



**HARIM TAVARES DOS SANTOS**

**GOTAS LIPÍDICAS INTRACITOPLASMÁTICAS EM  
CARCINOMAS DE GLÂNDULAS SALIVARES:  
ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO.**

**PIRACICABA**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**HARIM TAVARES DOS SANTOS**

**GOTAS LIPÍDICAS INTRACITOPLASMÁTICAS EM  
CARCINOMAS DE GLÂNDULAS SALIVARES:  
ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO.**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da  
UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em  
Estomatopatologia, na Área de Patologia.

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

Co-orientadora: Dra. Fernanda Viviane Mariano

Este exemplar corresponde à versão final da  
dissertação defendida por Harim Tavares dos Santos  
e orientada pela Profa. Dra. Albina Messias de  
Almeida Milani Altemani.

---

Assinatura da Orientadora

**PIRACICABA**

**2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

Santos, Harim Tavares dos, 1989-  
Sa59g Gotas lipídicas intracitoplasmáticas em carcinomas de glândulas salivares :  
estudo imunohistoquímico / Harim Tavares dos Santos. – Piracicaba, SP : [s.n.],  
2014.

Orientador: Albina Messias de Almeida Milani Altemani.  
Coorientador: Fernanda Viviane Mariano.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba.

1. Adenocarcinoma. 2. Lipogênese. 3. Diferenciação celular. 4. Proliferação  
celular. I. Altemani, Albina Messias de Almeida Milani, 1953-. II. Mariano, Fernanda  
Viviane, 1984-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Intracytoplasmic lipid droplets in salivary gland carcinomas :  
immunohistochemical study

**Palavras-chave em inglês:**

Adenocarcinoma

Lipogenesis

Cell differentiation

Cell proliferation

**Área de concentração:** Patologia

**Titulação:** Mestre em Estomatopatologia

**Banca examinadora:**

Albina Messias de Almeida Milani Altemani [Orientador]

Andresa Borges Soares

Pablo Agustin Vargas

**Data de defesa:** 25-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2014, considerou o candidato HARIM TAVARES DOS SANTOS aprovado.

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. ALBINA MESSIAS DE ALMEIDA MILANI ALTEMANI

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. ANDRESA BORGES SOARES

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS



## RESUMO

**Introdução:** Gotas lipídicas (GL) são organelas altamente reguladas envolvidas na ativação e metabolismo celular assim como em processos inflamatórios e neoplásicos. O aumento da lipogênese levando a um aumento no número de GL é um fenótipo comum a numerosos carcinomas humanos e tem sido associado com: diferenciação, proliferação e agressividade tumoral. **Objetivo:** Avaliarem carcinomas salivares: a) a frequência e quantidade das GLs citoplasmáticas, correlacionando-as com a morfologia tumoral, grau de diferenciação e proliferação celular e b) a expressão de proteínas relacionadas ao processo secretório celular (STAT5a e mamoglobina). **Material e métodos:** em 79 casos de carcinomas de glândulas salivares foram utilizados os anticorpos Ki-67, adipophilin, STAT 5a e mamoglobina. A quantificação da imunoreatividade ao adipophilin, STAT 5a e mamoglobina foi através de uma escala semi-quantitativa. A intensidade de marcação do STAT 5a e mamoglobina foi subjetivamente avaliada como fraca/moderada ou intensa. A positividade ao Ki-67 foi calculada através da relação entre o número de células positivas e o número total de células tumorais em três áreas selecionadas da amostra. **Resultados:** os subtipos histopatológicos que apresentaram positividade ao adipophilin em 50% ou mais das células, foram os casos: MASC (100%), CCA (85,64%), CM (83%), CDS (75%) e CSeb (50%). Índice de proliferação maior que 10% das células tumorais foi observado no CSeb (Ki-67 = 29%), seguido do CDS (Ki-67 = 23,11%) e do CM (Ki-67 = 12,15%). Nos casos de CAC com transformação para alto grau a área transformada apresentou maior proliferação e lipogênese quando comparada à área convencional. Somente os casos de MASC apresentaram imunorreatividade acentuada para STAT5a e mamoglobina. **Conclusões:** Embora exista correlação entre o acúmulo de gotas lipídicas e o índice proliferativo do tumor, em alguns tipos de carcinomas salivares tal depósito está possivelmente relacionado à diferenciação celular (CSeb e MASC) ou alteração metabólica (CCA). O acúmulo de GL refletindo diferenciação celular se apresenta como gotas maiores em contraste com as microgotas frequentemente detectadas nos carcinomas com alto índice proliferativo. No MASC a forte expressão de STAT5a e mamoglobina sugere que a que o acúmulo de GL possivelmente reflete diferenciação do tipo lactacional. Mais estudos são

necessários para entender o papel das gotas lipídicas citoplasmáticas em carcinomas de glândulas salivares. (*Apoio FAPESP: 2012/18104-4 e 2012/18086-6*).

