástases linfonodais, recidiva local e estágio clínico avançado. Baseado no fato que CD10 é estruturalmente semelhante à metaloproteinase e estromelina, foi proposto que esta enzima poderia criar um micro-ambiente que poderia facilitar a invasão das células neoplásicas e/ou metástases (Iwaya et al., 2002). Com a finalidade de verificar se a expressão de CD10 pelas células estromatosas poderia estar associada a comportamento biológico, examinamos se haveria correlação entre a expressão da proteína e os parâmetros clínicos-patológicos nos carcinomas adenóides císticos. Este tumor foi escolhido por ser: a) uma das neoplasias malignas mais comuns das glândulas salivares e b) o grupo mais numeroso da nossa série permitindo, portanto, análise estatística. Desta análise constatamos que carcinomas adenóides císticos com e sem expressão de CD10 no estroma associado ao tumor não apresentavam diferenças significantes quanto à idade e gênero dos pacientes, localização do tumor (glândula menor versus maior), tamanho (T1/ T2 versus T3), recidiva local, metástases e nem com a transformação para alto grau. Quanto a esse último item, três casos de carcinomas adenóides císticos apresentavam áreas com transformação para alto grau, nas quais o padrão convencional do carcinoma adenóide cístico era substituído por adenocarcinoma pouco diferenciado ou

carcinoma indiferenciado, conforme critérios descritos por Seethala e colaboradores (2007). Nas áreas transformadas, as células mioepiteliais desapareciam gradualmente sendo que, em alguns ninhos carcinomatosos, formavam uma única camada celular comprimida na periferia destes e, em outros, estavam completamente ausentes. Nestas áreas com transformação para adenocarcinoma ou carcinoma indiferenciado, era comum ocorrer desmoplasia do estroma. Em todos os casos, com transformação para alto grau, não observamos modificação da expressão de CD10 nestas áreas, quando comparadas com as convencionais dentro do mesmo tumor. Em todos esses carcinomas com transformação para alto grau, CD10 estava ausente nas células neoplásicas e no estroma do tumor.

Esta falta de correlação entre a expressão estromal do CD10 e parâmetros clínicos morfológicos relacionados ao prognóstico, observada em nossos casos de carcinomas adenóides císticos, sugere que esta alteração, possivelmente, não afeta o comportamento biológico deste tumor. Estes achados são semelhantes àqueles descritos em carcinomas de bexiga (Abdou, 2007) mas, diferem daqueles relatados em carcinomas de mama, colo-retais, orais e nasofaríngeos.

As peptidases de superfície, família a qual o CD10 pertence, possuem atividades biológicas independentes de suas funções enzimáticas e estas dependem de interações com outras proteínas. Estas interações podem governar as funções das peptidases e resultar numa variedade de propriedades. Portanto, poderia se especular que, em tumores onde CD10 foi correlacionado com

comportamento tumoral agressivo, esta proteína poderia ter funções que diferem daquelas onde não existe tal associação, tais como carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares e carcinomas de bexiga.

## **6.2 PODOPLANINA (D2-40)**

D2-40 é um anticorpo específico contra a podoplanina humana, que é uma glicoproteína transmembrana, sialomucina-símile.

Embora as funções da podoplanina ainda não sejam completamente conhecidas, evidências indicam que estas podem ser variadas. A expressão da podoplanina nas células alveolares tipo I (Rishi et al., 1995 e Schacht et al., 2005) e nos podócitos glomerulares do rim indicam que pode ter função protetora nos compartimentos com fluidos. Por outro lado, a forte expressão da proteína em células que apresentam freqüentes alterações na forma, mediadas por filamentos (tais como, miofibroblastos da próstata, células mioepiteliais da mama e das glândulas salivares, fibromiócitos dos testículos e células do peri-neuro), sugerem que poderia ter participação na reorganização do citoesqueleto celular e importante papel na mediação das propriedades contráteis celulares. Além dessas funções, também tem sido proposto um possível papel na progressão tumoral, onde estaria envolvida na mobilidade e migração das células neoplásicas e na invasão celular coletiva, fenótipo freqüentemente observado nos carcinomas humanos (Wick e Christofori, 2007).

Estudo recente do nosso grupo, em carcinomas originados em adenomas pleomórficos (Soares et al., 2007), foi demonstrado que tanto as células mioepiteliais malignas como benignas foram positivas para D2-40 em quantidades variáveis. Em apenas dois casos, D2-40 foi detectado em células epiteliais sendo que, em ambos os tumores, estas células apresentaram fenótipo maligno e, em um dos casos, o carcinoma era do tipo escamoso. Entretanto, em nenhum deles foi encontrada correlação com metástases.

Na presente série de neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial, encontramos positividade para D2-40 apenas nas células mioepiteliais em 59% das malignas e em 42,86% das benignas. Em todos os casos, as células epiteliais foram negativas. Quando as neoplasias foram separadas por grupos histológicos, D2-40 foi expresso em quantidades variáveis nas células mioepiteliais de todos eles, exceto no adenocarcinoma polimórfico de baixo grau, onde foi negativo. Comparando a expressão do D2-40 com a da  $\alpha$ -actina de músculo liso, embora a positividade para o primeiro fosse frequentemente menor, a diferença entre os dois marcadores não foi significativa. A única exceção foi o adenocarcinoma polimórfico de baixo grau, que foi positivo para a  $\alpha$ -actina de músculo liso em 85,71% dos casos.

Nossos resultados sugerem que, em neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial, a podoplanina pode ser usada como marcador para detectar a célula mioepitelial e que, nesta função, tem utilidade semelhante à da  $\alpha$ -actina músculo liso. Provavelmente, nestas células o papel da podoplanina estaria relacionado com a organização do citoesqueleto, à semelhança do que tem sido

proposto para a célula mioepitelial normal da mama e da glândula salivar. Neste sentido, na nossa série, o D2-40, também, apresentou positividade semelhante à da  $\alpha$ -actina músculo liso nas células mioepiteliais das estruturas ductais da glândula normal. Considerados em conjunto, esses achados sugerem que o papel que esta proteína desempenha no citoesqueleto das células mioepiteliais normais não se modifica significativamente com a sua transformação neoplásica, mantendo-se, inclusive, em frequência semelhante tanto nas lesões benignas como nas malignas.

Na literatura, a podoplanina tem sido amplamente usada para ressaltar os vasos linfáticos e facilitar a detecção de êmbolos carcinomatosos nessas estruturas. Entretanto, como salientado por Schacht e colaboradores (2005), em neoplasias de glândulas salivares, quando se pretender usar a podoplanina para esta finalidade, é necessário cuidado na interpretação dos achados, devido a alta frequência de positividade das células mioepiteliais normais e neoplásicas para este marcador. Nestes casos, a dupla coloração usando D2-40 e outro marcador para célula mioepitelial, tal como a citoceratina 14, pode auxiliar na separação das estruturas linfáticas (Soares et al., 2007).

Também está descrito que o D2-40 cora os miofibroblastos (Schacht e cols., 2005) que são células estromatosas ativadas, tipicamente encontradas em locais de remodelamento de tecidos, tais como no reparo de feridas e no estroma reacional associado ao tumor (Sappino et al., 1990). Em carcinomas originados em vários sítios, tais como, mama, cólon, fígado, pulmão, próstata e pâncreas (Kawase et al., 2008), os miofibroblastos são componentes importantes do

estroma reacional. Como observado anteriormente, os carcinomas salivares com diferenciação mioepitelial, estudados na presente série, apresentaram pequena quantidade de células estromatosas positivas para  $\alpha$ -actina músculo liso em apenas alguns casos. Em relação ao D2-40, nenhum caso mostrou positividade nas células estromatosas, confirmando que carcinomas salivares com diferenciação mioepitelial produzem pouca ou nenhuma desmoplasia.

## **7. Conclusões**

---

## 7.1 EXPRESSÃO DO CD10 EM NEOPLASIAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL

- Em contraste com a actina de músculo liso, a maioria das neoplasias salivares com diferenciação mioepitelial não expressa CD10 nas células mioepiteliais, indicando que este marcador é de pouca utilidade para identificá-las, exceto no carcinoma epitelial-mioepitelial.
- No carcinoma epitelial-mioepitelial CD10 estava expresso em 83% dos casos, enquanto que no carcinoma adenóide cístico foi ausente em 100% dos tumores, indicando que CD10 seria de grande utilidade na distinção entre as duas neoplasias.
- Além das células mioepiteliais, CD10 só foi expresso significativamente nas células do estroma reacional associado aos carcinomas (38% dos casos), estando presente nos diversos tipos histológicos estudados, exceto no adenocarcinoma polimórfico de baixo grau. Estes achados indicam que a expressão estromal do CD10 está associada ao crescimento neoplásico invasivo, independe da expressão de CD10 pelas células tumorais e é semelhante a dos carcinomas de outros sítios em termos de freqüência.

- Nos carcinomas salivares com diferenciação mioepitelial, o estroma reacional associado ao tumor apresenta significativamente mais células CD10 positivas do que aquelas positivas para actina músculo liso, indicando que as células CD10 positivas possivelmente não são miofibroblastos.
- Nos carcinomas adenóides císticos, a expressão de CD10 nas células estromatosas associadas ao tumor não apresenta qualquer correlação com fatores associados a prognóstico, tais como, estadiamento, tipo histológico (sólido/tubular-cribriforme), recidiva, metástase e transformação para alto grau, sugerindo que ela não altera a agressividade biológica da neoplasia.

## **7.2 EXPRESSÃO DO D2-40 EM NEOPLASIAS SALIVARES COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL**

- D2-40 apresenta utilidade semelhante à da actina músculo liso para identificar as células mioepiteliais em neoplasias benignas e malignas, exceto em relação ao adenocarcinoma polimórfico de baixo grau, onde está ausente.
- D2-40 é mais eficaz que o CD10 na identificação das células mioepiteliais neoplásicas malignas e benignas.

- Entre os diversos tipos de neoplasia, D2-40 não apresenta diferenças significantes de expressão, não tendo, portanto, utilidade para distinguí-las entre si.
- D2-40 não foi expresso em nenhum outro tipo de célula, além das mioepiteliais e endoteliais linfáticas. A sua ausência no estroma associado ao tumor reforça que a reação estromal nos carcinomas com diferenciação mioepitelial é pobre em miofibroblastos.



## **8. Referências Bibliográficas**

---

Abdou AG. CD10 expression in tumor and stromal cells of bladder carcinoma: an association with bilharziasis. *APMIS* 2007; 115:1206 -18.

Aguayo SM, Kane MA, King TE, Schwarz MI, Graner L, Miller YE. Increased levels of bombesin-like peptides in the lower respiratory tract of asymptomatic cigarette smokers. *J Clin Invest* 1989; 84:1105-13.

Anderson C, Krutchkoff D, Pedersen C, Cartun R, Berman M. Polymorphous low grade adenocarcinoma of minor salivary gland: A clinicopathologic and comparative immunohistochemical study. *Mod Pathol* 1990; 3:76-82.