**Palavras-chaves:** Adenocarcinoma. Lipogênese. Diferenciação celular. Proliferação celular.

## ABSTRACT

**Introduction:** Lipid droplets (LD) are highly regulated organelles involved in cell activation and metabolism as well as in inflammatory and neoplastic processes. Upregulated lipogenesis leading to an increased number of cytoplasmic LD is a common phenotype to numerous human carcinomas and has been associated with: differentiation, proliferation and aggressiveness of the tumor. **Objective:** to evaluate in salivary carcinomas: a) the frequency and quantity of cytoplasmic LDs, correlating it with tumoral morphology, differentiation grade and cellular proliferation and b) the expression of proteins associated with cellular secretory process (STAT5a and mammary globin). **Material and Methods:** in 79 cases of salivary gland carcinomas, an immunohistochemical study was performed with the antibodies Ki-67, adipophilin, STAT 5a and mammary globin. The positive neoplastic cells were assessed regarding quantity using a semi-quantitative scale. The intensity of expression for each antibody was subjectively evaluated as weak/ moderate or intense. The positivity for Ki-67 was calculated based on the relation between the number of positive cells and the total number of the tumoral cells in three selected areas. **Results:** the histopathologic subtypes that presented positivity for adipophilin in 50% or more of cells were: AciCC (85,64%), MASC (100%), MC (83%), SDC (75%), SebC (50%). Proliferation index higher than 10% of tumoral cells was observed in SebC (Ki-67 = 29%), SDC (Ki-67 = 23,11%) and MC (Ki-67 = 12,15%). In ACC with high grade transformation the transformed area presented both higher proliferation and lipogenesis when compared to the conventional area. Only the cases of MASC presented accentuated immunoreactivity for STAT5a and mammary globin. **Conclusions:** Although in salivary carcinomas there is correlation between the accumulation of lipid droplets and the proliferative index of the tumor, in some types of carcinomas such deposit is possibly related to cellular differentiation (SebC and MASC) or metabolic alteration (AciCC). The accumulation of LD that reflects cellular differentiation presents features of macro droplets in contrast to micro-droplets frequently detected in carcinomas with high proliferative index. In MASC, the strong expression of STAT5a and mammary globin suggests that LD accumulation is probably due to lactational-like differentiation. More studies are necessary to understand

the role of cytoplasmic lipid droplets in salivary gland carcinomas (Supported by FAPESP: 2012/18104-4 and 2012/18086-6).

**Key-words:** Adenocarcinoma. Lipogenesis. Cell differentiation. Cell proliferation.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	xi
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	6
2.1 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau.....	6
2.2 Carcinoma adenóide cístico.....	7
2.3 Carcinoma de células acinares.....	10
2.4 Carcinoma epitelial-mioepitelial.....	12
2.5 Carcinoma mioepitelial.....	13
2.6 Carcinoma mucoepidermóide.....	15
2.7 Carcinoma do ducto salivar.....	16
2.8 Carcinoma sebáceo.....	18
2.9 Carcinoma secretor análogo da mama.....	19
2.10 Carcinomas de glândulas salivares com transformação para alto grau.....	21
<b>3. PROPOSIÇÕES</b> .....	23
3.1 Geral	
3.2 Específicas	
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1 Grupo de Estudo.....	24
4.2 Avaliação histológica e Tissue Micro Array.....	24
4.3 Técnica de imunohistoquímica.....	25
4.4 Avaliação imunohistoquímica.....	26
A) Avaliação das células positivas	
B) Quantificação dos anticorpos	
4.5 Aspectos Éticos.....	27
<b>5. RESULTADOS</b> .....	28
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	41

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>53</b>

## DEDICATÓRIA

À minha mãe Ivanira e ao meu pai Francisco, por toda uma vida de amor e dedicação a mim e meus irmãos.

Aos meus irmãos Hanan, Hannah e Maria de Fátima por todos os momentos de fraternidade.

Aos demais familiares e amigos de minha cidade natal (Aracaju).

A todos os amigos e amigas que conheci nesta minha nova vida em São Paulo, em especial a Alexandre e toda sua família.

À Dra Albina que me deu oportunidades tão importantes neste meu início de vida acadêmica.



## AGRADECIMENTOS

A Deus por abençoar os meus passos sempre.

À vida que minha mãe e pai dedicaram a mim e meus irmãos para mostrar a importância da educação.

À Dra Albina por todo o apoio e aprendizagem que tem me dado durante o mestrado. Eu aprendi a aprender com ela e a perceber que a educação pode realmente abrir muitas portas (obrigado por me ajudar a estudar no México). Muito obrigado por tudo!

Ao Prof Adalberto Mosqueda pela grande oportunidade me dada para aprender na instituição na qual ele é professor. Ele e sua equipe de professores e alunos são excelentes.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em especial aos dois docentes com quem tive mais contato devido a Histopatologia: Prof Oslei Paes Almeida e Prof Pablo Vargas.

Aos colegas da FOP-UNICAMP, em especial: Fernanda Moreira e as Chicas (Alicia, Katya, Marisol).

À equipe de alunos, professores e funcionários do HC-UNICAMP, a saber: aos colegas Victor Montalli, Erika Egal, Ana Costa, Letícia Fogagnolo, Camila Concha. À Fernanda Mariano (co-orientadora) de minha dissertação pelo trabalho nas diversas correções desta dissertação, entre outras atividades. Às técnicas Luzia e Cláudia pelos trabalhos imunohistoquímicos, entre outros. A Dra Letícia pela dedicação na explicação de casos por mim levados a ela.

À Instituição UNICAMP por me mostrar que realmente existem pessoas que dedicam sua vida à Ciência.

À FAPESP pela concessão da bolsa (Processo: 2012/18104-4) e auxílio (Processo: 2012/180086-6) para a realização do projeto.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADPR - *Adipose differentiation-related protein* = Proteína relacionada a diferenciação adiposa

APBG - Adenocarcinoma Polimórfico de Baixo Grau

CAC - Carcinoma Adenóide Cístico

CCA - Carcinoma de Células Acinares

CDS - Carcinoma do Ducto Salivar

CEA - *Carcinoembryonic antigen* = Antígeno carcino-embrionário

CEME - Carcinoma Epitelial Mioepitelial

CM - Carcinoma Mioepitelial

CME - Carcinoma Mucoepidermóide

CSeb - Carcinoma Sebáceo

EMA - *Embryonic membrane antigen* = Antígeno da membrana epitelial

FAS- *Fatty acid synthase* = Ácido graxo sintase

FISH - *Fluorescence in situ hybridization* = Hibridização fluorescente in situ

GCDFP - *Gross cystic disease fluid protein* = Proteína líquida da doença cística macroscópica

GFAP - *Glial fibrillary acidic protein* = Proteína glial fibrilar ácida

GL - Gota Lipídica

HHF35 - Actina músculo específica

MASC - *Mammary analogue secretory carcinoma* = Carcinoma Secretor Análogo da Mama

PAS- *Periodic acid schiff* = Ácido periódico de Schiff

PCR - *Polymerase chain reaction* = Reação em cadeia da polimerase

STAT5a - *Signal transducer and activator of transcription* = Transdutores de sinal e ativadores de transcrição

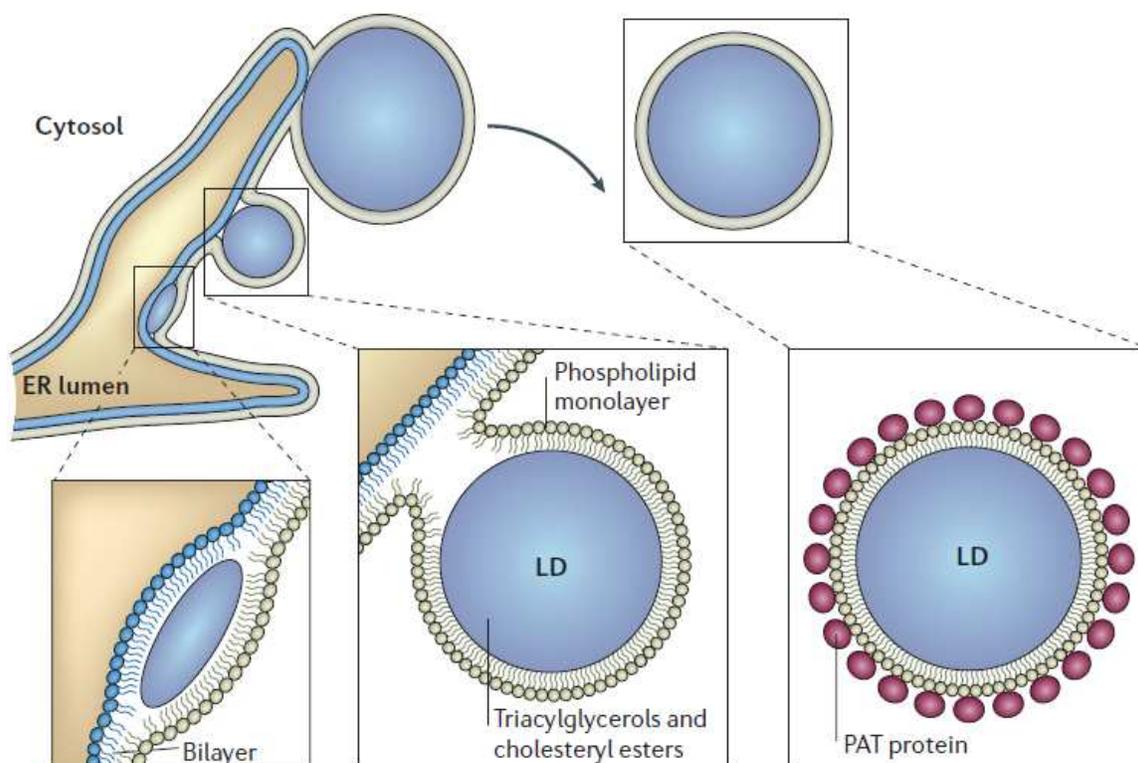
TMA - *Tissue Micro Array* = Microbanco de tecidos