Arber DA, Weiss LM. CD10: a review. *App Immunohistochem* 1997; 5:125-40.

Atsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373:36-41.

Avery AK, Beckstead J, Renshaw AA, Corless CL. Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:203 -10.

Bailey D, Baumal R, Law J, Sheldon K, Kannampuzha P, Stratis M, Kahn H, Marks A. Production of a monoclonal antibody specific for seminomas and dysgerminomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5291-95.

Bailey D, Marks A, Stratis M, Baumal R. Immunohistochemical staining of germ cell tumours and intratubular malignant germ cells of the testis using antibody to

placental alkaline phosphate and monoclonal anti-seminoma antibody. *Mod Pathol* 1991; 4:167-71.

Barcus ME, Karageorge LS, Veloso YL, Kornstein MJ. CD10 expression in follicular lymphoma versus reactive follicular hyperplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8:263-66.

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

Basset P, Wolf C, Rouyer N, Bellocq JP, Rio MC, Chambon P. Stromelysin-3 in stromal tissue as a control factor in breast cancer behavior. *Cancer* 1994; 74:1045 - 49.

Batsakis JG, El-Naggar AK. Myoepithelium in salivary and mammary neoplasms in hostfriendly. *Adv Anat Pathol* 1999; 6:218-26.

Batsakis JG, Kraemer B, Sciubba JJ. The pathology of head and neck tumors: the myoepithelial cell and its participation in salivary gland neoplasia, part 17- *Head Neck Surg* 1983; 5: 222-33.

Batsakis JG, Regezi JA, Luna MA, El-Naggar A. Histogenesis of salivary gland neoplasms: a postulate with prognostic implications. *J Laryngol Otol* 1989; 103: 939-44.

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

Beltran D, Faquin WC, Gallagber G, August M. Selective Immunohistochemical Comparison of Polymorphous Low-Grade Adenocarcinoma and Adenoid Cystic Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:415-23.

Bilalovic N, Blystad AK, Golouh R, Nesland JM, Selak I, Trinh D et al. Expression of bcl-6 and CD10 protein is associated with longer overall survival and time to treatment failure in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:34-42.

Bilalovic N, Sandstad B, Golouh R, Nesland JM, Selak I, Torlakovic EE. CD10 protein expression in tumor and stromal cells of malignant melanoma is associated with tumor progression. *Mod Pathol* 2004; 17:125-8.

Borscheri N, Roessner A, Röcken C. Canalicular immunostaining of neprilysin (CD10) as a diagnostic marker for hepatocellular carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:1297-1303.

Braham H, Trimeche M, Ziadi S, Mestiri S, Mokni M, Amara K et al. CD10 expression by fusiform stromal cells in nasopharyngeal carcinoma correlates with tumor progression. *Virchow Arch* 2006; 449:220-24.

Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R et al. Podoplanin, novel 43-Kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997; 151:1141 - 52.

Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Horvat R, Amann G, Kowalski H, Kerjaschki D. Podoplanin – a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1999; 83:270-75.

Canju RK, Sunday M, Tsarwhas DG, Card A, Shipp MA. CD10/NEP in non-small cell lung carcinomas. Relationship to cellular proliferation. *J Clin Invest* 1994; 94:1784-91.

Chaudhry AP, Leifer C, Cutler LS, Satchidanand S, Labay GR, Yamane GM. Histogenesis of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. Light and electronmicroscopic study. *Cancer* 1986; 58:72-82.

Cheuk W, Chan JKC. Advances in salivary gland pathology. Review. *Histopathology* 2007; 51:1-2

Chisholm DM, Waterhouse JP, Kraucunas E, Sciubba JJ. A quantitative ultrastructural study of the pleomorphic adenoma (mixed tumor) of human minor salivary glands. *Cancer* 1974; 34:1631 - 41.

Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005; 18:143 - 52.

Chu P, Arber DA. Paraffin-Section Detection of CD10 in 505 Nonhematopoietic Neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma. *Am J Clin Pathol* 2000; 13:374 - 82.

Cohen AJ, Bunn PA, Franklin W, Magill-Solc C, Hartmann C, Helfuch B et al. Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer Res* 1996; 56:831-39.

Connelly JC, Skidgel RA, Schulz WW, Johnson AR, Erdos EG. Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:8737-41.

Corio RL, Sciubba JJ, Brannon RB, Batsakis JG. Epithelial-myoepithelial carcinoma of intercalated duct origin: A clinicopathologic and ultrastructural assessment of sixteen cases. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol* 1982; 53:280-87.

Costa AF, Demasi AP, Bonfitto JF, Furuse C, Araújo VC, Metze K et al. Angiogenesis in salivary carcinomas with and without myoepithelial differentiation. *Virchow Arch* 2008 ; 453:359-67

Crissman JD, Kessis T, Shah KV, Fu YS, Stoler MH, Zarbo RJ et al. Squamous papillary neoplasia of the adult upper aerodigestive tract. *Hum Pathol* 1988; 19:1387- 96.

Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell cancer. *Nature* 1985; 316:823-26.

Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; 162:1951- 60.

Daley TD, Wysocki GP, Smout MS, Slinger RP. Epithelial-myoeplithelial carcinoma of salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 57:512-19.

Dall'Era MA, True LD, Siegel AF, Porter MP, Sherertz TM, Liu AY. Differential expression of CD10 in prostate cancer and its clinical implication. *BMC Urology* 2007;7:3

Dardick I, Burford-Mason AP. Current status of histogenetic and morphogenetic concepts of salivary gland tumorigenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 1993; 4:639-77.

Dardick I, Daley TD, van Nostrand AWP. Basal cell adenoma with myoeplithelial-derived "stroma": A new major salivary gland tumor entity. *Head Neck Surg* 1986; 8: 257-67.

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

Dardick I, Ostrynski V, Eken JK, Leung R, Burford-Mason AP. Immunohistochemical and ultrastructural correlates of muscle-actin expression in pleomorphic adenomas and myoeplitheliomas based on comparison of

formalin and methanol fixation. *Virchow Archiv A Pathol Anat Histopathol* 1992; 421:95-104.

Dardick I, Thomas MJ, van Nostrand AWP. Myoepithelioma-new concepts of histology and classification: A light and electronic microscopic study. *Ultrastruct Pathol* 1989; 13:187-224.

Dardick I, van Nostrand AW. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: A case report with ultrastructural findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 66:459-65.

Dardick I, van Nostrand AWP, Jeans MTD, Rippstein P, Edwards V. Pleomorphic adenoma, I : ultrastructural organization of "epithelial" regions. *Hum Pathol* 1983a; 14:780-97.

Dardick I, van Nostrand AWP. Morphogenesis of salivary gland tumors: A prerequisite to improving classification. *Pathol Annu* 1987; 22:1-53.

Dardick I, van Nostrand AWP. Myoepithelial cells in salivary gland tumors – revisited. *Head Neck Surg* 1985; 7:395-408.

Dardick I: Histogenesis and morphogenesis of salivary gland neoplasms. In Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, eds., *Surgical Pathology of the Salivary Glands*. Philadelphia W.B. Saunders Co., 1991; 108 -28.

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

Dipalma S, Guzzo M. Malignant myoepithelioma of salivary glands: clinicopathological features of ten cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 423: 389- 96.

Dobbs LG, Williams MC, Gonzalea R. Monoclonal antibodies specific to apical surfaces of rat alveolar type I cells bind to surfaces of cultures, but not freshly isolated, type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 970:146-56.

Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and bcl-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2000;24:846-52.

Dusser DJ, Djokic TD, Borson DB, Nadel JA. Cigarette smoke induces bronchoconstrictor hyperresponsiveness to substance P and inactivates airway neutral endopeptidase in the guinea pig. Possible role of free radicals. *J Clin Invest* 1989; 84:900-906.

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal: Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N England J Med* 1986; 315:1650-9.

Eby LS, Johnson DS, Baker HW. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1972; 29:1160-68.

Ellis G, Auclair PL, Gnepp DR. *Surgical Pathology of The Salivary Glands*. Philadelphia: WB Saunders, 1991.p.108-158. V.25 in the Series Major Problems In Pathology

Ellis G, Auclair PL. Atlas of Tumor Pathology, 3rd Series, Fascicle 17. Tumor of Salivary Glands – Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC 1996.

El-Mofty SK, O’Leary TR, Swanson PE. Malignant myoepithelioma of salivary glands: Clinicopathologic and immunophenotypic features. Review of literature and report of two cases. *Int J Surg Pathol* 1994; 2:133 - 40.

Erdos EG, Schulz WW, Gafford JT, Defendini R. Neutral metalloendopeptidase in human male genital tract: comparison to angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 1985; 52:437 - 47.

Erlanson RA, Cardon-Cardo C, Higgins PJ. Histogenesis of benign pleomorphic adenoma (mixed tumor) of the major salivary glands. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Am J Surg. Pathol* 1984; 8:803 - 20.

Evans HL, Batsakis JG. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary glands: A study of 14 cases of a distinctive neoplasm. *Cancer* 1984; 53:935 - 42.

Farr AG, Berry ML, Kim A, Nelson AJ, Welch MP, Aruffo A. Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. *J Exp Med* 1992, 176:1477 - 82.

Ferreiro JA. Immunohistochemistry of basal cell adenoma of the major salivary glands. *Histopathology* 1994; 24: 539 - 42.

Fonseca I, Soares J. Epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary glands. A study of 22 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 422: 389-96.

Freedman PD, Lummerman H. Lobular carcinoma of intraoral minor salivary gland origin. Report of twelve cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983, 56: 157 - 66.

Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathol* 2005; 46:396-402.

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

Gandarillas A, Scholl FG, Benito N, Gamallo C, Quintanilla M. Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcinog* 1997; 20:10-18.

Garrett JR, Emmelin N. Activities of salivary myoepithelial cells: a review. *Med.Biol.* 57, 1-28 (1979). Garrett JR.: Myoepithelial activity in salivary glands. In: *Glandular Mechanisms of Salivary Secretion* (Garrett JR, Ekstrom J, Anderson LC, ed.), pp. 132-152. Karger, Basel 1998.

Gasic GJ. Role of plasma, platelets, and endothelial cells in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1984; 3:99-114.

Godoy LR, Suárez L, Mosqueda A, Meneses A. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the parotid gland. Case report and review of the literature. *Med oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12:E30-3.

Gonzalez RF, Dobbs LG. Purification and analysis of RT140, a type I alveolar epithelial cell apical membrane protein. *Biochim Biophys Acta* 1998 Dec 8; 1429:208-16.

Greaves MF, Hairi G, Newman RA, Sutherland DR, Ritter MA e Ritz J. Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood* 1983; 61:628-39.

Guerin S, Mari B, Fernandez E, Belhacène N, Toribio ML, Auberge P. CD10 is expressed on human thymic epithelial cells lines and modulates thymopentin-induced cell proliferation. *FASEB J* 1997; 11:1003 - 11.

Guerin S, Mari B, Maulon L, Belhacène N, Marguet D, Auberge P. CD10 plays a specific role in early thymic development. *FASEB J* 1997; 11:376-81.