## 1 INTRODUÇÃO

Os organismos armazenam lipídios quando em excesso com o objetivo de posterior uso na falta de nutrientes. Em mamíferos, o tecido adiposo desempenha este papel de armazenamento, mas vale ressaltar que todas as células, sejam elas eucarióticas ou procarióticas, podem armazenar lipídios em estruturas intracelulares denominadas gotas lipídicas (GLs) (Ducharme & Bickel, 2008). Entretanto, as GLs intracitoplasmáticas não são meros estoques energéticos. Há crescente evidência que as GLs são organelas dinâmicas e multifuncionais, que participam da síntese de fosfolipídios e sinalização intracelular (Bozza & Viola, 2010). Além disso, podem atuar na expressão gênica desempenhando papéis de ligantes para receptores nucleares e como abrigo temporário de proteínas específicas, levando a diminuição dos seus níveis quando não são necessárias ou desejáveis no local onde funcionam (Mishra, 2005; Welte, 2007).

As GLs, cuja origem é no retículo endoplasmático, são constituídas por um centro rico em lipídios neutros e recobertas por uma camada única de fosfolípidos e vários tipos de proteínas. A cobertura protéica é variada e composta por proteínas com funções diversas, entre as quais se inclui a coordenação do metabolismo das GLs (Murphy, 2001; Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Bozza *et al.*, 2007). A principal família de proteínas das GLs é a PAT, que engloba a proteína perilipin (membro inicial), além da TIP47, S3-12, OXPAT e da adipophilin (**Figura 1**). Estas proteínas são originadas no próprio retículo endoplasmático ou em ribossomos livres no citoplasma da célula (Robenek *et al.*, 2005). Embora as proteínas desta família apresentem semelhança na sequência de seus aminoácidos, elas podem desenvolver funções diferentes, podendo ser constitutivas (perilipin, adipophilin) ou serem produzidas em resposta a estímulos lipogênicos ou lipolíticos (Brasaemle, 2007). Sob condições de normalidade existe a prevalência da família perilipin, porém quando as culturas de adipócitos são incubadas com ácidos de cadeia longa, uma nova variedade de proteínas circunscreve a periferia das células, por exemplo, S3-12 e TIP47 (Wolins *et al.*, 2003; Wolins *et al.*, 2005). Deve-se ressaltar que a adipophilin (também denominada de ADPR - *adipose differentiation-related protein*), é a principal proteína das GLs, estando presente, inclusive, em diferentes tipos de células não adiposas dos mamíferos, dentre elas: epiteliais mamárias, células de Sertoli, células de

Leydig e ainda células da zona fasciculada da glândula adrenal (Heid *et al.*, 1998). O adipophilin desempenha papel importante na entrada de ácidos graxos e colesterol e no armazenamento de lipídios neutros (Brasaelme, 2007). Quando comparada com outras proteínas da família PAT, o adipophilin apresenta além de maior sensibilidade, uma alta especificidade para detecção de GLs intracitoplasmáticas (Muthusamy *et al.*, 2006).



**Figura 1** - No retículo endoplasmático, lipídeos neutros são produzidos e cobertos por uma camada de fosfolipídeos e proteínas. Por fim, estas GLs saem do retículo endoplasmático com uma organela independente.

Fonte: Martin & Parton, 2006.

O acúmulo de gotas lipídicas (evidenciado pelo marcador adipophilin) pode representar atividade lipogênica (metabolismo) e diferenciação celular adiposa e secretória (por exemplo, secreção sebácea ou lactacional). A formação de gotas lipídicas no epitélio alveolar mamário tem sido observada como um sinal precoce de lactogênese e, por conseguinte, seu aumento no tamanho (grandes gotas lipídicas) é considerado a alteração histológica marcante do início da lactação (Liu *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2007). Gotas

de gordura do leite são rodeadas por um complexo de membrana do qual adipophilin é um dos maiores componentes (Peterson *et al.*, 2001; Cebo *et al.*, 2010). Devido à similaridade morfológica e imunohistoquímica entre glândula salivar e mamária, a atividade lactacional e secretória nos tumores salivares poderia ser investigada com auxílio de marcadores expressos nestes processos, a citar: STAT5a (*signal transducer and activator of transcription*) e mamoglobina. STAT5a é modulada por citocinas e hormônios, sendo importante na produção de diversas proteínas (Ihle *et al.*, 1995). Na mama humana, o STAT5a é observado na unidade ductal lobular terminal e grandes ductos (Strauss *et al.*, 2006). Esta expressão não é detectada no carcinoma ductal usual, mas ainda pode ser vista no carcinoma secretor da mama, levando a hipótese que o STAT5a é necessário para a manutenção de um estado secretor na mama humana. Interessantemente, na glândula salivar, o carcinoma secretor análogo da mama também apresenta expressão forte de STAT5a (Skálová *et al.*, 2010). A mamoglobina é uma proteína secretora que apresenta um aumento na sua expressão em carcinomas mamários (usual e tipo carcinoma secretor), endometriais, sudoríparos e salivares (Bhargava *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007; Skálová *et al.*, 2010). Entre os tumores salivares, a mamoglobina foi estudada particularmente no carcinoma secretor análogo da mama, onde é fortemente expressa (Skálová *et al.*, 2010). Nas outras lesões salivares malignas e benignas a expressão de mamoglobina foi pouco investigada e apenas em pequenas séries de tumores (Bhargava *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007). Na literatura, não há estudos que avaliem expressão de mamoglobina, STAT5a e adipophilin (proteínas relacionadas a atividade secretória) numa larga série de carcinomas salivares.

Sabe-se que diversas proteínas associadas às GLs desempenham um papel na inflamação, oncogênese e metástase, entre elas: ERK1, ERK2, p38, PKC, PI3K e caveolina (Yu *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000; Pol *et al.*, 2001; Fujimoto *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2004; Bozza & Viola, 2010). Desde o início do século passado, é reconhecido que o metabolismo da célula cancerosa difere daquele da célula normal, conferindo-lhe vantagens na sobrevivência. A primeira alteração metabólica demonstrada nas células cancerosas foi o aumento da glicólise anaeróbica, permitindo-lhes sobrevivência no microambiente hipóxico decorrente do crescimento tumoral. Mais recentemente, detectou-

se que o aumento da lipogênese também é um fenótipo comum a vários carcinomas humano e inclusive, associada com prognóstico pobre em alguns deles (Swinnen *et al.*,2006; Kuhajda, 2006). A alteração do metabolismo lipídico nas células cancerosas reflete-se no aumento da atividade de enzimas lipogênicas, culminando com o acúmulo de lipídios sob a forma de GLs citoplasmáticas (Bozza & Viola, 2010).

Entretanto, a frequência e função das GLs nas células cancerosas ainda são pouco conhecidas. Em vários tipos de carcinomas, tais como de cólon, renal e hepático tem sido encontrado aumento do número das GLs citoplasmáticas nas células cancerosas, quando comparadas ao tecido normal (Swinnen *et al.*,2006). Nas células do carcinoma de cólon foi demonstrado que as GLs são organelas funcionalmente ativas, que compartimentam e amplificam a síntese de eicosanóides (Bozza & Viola, 2010). Os eicosanóides são uma família de lipídeos sinalizadores derivados do ácido aracdônico que controlam a apoptose e outros importantes processos celulares como proliferação, migração e ativação (Yaqoob, 2003; Wymann *et al.*, 2008). Conseqüentemente, as GLs poderiam ter implicação potencial nos mecanismos de proliferação e diferenciação celular (Accioly *et al.*, 2008). Neste sentido, em carcinomas renais de células claras, que contem abundantes lipídeos e colesterol no citoplasma, observou-se que a expressão de ADPR/adipophilin se correlacionava com o grau de diferenciação tumoral. Nos casos de baixo grau histológico, a expressão de ADPR/adipophilin era alta, enquanto que nos tumores indiferenciados, com componentes pleomórfico/fusocelular, a expressão estava diminuída, assim como em lesões metastáticas. Ainda, pacientes com carcinoma renal de células claras contendo níveis mais altos de ADPR-mRNA apresentaram sobrevida significativamente melhor, sugerindo que esta expressão pode fornecer informações prognósticas úteis (Yao *et al.* 2005; Yao *et al.*, 2007).

É descrita e conhecida a presença de depósitos lipídicos intracelulares em alguns tipos de carcinomas de glândulas salivares. Entre os subtipos histopatológicos, estão os que apresentam diferenciação sebácea, seja ela proeminente tais como: carcinoma sebáceo, linfadenocarcinoma sebáceo e em menor quantidade: carcinomas mucoepidermóide, epitelial-mioepitelial e adenóide cístico (Gnepp, 1983). De um modo geral, as células ricas em lipídeos citoplasmáticos (sejam de origem sebácea ou outra)