Harris NF, Bhan AF. Mantle-zone lymphoma. A pattern produced by lymphomas of more than one cell type. *Am J Surg Pathol* 1985; 9:872-82.

Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T et al. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 2003; 162:575-86.

Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, Oliver G: Prox 1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002; 225:351 - 57.

Honn KV, Tang DG, Crissman JD. Platelets and cancer metastasis: a casual relationship? *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11:325-51.

Huang WB, Zhou XJ, Chen JY, Zhang LH, Meng K, Ma HH et al. CD10 positive stromal cells in gastric carcinoma: correlation with invasion and metastasis. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35:245-50.

Hubner G, Klein HJ, Kleinsasser O, Schiefer HG. Role of myoepithelial cells in the development of salivary gland tumors. *Cancer* 1971; 27:1255-61.

Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, Kuroda M, Mukai K. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch* 2002; 440:589-93.

Jao W, Keh PC, Swerdlow MA. Ultrastructure of the basal cell adenoma of parotid gland. *Cancer* 1976; 37:1322-33.

Johnson AR, Coalson JJ, Asthon J, Larumbide M, Erdos EG. Neutral endopeptidase in serum samples from patients with adult respiratory distress syndrome. Comparison with angiotensin-converting enzyme. *Am Rev Resp Dis* 1985; 132: 1262-7.

Kahn HJ, Marks A: A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 2002; 82:1255 -57.

Kanitakis J, Narvaez D, Claudy A. Differential expression of the CD10 antigen (neutral endopeptidase) in primary versus metastatic malignant melanomas of the skin. *Melanoma Res* 2002; 12:241-4.

Kato Y, Fujita N, Kunita A, Sato S, Kaneko M, Osawa M et al. Molecular identification of aggrus/T1 $\alpha$  as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J Biol Chem* 2003; 278:51599-605.

Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M. Enhanced expression of aggrus (T1 $\alpha$ /podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 2005; 26:195-200.

Kato Y, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, Tsuruo T. Aggrus: a diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Onco-gene* 2004; 23:8552 - 56.

Kaufmann O, Flath B, Spath-Schwalbe E, Possinger K, Dietel M. Immunohistochemical detection of CD10 with monoclonal antibody 56C6 on paraffin sections. *Am J Clin Pathol* 1999; 111:117- 22.

Kawase A, Ishii G, Nagai K, Ito T, Nagamo T, Murata Y et al. Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma. *In J Cancer* 2008; 123:1053 - 59.

King KA, Hua J, Torday JS, Drazen JM, Graham SA, Shipp MA e Sunday ME. CD10/Neutral endopeptidase 24.11 regulates fetal lung growth and maturation

in utero by potentiating endogenous bombesin-like peptides. *J Clin Invest* 1993; 91:1969-1973.

Kovács A, Dhillon J, Walker RA. Expression of P-Cadherin, but not E-Cadherin or N-Cadherin, relates to pathological and functional differentiation of breast carcinomas. *Mod Pathol* 2003; 56:318-22.

LeBien TW, Boue DR, Bradley JG e Kersey JH. Antibody affinity may influence antigenic modulation of the common acute lymphoblastic leukemia antigen in vitro. *J Immunol* 1982;129:2287

LeBien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10) - emancipation from a functional enigma. *Blood* 1989 15;73:625-35.

Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature* 2001; 411:375-9.

Littman CD, Alguacil-Garcia A. Clear cell carcinoma arising in pleomorphic adenoma of the salivary gland. *Am J Clin Pathol* 1987; 88:239-43.

Luna MA, Batsakis JG, Ordonez NG, Mackay B, Tortoledo ME. Salivary gland adenocarcinomas: a clinicopathologic analysis of three distinctive types. *Semin Diagn Pathol* 1987; 4:117-35.

Luna MA, Ordonez NG, Mackay B, Batsakis JG, Guillamondegui O.: Salivary epithelial-myoeithelial carcinoma of intercalated ducts: a clinical, electron

microscopic, and immunocytochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 59: 482-90.

Luukkaa H, Klemi P, Hirsimáki P, Vahlberg T, Kivisaari A, Káhári VM, Grénman R. Matrix metalloproteinase (MMP) -1, -9, and -13 as prognostic factors in salivary gland cancer. *Acta Otolaringol* 2008; 12:482-90.

Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Vahlberg T, Grénman R. Prognostic significance of ki-67 and p53 as tumor markers in salivary gland malignancies in Finland: an evaluation of 212 cases. *Acta Oncol* 2006; 45:669-75.

Mahalingam M, Ugen KE, Kao KJ, Klein PA. Functional role of platelets in experimental metastasis studied with cloned murine fibrosarcoma cell variants. *Cancer Res* 1988; 48:1460-4.

Margaritescu C, Raica M, Florescu M, Simionescu C, Suparteanu M, Jaubert F et al. The ultrastructural aspects of neoplastic myoepithelial cell in pleomorphic adenomas of salivary glands. *J Cell Mol Med* 2004; 8:369-81.

Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 1999; 80:569 - 78.

Martin M, Pujuguet P, Martin F. Role of stromal myofibroblasts infiltrating colon cancer in tumor invasion. *Pathol Res Pract* 1996 Jul; 192: 712-7.

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

Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Munoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M. Characterization of human PA2.26 antigen (T1 alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005; 113:899-910.

McIntosh GG, Lodge AJ, Watson P, Hall AG, Wood K, Anderson JJ et al. NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol* 1999; 154:77- 82.

Metzgar RS, Borowitz MJ, Jones NH, Dowel BR. Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J Exp Med* 1981; 154:1249.

Minna, JD, Higgins GA, Glastein EJ. Cancer of the lung. In *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. JB Lippincott, Philadelphia 1985; 507-598.

Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M. Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol* 2006; 111:483 - 88.

Mishima K, Kato Y, Mika KK, Nakazawa Y, Kunita A, Fujita N et al. Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol* 2006; 111:563 - 68.

Morinaga S, Nakajima T, Shimosato Y. Normal and neoplastic myoepithelial cells in salivary glands: An immunohistochemical study. *Human Pathol* 1987; 18:1218-26.

Moritani S, Kushima R, Sugihara H, Bamba M, Kobayashi TK, Hattori T. Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections. *Mod Pathol* 2002; 15:397-405.

Murali R, Delprado W. CD10 Immunohistochemical Staining in Urothelial Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 371- 79.

Nanus DM. Of peptides and peptidases: the role of cell surface peptidases in cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9:6307-9.

Nicolatou O, Kakarantza-Angelopoulos E, Angelopoulos AP, Angelopoulos S. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the palate: report of a case with electron microscopy. *J Oral Maxillofac Surg* 1988; 46:1008-13.

Nikai H, El-Bardaie AM, Takata T, Ogawa I, Ijuhin N. Histologic evaluation of myoepithelial participation in salivary gland tumors. *Int. J. Oral Maxillofac Surg* 1986; 15:597-605.

Noel A, Foidart JM. The role of stroma in breast carcinoma growth in vivo. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3:215-25.

Norberg LE, Burford-Mason AP, Dardick I. Cellular differentiation and morphologic heterogeneity in polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland. *J Oral Pathol Med* 1991; 20:373-79.

Nose K, Saito H, Kuroki T. Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells. *Cell Growth Differ* 1990; 1:511-18.

Ogawa H, Iwaya K, Izumi M, Kuroda M, Serizawa H, Koyanagi Y et al. Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development. *Hum Pathol* 2002; 33:806-11.

Ogawa I, Nikai H, Takata T, Miyauchi M, Ito H, Ijuhin N. The cellular composition of basal cell adenoma of the parotid gland. An immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med oral Pathol* 1990; 70:619-26.

Ogawa Y. Immunocytochemistry of Myoepithelial Cells in the Salivary Glands. *Prog Histochem Cytochem* 2003; 38:343-426.

Ordonez NG. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical marker of epithelioid malignant mesothelioma. *Human Pathology* 2005; 36:372-80.

Ordonez NG. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesothelioma: an update. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129:1407-14.

Ordonez NG. Podoplanin : A Novel Diagnostic Immunohistochemical Marker. *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 83-88.

Orestein JM, Dardick I, van Nostrand AWP. Ultrastructural similarities of adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma. *Histopathology* 1985; 9:623-38.

Palmer RM, Lucas RB, Langdon JD: Ultrastructural analysis of salivary gland pleomorphic adenoma, with particular reference to myoepithelial cells. *Histopathology* 1985; 9:1061-76.

Palmer RM. The identification of myoepithelial cells in human salivary glands. A review and comparison of light microscopical methods. *J Oral Pathol* 1986; 15:221-29.

Papadaki H, Finkelsen SD, Kounelis S, Bakker A, Swalsky PA, Kapadia SB. The role of p53 Mutation and protein expression in primary and recurrent adenoid cystic carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27:567-72.

Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Borgenrieder T, Freeman R, Wilk S et al. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 1998; 4:50-57.

Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC. Adenoid cystic carcinoma arising in salivary glands: a correlation of histological features and clinical course. *Cancer* 1978; 42:265-82.

Piattelli A, Fioroni M, Iezzi G, Perrotti V, Stellini E, Piattelli M et al. CD10 expression in stromal cells of oral cavity squamous cell carcinoma: a clinic and pathologic correlation. *Oral Diseases* 2006; 12:301-04.

Pogodzinski Ms, Sabi AN, Lewis JE, Olsen KD. Retrospective study and review of polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Laryngoscope* 2006; 116:2145-9.

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

Quddus MR, Henley JD, Affify AM, Dardick I, Gnepp DR. Basal cell adenocarcinoma of the salivary gland: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87: 485-492.

Reis-Filho JS, Milanezi F, Silva P, Schmitt FC. Maspin expression in myoepithelial tumors of the breast. *Pathol Res Pract* 2001; 197:817-21.

Reis-Filho JS, Schmitt FC. Taking advantage of basic research: p63 is a reliable myoepithelial and stem cell marker. *Adv Anat Pathol* 2002; 9:280-89.

Rishi AK, Joyce-Brady M, Fisher J, Dobbs LG, Floros J, VanderSpek J et al. Cloning, characterization, and development expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives. *Dev Biol* 1995; 167:294-306.

Ritz J, Pesando JM, Notis-McConarty J, Lazarus H, Schlossman SF. A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature* 1980; 283:583-85.

Ritz J, Pesando JM, Notix-McConarty J, Schlossman F. Modulation of human acute lymphoblastic leukemia antigen induced by monoclonal antibody in vitro. *J Immunol* 1980; 125:1506 -14.

Ross MH, Romerell LJ: *Histology; A text and Atlas*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1989.

Roy S, Chu A, Trojanowski JQ, Zhang P. D2-40, a novel monoclonal antibody against the M2A antigen as a marker to distinguish hemangioblastomas from renal cell carcinomas. *Acta. Neuropathol* 2005; 109: 497-502.

Rozengurt E , Sinnett-Smith J. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:2936-40.

Sappino AP, Schürch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990; 63:144-61.