apresentam-se morfológicamente com citoplasma claro/vacuolizado nas secções advindas de material incluído em parafina, devido remoção lipídica pelo xilol, usado no processamento tecidual. As células claras não sebáceas em carcinomas de glândulas salivares podem ser predominantes no tumor, como por exemplo, no carcinoma de células acinares, mucoepidermóide, epitelial-mioepitelial e mioepitelial (Ellis *et al.*, 1996). Destes subtipos, apenas no carcinoma de células acinares há relato de presença de lipídeos intracitoplasmáticos através de estudos ultraestruturais (Chaudhry *et al.*, 1986). Entretanto, deve-se considerar que, até recentemente, a detecção de lipídeos intracelulares só era possível em material fresco usando corantes específicos (por exemplo, Sudan-Black e Oil Red) ou em estudos ultraestruturais. O desenvolvimento e posterior comercialização de anticorpos que detectam proteínas da cobertura lipídica das GLs permitiram a identificação destas estruturas em material parafinado (Muthusamy *et al.*, 2006).

A ausência de estudos que analisem a frequência de GLs citoplasmáticas em carcinomas de glândulas salivares e sua possível associação com a morfologia tumoral, grau de diferenciação e proliferação celular estimulou-nos a essa investigação, utilizando a técnica imunohistoquímica com o anticorpo anti-adipophilin em material parafinado. Para tanto, os tipos histopatológicos selecionados para o estudo apresentam alguma das seguintes características: carcinomas com diferenciação sebácea, carcinomas que apresentam células claras, carcinomas de baixo e alto grau e carcinomas com transformação para alto grau.

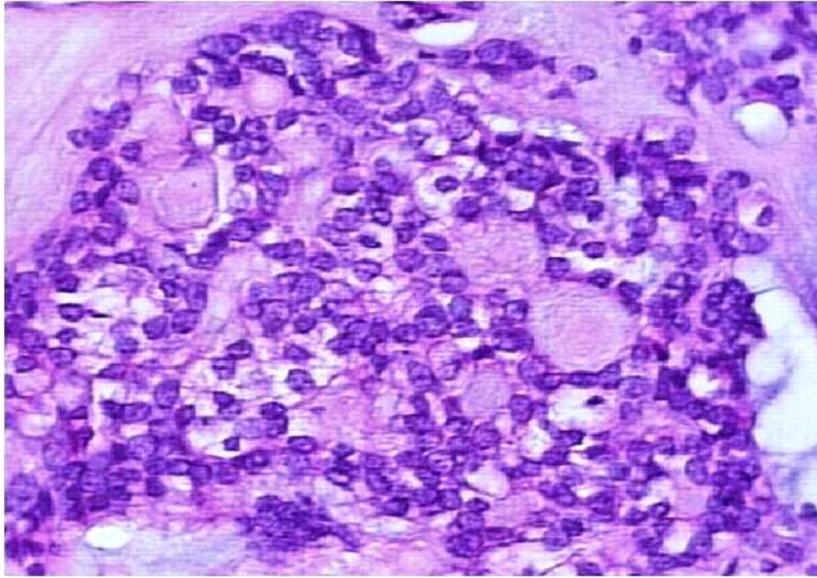
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Para revisão dos tipos histopatológicos de carcinomas de glândulas salivares, principalmente quanto às características morfológicas e de prognóstico, apresentamos um resumo dos utilizados neste estudo.

### 2.1 Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo-Grau

O Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG) é uma neoplasia epitelial maligna caracterizada por uniformidade citológica, diversidade morfológica e padrão infiltrativo (Luna & Wenig, 2005). Representa 7,4% dos tumores de glândula salivar e 19,6% entre as neoplasias malignas. Apresenta predileção pelo gênero feminino e maior ocorrência na meia idade (Waldron *et al.*, 1988). Surge como massa no palato em cerca de 60% dos casos, seguida por outros locais de glândulas salivares menores.

Macroscopicamente observa-se uma massa de formato redondo a oval recoberta por mucosa geralmente íntegra. O tamanho varia de 1,0 a 6,0 cm (Wenig & Gnepp, 1991). Microscopicamente os aspectos característicos do APBG são diversidade morfológica, uniformidade citológica e crescimento infiltrativo. Citologicamente são vistas células isomórficas com núcleo ovóide a fusiforme geralmente com cromatina vesicular, e nucléolo pequeno e imperceptível (**Figura 2**). O citoplasma geralmente é eosinofílico a anfofílico, sendo que os limites celulares são pouco distintos (Wenig & Gnepp, 1991). Observa-se que os padrões sólido, trabecular, ductal e tubular são geralmente os predominantes. Caracteristicamente são observadas pequenas estruturas tubulares revestidas por uma camada única de células cubóides. Invasão perineural e perivascular também podem ser encontradas (Ellis *et al.*, 1996). O estroma mostra-se acentuadamente eosinofílico e hialinizado ou com uma matriz azulada mucohialina (Araújo *et al.*, 1999).



**Figura 2** - Adenocarcinoma polimorfo de baixo-grau. Observar a uniformidade citológica com células isomórficas (H&E 400x).

O perfil imunohistoquímico do APBG mostra uma positividade a citoqueratina 7, mas negatividade a citoqueratina 20 (Nikitakis *et al.*, 2004). Além disso, apresenta imunoreatividade a EMA (*embryonic membrane antigen*) e proteína S-100 (Anderson *et al.*, 1990). Alguns diagnósticos diferenciais do APBG são: adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico (Wenig & Gnepp, 1991).

A taxa de sobrevivência dos pacientes é excelente. Metástases à distância e mortes associadas à doença são raras (Castle *et al.*, 1999). As taxas de recorrências estão entre 17% e 24%. Além disso, a ocorrência de metástase não é comum, afetando cerca de 9% dos pacientes (Kelsch *et al.*, 1997).

## **2.2 Carcinoma Adenóide Cístico**

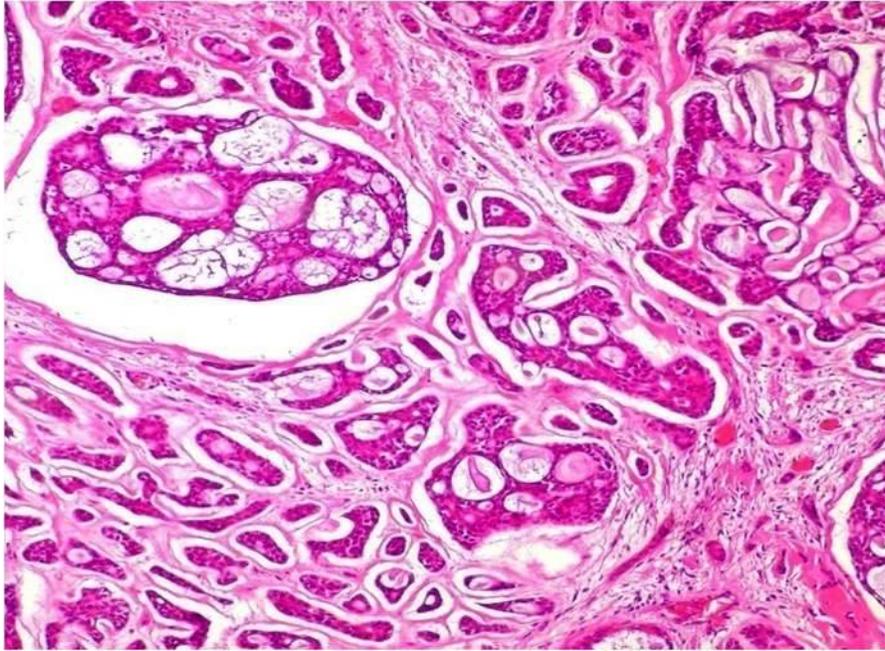
O Carcinoma adenóide cístico (CAC) é caracterizado por células epiteliais e mioepiteliais arranjadas em diversos padrões morfológicos (El-Naggar & Huvos, 2005). Representa cerca de 7,5% de todas as neoplasias malignas salivares epiteliais e 4% de todos os tumores epiteliais de glândula salivar. Quanto à distribuição anatômica, afeta principalmente a glândula parótida, seguida pela submandibular e pelas menores, atingindo

principalmente pacientes de meia idade, sem predileção por gênero na maioria dos casos relatados (Matsuba *et al.*, 1984; Ellis *et al.*, 1996).

Ao exame clínico observa-se um aumento de volume de crescimento lento. Geralmente ocorre dor ou sensibilidade, podendo haver também ulceração ou fixação a estruturas adjacentes (Tomich, 1991).

Macroscopicamente apresenta-se como massa razoavelmente bem definida, sem cápsula que mostra tipicamente infiltração para tecidos adjacentes. Histologicamente, são observadas células uniformes em tamanho e forma com núcleo basofílico e citoplasma escasso. Arquiteturalmente observam-se três padrões morfológicos, citados em ordem decrescente de ocorrência: cribiforme, tubular (**Figura 3**) e sólido (Tomich, 1991). Ressalta-se que todos os padrões histopatológicos podem ser identificados na maioria dos tumores (Perzin *et al.*, 1978)

No primeiro tipo, cribiforme, são detectadas nas ilhas epiteliais neoplásicas estruturas pseudocísticas que normalmente contêm material eosinofílico e/ou basofílico, apresentando aspecto de “queijo-suíço”. No padrão tubular, as células tumorais arranjam-se em pequenos ninhos que são separados um dos outros e ainda, delimitam espaços pseudocísticos revestidos internamente por células ductais circundados externamente por células mioepiteliais. Já na variante sólida, as células neoplásicas (mioepiteliais em sua maioria) organizam-se em agregados com formato e tamanho variável nos quais espaços pseudocísticos são poucos ou ausentes. (Gnepp, 1983; Ellis *et al.*, 1996). Uma característica microscópica importante, mas não única do CAC, é o neurotropismo por nervos periféricos (Tomich, 1991). Este tumor ainda pode ser caracterizado por uma diferenciação sebácea (Gnepp, 1983; Ellis *et al.*, 1996).