Savera AT, Sloman A, Huvos AG, Klimtra DS. Myoepithelial carcinoma of the salivary glands. A clinicopathologic study of 25 patients. *AM J Surg Pathol* 2000; 24:761-74.

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YH , Detmar M. Up-Regulation of the Lymphatic Marker Podoplanin, a Mucin-Type Transmembrane Glicoprotein, in Human Squamous Cell Carcinomas and Germ Cell tumors. *Am J of Pathol*. 2005; 166: 913-20.

Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, et al. T1 alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 2003; 22:3546-56.

Schimid K, Birner P, Gravenhorst V, End A, Geleff S. Prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in neuroendocrine tumors of the lung. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:324-28.

Sciubba JJ, Brannon RB. Myoepithelioma of salivary glands: report of 23 cases. *Cancer* 1982; 49:562-72.

Seethala RR, Barnes EI, Hun JL. Epithelial-myoepithelial carcinoma: a review of the clinicopathologic spectrum and immunophenotypic characteristics in 61 tumors of the salivary glands and upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:44 - 57.

Seethala RR, Pasha TL, Raghunath PN, Livolsi VA, Zhang PJ. The selective expression of CD43 in adenoid cystic carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008; 16:165-72.

Shipp MA, Look AT. Hematopoietic Differentiation Antigens That Are Membrane Associated Enzymes: Cutting Is The Key! *Blood* 1993; 82:1052-70.

Shipp MA, Stefano GB, D'Adamio L, Switzer SN, Howard FD, Sinisterra J et al. Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11. *Nature* 1990; 347:397-96.

Shipp MA, Stefano GB, Switzer SN, Griffin JD, Reinherz EL. CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. *Blood* 1991; 87:1834-41.

Shipp MA, Vijayaraghavan J, Schmidt V, Masteller EL, D'Adamio L, Hersh LB et al. Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:297-3012.

Simpson RH, Jones H, Beasley P. Benign myoepithelioma of the salivary gland: a true entity? *Histopathology* 1995; 27:1-9.

Skálová A, Leivo I. Cell proliferation in salivary gland tumors. *Gen Diag Pathol* 1996; 142:7-16.

Skálová A, Michal M. Biphasic myoepithelioma of parotid gland with collagenous crystalloids. *Histopathology* 1994; 24:583-86.

Soares AB, Juliano PB, Araujo VC, Metzke K, Altemani A. Angiogenic switch during tumor progression of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Virchow Arch* 2007; 451:65-71.

Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumours (Salivary Glands and Saliva no.9). *Oral Disease* 2002; 8:229-40.

Spiro RH, Huvos AG. Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. *AM J Surg* 1992; 164: 623-28.

Sternlicht MD, Barsky SH. The myoepithelial defense: a host defense against cancer. *Med Hypotheses* 1997; 48:37-46.

Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao Z-M, Safarians S, Barsky SH. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1949-58.

Sunday ME, Hua J, Torday JS, Reyes B, Shipp MA. CD10/neutral endopeptidase 24.11 in developing human fetal lung. Patterns of expression and modulation of peptide-mediated proliferation. *J Clin Invest* 1992; 90:2517-25.

Sunday ME, Reyes B, Shipp MA. CD10 neutral endopeptidase-24.11 in human fetal lung: temporal and cell-specific patterns of gene expression. *Clin Res* 1992; 40:A305.

Suzuki K, Aiura K, Ueda M, Kitajima M. The influence of platelets on the promotion of invasion by tumors cells and inhibition by antiplatelet agents. *Pancreas* 2004; 29:132-40.

Suzuki K. Basal cell adenoma with acinic differentiation. *Acta Pathol Jpn* 1982; 32:1085-92.

Szanto PA, Luna MA, Tortoledo ME, White RA. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer* 1984; 54:1062-69.

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

Takai Y, Dardick I, Mackay A, Burford-Mason A, Mori M. Diagnostic criteria for neoplastic myoepithelial cells in pleomorphic adenoma and myoepitheliomas. Immunocytochemical detection of muscle-specific actin, cytokeratin 14, vimentin, and glial fibrillary acid protein. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 330-41.

Takeda Y: Malignant myoepithelioma of minor salivary gland origin. *Acta Pathol. Jpn.* 1992; 42:518-22.

Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 1998; 83:1153-62.

Velazquez E, Yancovitz M, Pavlick A, Berman R, Shapiro R, Bogunovic D et al. Clinical relevance of Neutral Endopeptidase (NEP/CD10) in melanoma. *Journal of Translational Medicine* 2007; 5:1-10.

Wetterwald A, Hofstetter W, Cecchini B, Lanske B, Wagner C, Fleisch H, Atkinson M. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoclasts and osteocytes. *Bone* 1996; 18:125-32.

Wicki A e Christofori G. The potential role of podoplanin in tumor invasion. *British Journal of Cancer* 2007; 96:1-5.

Willey JC, Lechner JF, Harris CC. Bombesin and the C-terminal tetradecapeptide of gastrin-releasing peptide are growth factors for normal human bronchial apithelial cells. *Exp Cell Res* 1984; 153:245-8.

Woo VL, Bhuiya T, Kelsch R. Assesment of CD43 expression in adenoid cystic carcinomas, polymouphous low-grade adenocarcinomas, and monomorphic adenomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad Oral End* 2006; 102:495-500.

Young JA, Van Lennep EW.: Morphology and physiology of salivary myoepithelial cell. *Int. Rev. Physiol* 1997; 12:105 -25.

Zameenik M, Kinkor Z, Chlumska A. CD10+ stromal cells in fibroadenomas and phyllodes tumors of the breast. *Virchow Arch* 2006; 448:871-2.

Zhu QR, White FH, Tipoe GL. p53 oncoprotein accumulation in adenoid cystic carcinoma of parotid and palatine salivary glands. *Pathology* 1997; 29:154-58.

Zimmer G, Lottspeich F, Maisner A, Klenk HD, Herrler G. Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells (type I). *Biochem J* 1997; 326:99-108.

Zimmer G, Oeffner F, Von Messling V, Tschernig T, Groness HJ, Klenk HD et al. Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium. *Biochem J* 1999; 341:277-84.

## **Apêndice**

---

## **CD10 (neutral endopeptidase) expression in myoepithelial and stromal cells of salivary neoplasms**

**Catarina de Oliveira Neves MD<sup>a</sup>, Ana Flávia Costa DDS<sup>a</sup>, Priscila Juliano MD<sup>a</sup>, Vera Cavalcanti de Araujo DDS, PhD<sup>b</sup>, Cristiane Furuse DDS, PhD<sup>b</sup>, Albina Altemani MD, PhD<sup>a</sup>**

**SUMMARY:** CD10 is a cell surface peptidase expressed in a wide variety of normal and neoplastic tissues, including myoepithelial and stromal cells. In tumor-associated stromal cells it was recently suggested that CD10 expression could be linked to tumor progression. Our study is the first to investigate CD10 sensitivity in highlighting myoepithelial cells and its expression in stromal cells of salivary gland neoplasms. We examined 79 salivary tumors with myoepithelial differentiation using immunohistochemical technique to detect CD10. In normal salivary glands adjacent to the tumors, myoepithelial cells as well as fibrocytes within the intralobular stroma showed CD10 expression. In neoplastic myoepithelial cells, CD10 expression was found in 25.71% of benign and 27.27% of malignant neoplasms. When the different groups of tumors were compared, epithelial-myoepithelial carcinomas (EMEC) showed a stark contrast with the others (83.3% of cases with CD10 expression). Adenoid cystic carcinomas (ACC), polymorphic low-grade adenocarcinomas and basal cell adenomas were negative in 100% of cases. Pleomorphic adenomas, myoepitheliomas and myoepithelial carcinomas were positive in 30.0%, 27.7% and 40% of cases respectively. CD10 positive tumor-associated stromal cells were found within the tumor and/or at the invading front in 38.64% of salivary carcinomas. No correlation was found between CD10 expression in tumor-associated stromal cells and clinicopathological parameters in ACC. In conclusion, CD10 may be a useful marker only in the identification of EMEC. Regarding CD10 expression by stromal cells in salivary glands, it neither can be considered a cancer-specific phenotype nor seems to play an important role in tumor progression.

**Keywords:** CD10, salivary tumor, stromal cells, myoepithelial cells

**Corresponding author:** Albina Altemani, Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Rua Tessália Vieira de Camargo 126, ZIP Code 13084-971 Campinas, SP, Brazil

**Fax number:** 55-19-3289 3897

**E-mail:** aaltemani@uol.com.br

---

<sup>a</sup> Department of Pathology, Medical Science Faculty, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

<sup>b</sup> CPO São Leopoldo Mandic, Campinas, SP, Brazil.

**Abbreviations:**

**SMA**, smooth muscle actina

**ACC**, Adenoid cystic carcinoma

**EMEC**, Epithelial-myoeptithelial carcinoma

**PLGA**, Polymorphic low-grade adenocarcinoma

**MEC**, Myoeptithelial carcinoma

**BCA**, Basal cell adenoma

**PA**, Pleomorphic adenoma

**Myoep**, Myoeptithelioma

## 1. Introduction

Salivary gland tumors present a great morphologic diversity and many of them contain myoepithelial cells in their composition. These cells show a range of morphological features which is also reflected at the immunohistochemical level. For this reason, a panel of antibodies is recommended to identify myoepithelial cells in salivary gland tumors, since not all myoid markers are expressed in individual cases (1). Recently, other markers not directly related to the smooth muscle apparatus of the myoepithelial cells, such as p63 (2), maspin (3), p-cadherin (4) and CD10 (5), have emerged refining the detection of lesions with myoepithelial component. Regarding CD10, it has been recommended as a marker of myoepithelial cells in pleomorphic adenomas and myoepithelial carcinomas (6, 7). However, its accuracy in other salivary tumors has yet to be analyzed.

CD10, also called neutral endopeptidase, is a 90- to 110-kDa cell surface zinc-dependent metalloproteinase which controls growth and differentiation in normal cells (8). As a cell surface peptidase, it regulates biological activities of peptide substrates by reducing the local concentrations available for receptor binding and signal transduction (9). CD10 has been identified in a wide variety of cell types, besides myoepithelial ones (such as lymphoid germinal centers, renal tubules, glomeruli, syncytiotrophoblast, hepatic parenchymal canaliculi (10), fibroblasts (11) etc) and tumors (renal cell carcinoma, prostatic adenocarcinoma, endometrial stromal sarcoma, rhabdomyosarcoma (12), urothelial neoplasms (13) etc).

Studies evaluating CD10 expression in different tumor types have revealed that this protein presents a complex role in neoplastic disorders. Loss as well as gain of CD10 expression by neoplastic cells has been shown to correlate with tumor progression in a large

variety of cancers (14 – 17). In addition, recent studies have reported that tumor-associated stromal cells can express CD10 as well (18 – 23). In breast, colorectal, gastric, nasopharyngeal and oral carcinomas this stromal modification seemed to be associated with biological aggressiveness of the tumor (18 – 22). To the best of our knowledge, in salivary gland tumors expression of CD10 in non-myoepithelial cells has not been examined so far.

Drawing from this background, we investigated the expression of CD10 in a series of benign and malignant salivary tumors with myoepithelial differentiation to verify: a) its diagnostic utility as a marker of myoepithelial cells and b) whether CD10 is detectable in tumor-associated stromal cells. As  $\alpha$ -SMA is considered one of the most useful markers of myoepithelial cells as well as myofibroblasts (important component of the reactive stroma induced by cancer cells), we compared the staining patterns of CD10 with those of  $\alpha$ -SMA (24, 25). Furthermore, to verify whether in salivary carcinomas CD10 expression in stromal cells could be linked to biologic behavior, we examined the correlation between protein expression and clinicopathological parameters in adenoid cystic carcinomas. Adenoid cystic carcinoma is one of the most common malignancies in salivary glands and the most numerous group in our series.

## 2. Material and Methods

The present study was approved by the Committee of Ethics of the University of Campinas, Brazil and was performed in 79 cases of salivary neoplasms with myoepithelial differentiation (44 malignant and 35 benign). These cases, which were diagnosed between 1991 and 2008, were retrieved from the files of the Department of Pathology of the University of Campinas. Hematoxylin-eosin (H&E)-stained slides from each tissue block were reviewed to confirm the pathological diagnosis and select a representative section for analysis.

Demographic and clinical information was obtained from the patients' medical records.

The malignant group included 20 cases of Adenoid cystic carcinomas – CAC- (73.68% female, average age 47), 12 of Epithelial-myoeithelial carcinomas – EMEC- (60% female, average age 55), 7 of Polymorphic low grade carcinomas –PLGA- (83.33% female, average age 46) and 5 of Myoeithelial carcinomas – MEC- (50% female, average age 69). The benign group included 20 cases of Pleomorphic adenomas –PA- (52.94% female, average age 46), 11 Myoeitheliomas –Myoep- (75% female, average age 58) and 4 Basal cell adenomas –BCA- (50% female, average age 53).

### 2.1. Immunohistochemistry

One paraffin block from each case was chosen for the immunohistochemical study. The antibodies used in this study were anti-CD10 (Labvision, CA, USA, clone 56C6, dilution 1/50) and  $\alpha$ -SMA (Dako, Denmark, clone 1 A4, dilution 1/200). The 5 $\mu$ m sections were deparaffinized, hydrated and endogenous peroxidase activity was quenched by immersion of the slides in 3% hydrogen peroxide. Antigen retrieval was achieved by boiling in a steamer immersed in tris-EDTA buffer (pH: 8.9, 30 minutes) for CD10 and in citrate buffer (pH: 6.0, 30 minutes) for  $\alpha$ -SMA. Subsequently, the sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody and afterwards with the EnVision polymer HRP and EnVision+ (code K1491, DAKO, SA, Denmark) for 1h at 37°C. Sections were stained for 5min at 37°C with 3.3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and counter-stained with hematoxylin. Negative controls were run by omitting primary antibodies.

### 2.2. Evaluation of Staining

Immunohistochemical reactions for anti-CD 10 and  $\alpha$ SMA were interpreted by two

authors (CN and AA) using a double-headed microscope. Brown staining of the cell membrane and/or cytoplasm was regarded as positive. The relative numbers of stromal and neoplastic CD10+ and  $\alpha$ -SMA+ cells were considered in relation to all stromal and neoplastic cells respectively observed in each stained section. When the number of positive cells was more than 10%, the case was judged positive. In addition, the positive neoplastic cells were assessed regarding: a) histological subtype: myoeithelial or ductal/epithelial and b) quantity using a two-tiered scale: >10% - 50%, and > 50% of positive cells.

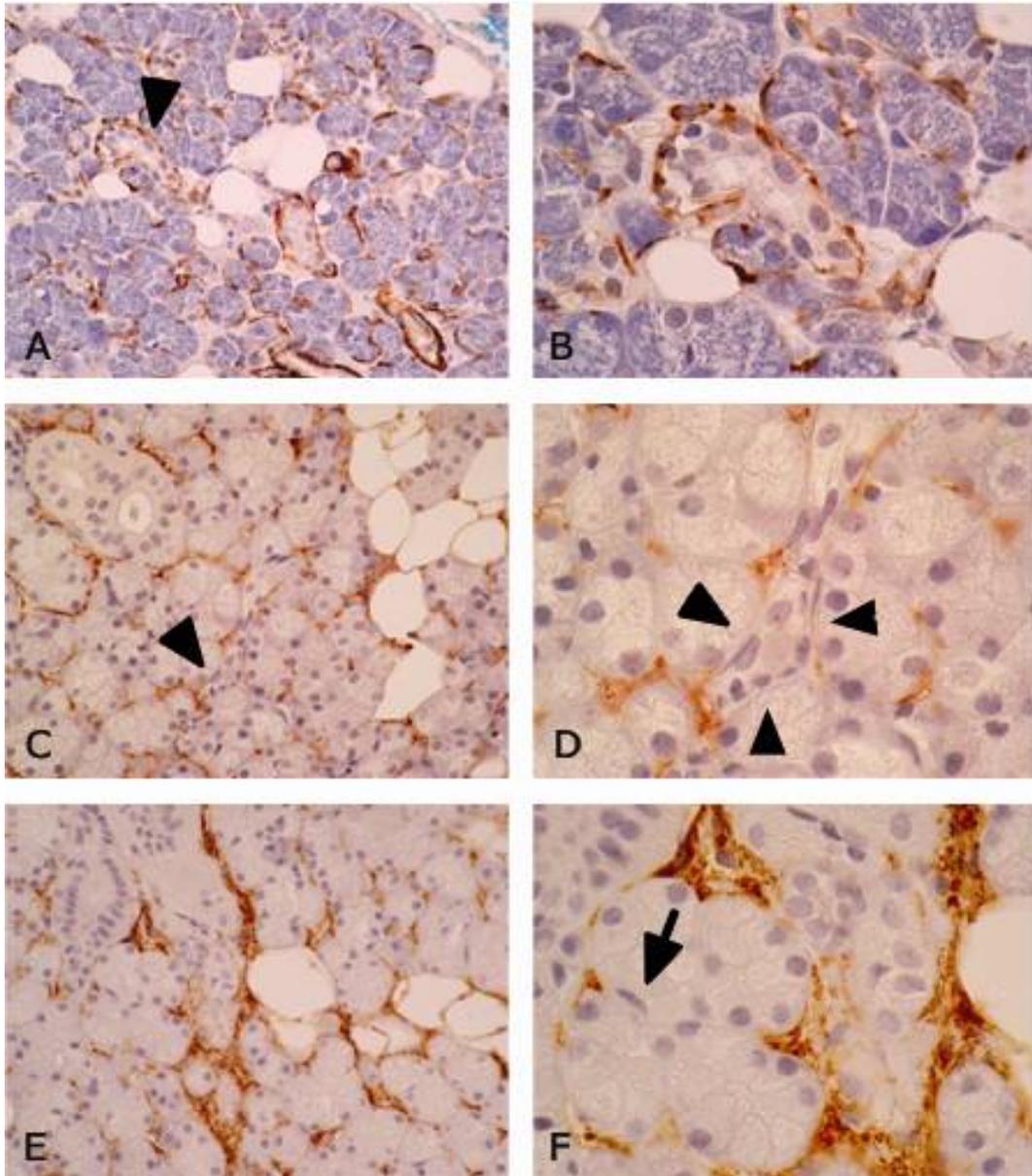
### 2.3 Statistical Analysis

Comparison of values was performed using Fisher's exact test.  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed with the SAS System for Windows, version 9.1.3; SAS Inc., Cary, NC, USA.

## 3. Results

### 3.1 Expression of CD10 in normal salivary glands

In normal salivary glands adjacent to the tumors, the number of CD10 positive myoeithelial cells was different with respect to their location. Most of them were detected around the acini whereas few CD10 positive myoeithelial cells were distributed on the basal aspect of intercalated duct. In contrast, in these structures  $\alpha$ -SMA positive cells formed an almost continuous layer around them (Figure 1). Regarding expression of CD10 in the connective tissue of the salivary parenchyma, small number of positive cells was encountered close to ducts and acini although in some areas they formed thin strands around the latter (Figure 1). Epithelial cells of the acinar as well as ductal type were CD10 negative.

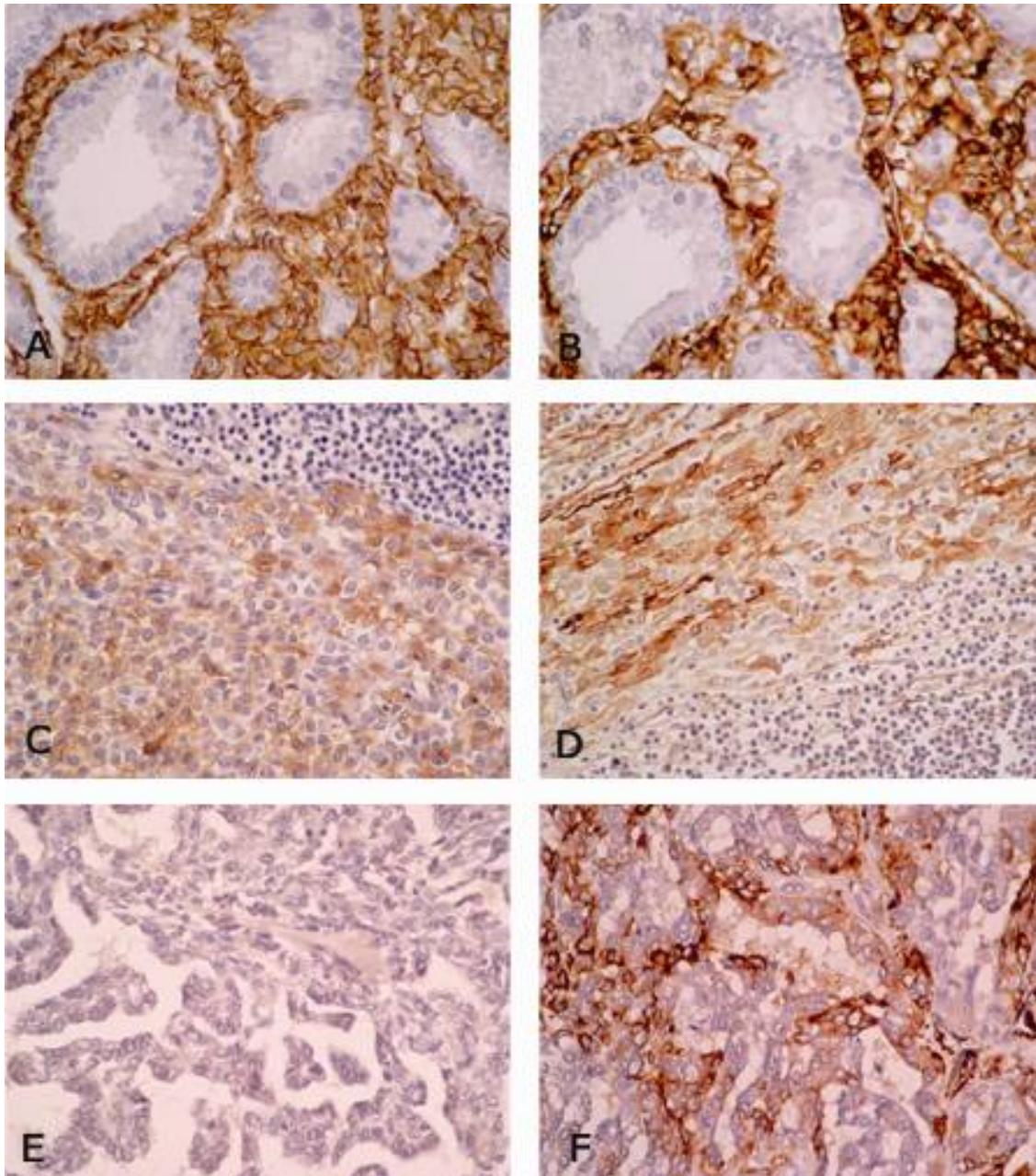


**Figure 1:** CD10 and  $\alpha$ -SMA immunohistochemical staining in normal salivary gland. (A, B) Myoepithelial cells associated with intercalated duct (arrowhead) and acini are detected by  $\alpha$ -SMA. (B)  $\alpha$ -SMA-positive myoepithelial cells form an almost continuous layer around intercalated duct. (C, D, E, F) CD10 is expressed by myoepithelial and stroma cells. CD10-positive myoepithelial cells are found mainly around acini. In contrast to  $\alpha$ -SMA, rare CD10-positive cells are associated with the intercalated duct (between arrowheads in D). In areas, CD10-positive stromal cells form thin strands around the acini (E, F). (Immunohistochemistry of CD10 and  $\alpha$ -SMA: original magnification x400 A, C, E and x1000 B, D, F).

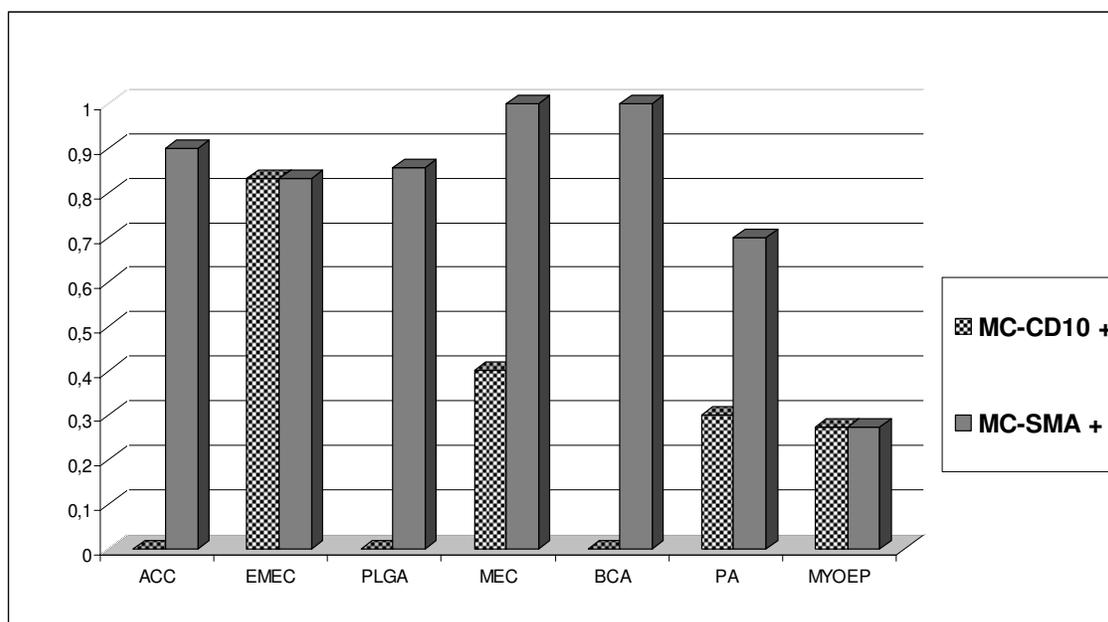
### 3.2 Expression of CD10 in salivary carcinomas with myoepithelial differentiation

a) **In myoepithelial cells (Figure 2):** in contrast to  $\alpha$ -SMA, which was detected in 88.64% of cases, the majority of carcinomas was CD10 negative. The distribution of cases in relation to

expression of CD10 and  $\alpha$ -SMA according to histological carcinoma subtypes is shown in figure 3 and table 1. Expression of CD10 was significantly higher in EMEC (83.33% of cases,  $p < 0.001$ ) than in the other subtypes of carcinomas whereas  $\alpha$ -SMA was detected in a similar frequency in all of them ( $p = 0.010$ ).



**Figure 2:** CD10 (on the left side) and  $\alpha$ -SMA (on the right side) immunohistochemical staining in the myoepithelial cells of salivary carcinomas: Epithelial-myoepithelial carcinoma (A, B), Myoepithelial carcinoma (C, D) and Polymorphic low-grade adenocarcinoma (E, F). No CD10 expression is detected in Polymorphic low-grade adenocarcinoma (E). (Immunohistochemistry of CD10 and  $\alpha$ -SMA: original magnification x400).



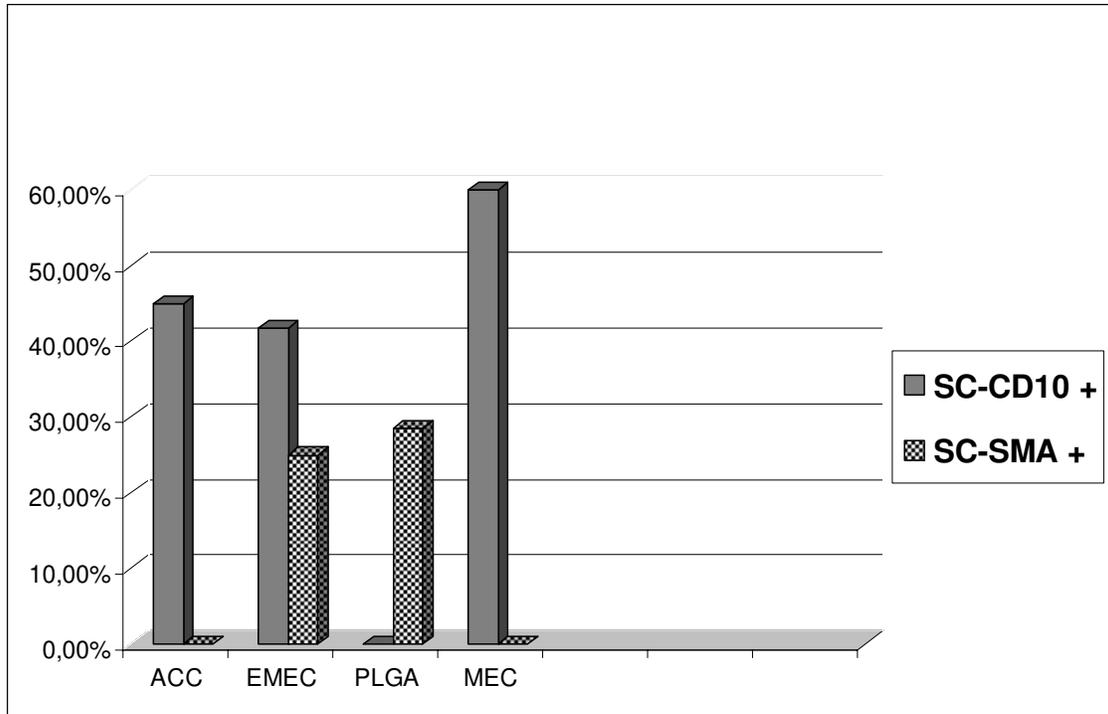
**Figure 3:** Expression of CD10 and  $\alpha$ -SMA in myoepithelial cells (MC) of salivary neoplasms with myoepithelial differentiation. ACC, Adenoid cystic carcinoma; EMEC, Epithelial-myoeplithelial carcinoma; PLGA, Polymorphic low-grade adenocarcinoma; MEC, Myoepithelial carcinoma; BCA, Basal cell adenoma; PA, Pleomorphic adenoma; Myoep, Myoepithelioma.

**Table 1 –** Expression of CD10 and  $\alpha$ -SMA in myoepithelial and stroma cells of salivary carcinomas with myoepithelial differentiation.

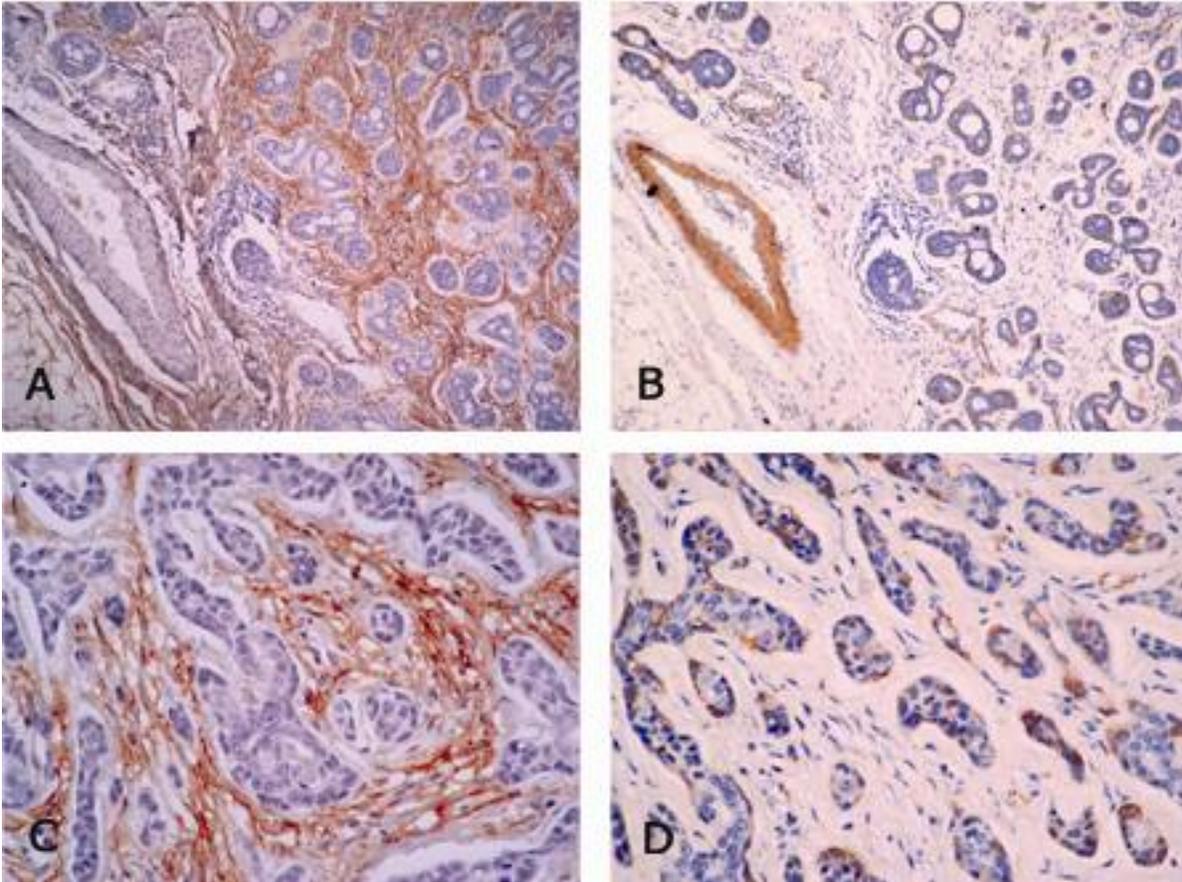
Antibody	Amount of cells	ACC 20 cases %	EMEC 12 cases %	MEC 5 cases %	PLGA 7 cases %	p value
CD10 in myoepithelial cells	10-50%	0.00	50.00	40.00	0.00	P<0.001
	> 50%	0.00	33.33	0.00	0.00	
CD10 in stroma cells	> 10%	45.00	41.67	60.00	0.00	p=0.097
$\alpha$ -SMA in myoepithelial cells	10-50%	50.00	8.33	60.00	85.71	p=0.010
	>50%	40.00	75.00	40.00	0.00	
$\alpha$ -SMA in stroma	>10%	0.00	25.00	0.00	28.57	p=0.039

- b) **In epithelial cells:** as less than 10% of epithelial ductal cells were CD10 positive in ACC and EMEC, the expression of this marker was considered negative in this type of cell.
- c) **In tumor-associated stromal cells:** In 38.64% of cases more than 10% of stromal cells, which were located at the invasive front and/or within the tumor, were positive for CD10 whereas  $\alpha$ -

SMA positive cells were found only in 11.36% of carcinomas. CD10 positive cells were detected in all tumor types but PLGA and the frequency ranged from 41.67% to 60% of cases (Figure 4, Table 1).  $\alpha$ -SMA positive cells were observed only in EMEC (25% of cases) and PLGA (28.57% of cases). The distribution of CD10 and  $\alpha$ -SMA positive cells did not correspond in none of the cases (Figure 5).



**Figure 4:** Expression of CD10 and  $\alpha$ -SMA in stroma cells (SC) of salivary carcinomas with myoepithelial differentiation. ACC, Adenoid cystic carcinoma; EMEC, Epithelial-myoepithelial carcinoma; PLGA, Polymorphic low-grade adenocarcinoma; MEC, Myoepithelial carcinoma.



**Figure 5:** CD10 (on the left side) and  $\alpha$ -SMA (on the right side) immunohistochemical staining in adenoid cystic carcinoma. CD10 is expressed by the stroma cells within the invasive portion of the tumor whereas the myoepithelial ones are negative. Regarding  $\alpha$ -SMA, the myoepithelial cells are positive and the stromal ones are negative. (Immunohistochemistry of CD10 and  $\alpha$ -SMA: original magnification x100 A, B and x400 C, D).

d) **Associations between CD10 expression and clinicopathological variables in Adenoid Cystic Carcinomas:** In cases subdivided according to gender, histological subtype (tubular/cribriform versus solid), T classification (T1/T2 versus T3/T4), tumor location (major and

minor salivary glands) and presence or absence of recurrence and metastasis, the frequency of CD10 expression by stroma cells was compared (Table 2). No positive correlation was found with any of these clinicopathological parameters.

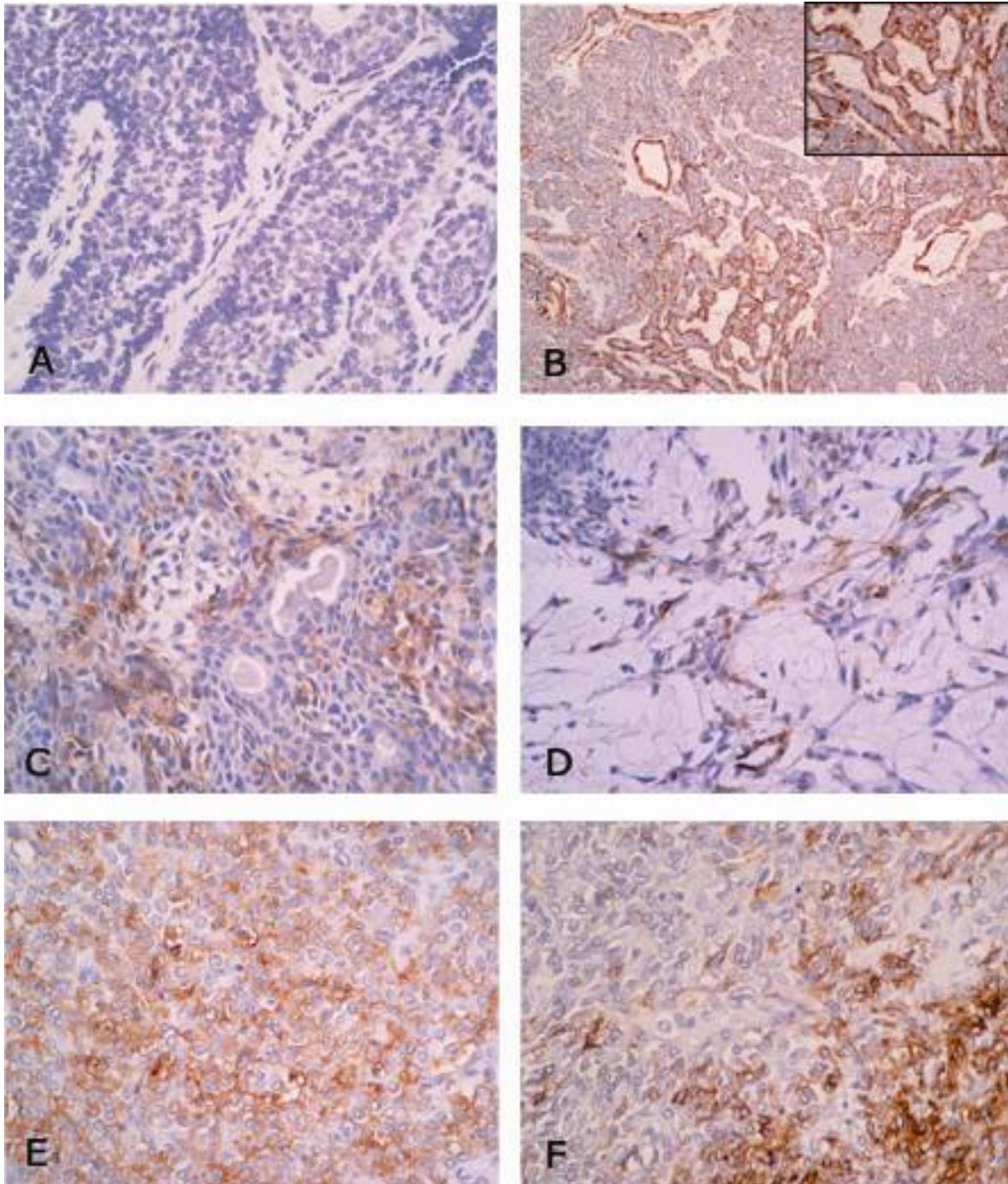
**Table 2** – Correlation between clinicopathological parameters and CD10 expression in stromal cells of adenoid cystic carcinomas (ACC).

Clinicopathological parameters	Number of cases	CD10 expression in stromal cells*	
		n (%)	p Value
<b>Types</b>			
T/C	10	6 (60.00)	0.370
S	10	3 (30.00)	
<b>Sex</b>			
F	14	4 (28.57)	0.111
M	5	4 (80.00)	
<b>Local</b>			
MiSG	9	5 (55.56)	0.637
MnSG	8	3 (37.50)	
<b>T classification</b>			
T1/T2	7	2 (28.57)	0.315
T3/T4	8	5 (62.50)	
<b>Local recurrence</b>			
Yes	3	1 (33.33)	1.000
No	12	5 (41.67)	
<b>Metastasis</b>			
Yes	6	2 (33.33)	1.000
No	9	4 (44.44)	

### 3.3 Expression of CD10 in benign salivary neoplasms with myoepithelial differentiation

a) **In myoepithelial cells (Figure 6 and Table 3):** the majority of benign lesions was negative for CD10 (74.29%) while 60% were positive for  $\alpha$ -SMA. PA and Myoep showed myoepithelial cells stained for CD10 in 30% and 27.27% of cases respectively, whereas

100% of BCA were negative. Differences of CD10 expression between these tumors were not significant ( $p=0.164$ ). Regarding  $\alpha$ -SMA, all tumor types contained myoepithelial cells stained by this marker (70%, 27.27% and 100% of PA, Myoep and BCA cases respectively) ( $p=0.010$ ).



**Figure 6:** CD10 (on the left side) and  $\alpha$ -SMA (on the right side) immunohistochemical staining in the myoepithelial cells of salivary benign neoplasms: Basal cell adenoma (A, B), Pleomorphic adenoma (C, D) and Myoepithelioma (E, F). No CD 10 expression is detected in Basal cell adenoma. (Immunohistochemistry of CD10 and  $\alpha$ -SMA: original magnification x400 A, C, D, E and x100 B).

**Table 3** – Expression of CD10 and  $\alpha$ -SMA expressions in myoepithelial cells of salivary neoplasms.

Antibody	Amount of cells	MYOE 11 cases %	ACB 4 cases %	PA 20 cases %	p value
CD10 in myoepithelial cells	10-50%	9.09	0.00	30.00	p=0.164
	>50%	18.18	0.00	0.00	
$\alpha$ -SMA in myoepithelial cells	10-50%	9.09	75.00	60.00	p=0.010
	>50%	18.18	25.00	10.00	

- b) **In epithelial cells:** Expression of CD10 in epithelial cells was observed only in PA cases. However, as less than 10% of the cells were positive, the expression was considered negative.

#### 4. Discussion

CD10 has been considered a useful marker of normal myoepithelial cells particularly in confusion breast lesions where combination of CD10 and  $\alpha$ -SMA could provide more sophisticated information about the presence or absence of these cells (26). In salivary glands, the current study is the first to ascertain whether CD10 is of value to detect normal as well as neoplastic myoepithelial cells. Regarding the first ones, we showed that there were marked differences of CD10 expression between myoepithelial cells associated with the intercalated duct and those with the acinus. Those associated with the acinus were CD10 positive whereas the majority of myoepithelial cells along the intercalated ducts were negative. In neoplastic lesions, we found that while  $\alpha$ -SMA highlighted the myoepithelial cells in the majority of benign and malignant tumors, CD10 was negative in the vast majority of them (72.73% of the malignant tumors and 74.29% of the benign). However, when the different groups of tumors were compared, EMEC showed a stark contrast with the others since 83.3% of cases were positive. ACC, PLGA and BCA were negative in 100% of the

cases and PA, Myoep and MEC were positive in 30.0%, 27.7% and 40% respectively.

In terms of the utility of CD10 as a tool in distinguishing salivary tumors with myoepithelial differentiation, these findings suggest that CD10 might be of great help only in the identification of EMEC. These tumors show a broad morphological spectrum and share histological similarities with other salivary and non-salivary tumors (27). In surgical specimens the diagnosis of EMEC is frequently straightforward but in small incisional biopsies where only a single pattern of the lesions may be apparent, the precise diagnosis may be impossible. These carcinomas present a biphasic pattern composed of inner duct-like lining cells and an outer layer of myoepithelial cells which usually have a cleared cytoplasm. Therefore, differential diagnoses of EMEC include other biphasic tumors, such as PA and tubular variant of ACC and those consisting predominantly of clear cells (28). Regarding biphasic tumors, our data suggest that CD10 could be a valuable tool only for separating EMEC from tubular variant of ACC since they presented a significant difference in CD10 reactivity (83.33% versus 0% in myoepithelial cells). In relation to PA, this marker is less valuable once 1/3 of them were CD10 positive. Regarding tumors consisting predominantly of clear cells, CD10 has been included in the panel of antibodies used to separate metastatic mimicker tumors from primary sialocarcinomas (28). The main reason for this

use is that metastatic clear cell renal carcinoma (one of the most common carcinomas that metastasizes to the head and neck) usually expresses this marker (29). Nevertheless, as our series revealed that the majority of EMEC is CD10 positive as well, the distinction between these two carcinomas should rely on the positivity of other markers, i.e. myoepithelial ones (such as  $\alpha$ -SMA, p63, calponin) for EMEC and renal cell carcinoma marker (RCC) for renal cell neoplasms.

In the cancer ecosystem the cross-talk between cancer cells and stromal cells leads to change in the stroma that may contribute to cancer invasion (30, 31). This reactive stroma is composed of fibroblasts, myofibroblasts, blood vessels and immune cells (25, 31). In recent studies on carcinomas arising in different regions, such as breast, gastrointestinal tract, bladder, oral cavity and nasopharynx, CD10 expression was found in tumor-associated stromal cells (18 - 23) in a percentage of cases that ranged from 18% to 52.1%. In these carcinomas, CD10 expression by stroma cells was detected almost exclusively within the area of the invasive growth suggesting that it would be an integral part of the destructive characteristics of malignant tumors and one of the important participants of the tumor-stroma interaction (19). As these CD10 positive cells seemed to be  $\alpha$ -SMA positive as well, the possibility that they could be myofibroblasts was raised (19, 20). In salivary carcinomas, the current study is the first that has investigated CD10 expression by tumor-associated stromal cells and we found that 38.64% of these lesions showed such expression in more than 10% of the cells. However, CD10 expression in stroma cells was not observed exclusively within invasive carcinoma tissue since in the normal salivary gland adjacent to the tumor stroma cells within the intralobular connective tissue were CD10 positive as well. Furthermore, the distribution of the stroma cells stained by CD10 and  $\alpha$ -SMA did not correspond and the frequency of carcinomas with CD10 positive stromal cells was markedly higher than that of tumors containing  $\alpha$ -SMA positive cells. These findings indicate that in salivary carcinomas with myoepithelial differentiation CD10

expression by stroma cells occurs in a frequency similar to that described in other types of carcinomas (18- 20, 22, 23). However, in contrast to some of these tumors (18, 19) proliferation of CD10 positive stromal cells in salivary carcinomas is not a cancer-specific modification and occurs in  $\alpha$ -SMA-negative fibrocytes. It is also of interest that the majority of our cases of salivary carcinomas with myoepithelial differentiation exhibited no myofibroblasts (i.e.,  $\alpha$ -SMA-positive fibrocytes) or few of them in the tumor-associated stroma. These data reinforce those recently reported in salivary carcinomas with myoepithelial differentiation arising in PA, where myofibroblasts were rarely seen as well (32). Based on the concept that the microenvironment is crucial for the maintenance of cellular functions, the tumor-associated stroma has been considered a potential target for cancer therapy (25, 31). In this line of reasoning, our findings suggest that in salivary carcinomas with myoepithelial differentiation inhibitors of CD10 expression rather than inhibitors of  $\alpha$ -SMA expression in myofibroblasts (31) might be more effective in cancer therapy.

The stromal expression of CD10 in tumors has been linked to aggressive biologic behaviors in some types of cancers, such as breast, colorectal, gastric, oral and nasopharyngeal carcinomas (18 - 22) but not in others as bladder carcinomas (23). In those with positive correlation, the expression of CD10 has been associated with increased lymph node metastasis, local recurrence and advanced clinical stage. Based on the fact that CD10 is structurally similar to metalloproteinase and stromelysin, it has been proposed that this enzyme could create a microenvironment that could facilitate cancer cell invasion and / or metastasis (18). In ACC (one of the most common malignancies in salivary glands with myoepithelial differentiation) no significant difference was found when lesions with and without CD10 positive stromal cells were compared regarding patient's gender, tumor location (minor versus major salivary gland), T classification (T1/T2 versus T3/T4), local recurrence and metastasis. Our findings indicate that in adenoid cystic

carcinomas expression of CD10 by tumor-associated stromal cells does not seem to accelerate tumor aggressiveness and cannot be used as a prognostic factor. Thus, the functional relevance of fibroblast CD10 expression in adenoid cystic carcinomas remains to be clarified.

In conclusion, in salivary tumors with myoepithelial differentiation, CD10 expression

can be detected in tumor as well as stroma cells. In the former only myoepithelial cells of EMECs show a significant CD10 expression allowing using this marker as a diagnostic tool. Regarding CD10 expression by stroma cells, in salivary glands it neither can be considered a cancer-specific phenotype nor seems to play an important role in tumor progression.

## REFERENCES

1. Saveria AT, Sloman A, Huvos AG, Klimtra DS. Myoepithelial carcinoma of the salivary glands. A clinicopathologic study of 25 patients. *AM J Surg Pathol* 2000; 24:761-74.
2. Reis-Filho JS, Schmitt FC. Taking advantage of basic research: p63 is a reliable myoepithelial and stem cell marker. *Adv Anat Pathol* 2002; 9:280-9.
3. Reis-Filho JS, Milanezi F, Silva P, et al. Masp1 expression in myoepithelial tumors of the breast. *Pathol Res Pract* 2001; 197:817-21.
4. Kovács A, Dhillon J, Walker RA. Expression of p-Cadherin, but not E-Cadherin or N-Cadherin, relates to pathological and functional differentiation of breast carcinomas. *Mod Pathol* 2003; 16:318-22.
5. Cheuk W, Chan JKC. Advances in salivary gland pathology. Review. *Histopathology* 2007; 51:1-20.
6. Skálová A, Jäkel KT. Myoepithelial carcinoma. In: Barnes L et al., editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck tumours*: Lyon, France: IARC Press; 2005 p.240-241.
7. Eveson JW, Kusafuka K, Stenman, Nagao T. Pleomorphic Adenoma. In: Barnes L et al., editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck tumours*: Lyon, France: IARC Press; 2005 p.240-241.
8. Nanus DM. Of peptides and peptidases: the role of cell surface peptidases in cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9:6307-9.
9. Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane associated enzymes:cutting is the key! *Blood* 1993; 82:1052-1070.
10. McIntosh GG, Lodge AJ, Watson P et al. NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol* 1999; 154:77-82.
11. Braun MP, Martin PJ, Ledbetter JA, Hansen JA. Granulocytes and cultured human fibroblasts express the common acute lymphoblastic leukemia antigens. *Blood* 1983; 61:718-25.
12. Chu P, Arber DA. Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma. *Am J Clin Pathol* 2000, 113:374-382.
13. Murali R, Delprado W. CD10 Immunohistochemical staining in urothelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 371-379.
14. Cohen AJ, Bunn PA, Franklin W, Magiel-Solc, Hartmann C, Helfuch B et al. Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer Res.* 1996; 56:831-839.
15. Göring B, Holzhausen HJ, Meye A, Heynemann H, Rebmann V, Langner J, Rioemann D. Endopeptidase

- 24.11/CD10 is down-regulated in renal cell cancer. *Int J Mol Med* 1998; 2:409-14.
16. Tawfic S, Niehans GA, Manivel JC. The pattern of CD10 expression in selected pathologic entities of the prostate gland. *Hum Pathol* 2003; 34:450-6.
  17. Bilalovic N, Sandstad B, Golouh R, Nesland JM, Selak I, Torlakovic EE. CD10 protein expression in tumor and stromal cells of malignant melanoma is associated with tumor progression. *Mod Pathol* 2004; 17:1251-8.
  18. Ywaya K, Ogawa H, Izumi M, Kurdoda M, Mukai K. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch* 2002; 440:589-93.
  19. Ogawa H, Iwaya K, Izumi M, Kuroda M, Serizawa H, Koyanagi Y, Mukai K. Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development. *Hum Pathol* 2002; 33:806-11.
  20. Huang WB, Zhou XJ, Chen JY, Zhang LH, Meng K, Ma HH et al. CD10 positive stromal cells in gastric carcinoma: correlation with invasion and metastasis. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35:245-50.
  21. Braham H, Trimeche M, Ziadis, Mestri S, Mokini M, Amara K et al. CD10 expression by fusiform stromal cells in nasopharyngeal carcinoma correlates with tumor progression. *Virchow Arch* 2006; 449:220-224.
  22. Piattelli A, Fioroni M, Iezzi G, Perrotti V, Stellini E, Piattelli M, Rubini C. CD10 expression in stromal cells of oral cavity squamous cell carcinoma: a clinic and pathologic correlation. *Oral Diseases* 2006; 12(3):301-304.
  23. Abdou AG. CD10 expression in tumor and stromal cells of bladder carcinoma: an association with bilharziasis. *APMIS* 2007; 115:1206-1218.
  24. Furuse C, Sousa SO, Nunes FD, Magalhães MH, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *Int J Surg Pathol* 2005; 13: 57-65.
  25. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extra-cellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2912-23.
  26. Moritani S, Kushima R, Sugihara H, Bamba M, Kobayashi TK, Hattori T. Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections. *Mod Pathol* 2002; 15:397-405.
  27. Seethala RR, Barnes EI, Hun JL. Epithelial-myoepithelial carcinoma: a review of the clinicopathologic spectrum and immunophenotypic characteristics in 61 tumors of the salivary glands and upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 44-57.
  28. Thompson LDR. Malignant Neoplasms of Salivary Glands. In:Goldblum JR, editor. *Head and Neck Pathology* (a volume in the Foundations in Diagnostic Pathology). Cleveland, Ohio. Elsevier, 2006, p: 321-70.
  29. Avery AK, Beckstead J, Renshaw AA, Corless CL. Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:203-10.
  30. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-9.
  31. De Wever O, Mareel M. Role of tissue in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003; 200:429-47.
  32. Araujo VC, Furuse C, Cury PR, Altamani A, Alves VAF, Araujo NS. Desmoplasia in different degrees of invasion of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Head and Neck Pathol* 2007; 1:112-17.