**Figura 3** - Carcinoma adenóide cístico com padrão cribiforme e tubular (H&E 200x).

O perfil imunohistoquímico do CAC mostra que as células ductais expressam CEA (*carcinoembryonic antigen*), EMA e citoqueratina. As células mioepiteliais mostram positividade para actina músculo específica (HHF35)(Chen *et al.*, 1988).

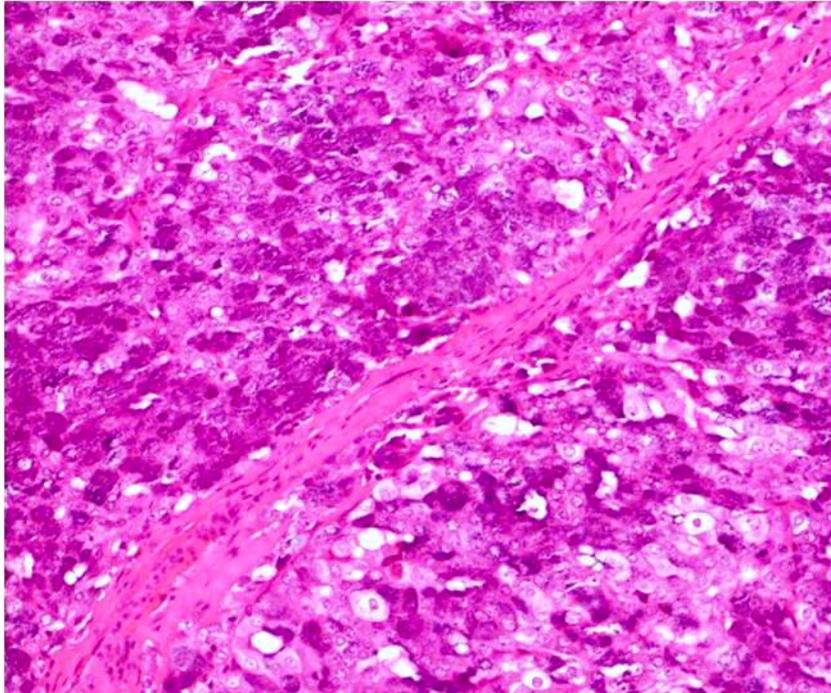
Alguns diagnósticos diferenciais do CAC são: adenocarcinoma sem outra especificação, carcinoma epitelial-mioepitelial, APBG, carcinoma do ducto salivar, adenoma pleomórfico, carcinoma ex adenoma pleomórfico, adenoma canalicular, adenoma de células basais (Tomich, 1991).

Quanto ao prognóstico, foi observado que a taxa de sobrevida em períodos de 10 a 15 anos é pobre e caracterizada pela ocorrência de múltiplas recidivas e metástases (Perzin *et al.*, 1978; Szanto *et al.*, 1984). De acordo com o Conley & Dingman (1974) a taxa de recorrência e metástase foi similar: 42% e 44%, respectivamente. Os índices de sobrevida em 5, 10, 15 e 20 anos foram de 88,2%, 47,5%, 42,8% e 20%, respectivamente. Ainda, parece existir uma relação entre padrão histopatológico e o curso clínico do CAC (Perzin *et al.*, 1978). Nascimento *et al.* (1986), encontraram diferentes taxas de sobrevida em 5 anos de acordo com os padrões cribriforme (52,3%), tubular (33,3%) e sólido (13,3%).

### **2.3 Carcinoma de Células Acinares**

O Carcinoma de Células Acinares (CCA) é uma neoplasia maligna epitelial na qual pelo menos uma parte das células neoplásicas apresenta uma diferenciação em ácinos serosos (Ellis *et al.*, 1996). Representa a 5<sup>o</sup> neoplasia maligna de glândula salivar mais comum (Fonseca *et al.*, 2012). Afeta ampla faixa etária, com predileção pelo gênero feminino. Quanto à localização, a grande maioria ocorre nas glândulas salivares maiores, com a glândula parótida representando 83% do total de casos e a glândula submandibular correspondendo a 4% (Ellis *et al.*, 1996). Clinicamente, observa-se uma massa de crescimento lento, com dimensão inferior a 3cm de diâmetro, podendo ou não ser relatada a ocorrência de dor (Ellis & Corio, 1983).

Macroscopicamente, a lesão apresenta-se nodular, bem circunscrita, cuja consistência pode ser amolecida ou firme podendo apresentar-se por vezes cística ou sólida (Ellis & Auclair, 1991). O CCA apresenta uma grande variedade arquitetural e citológica. Microscopicamente os padrões de crescimento são classificados em sólido, microcístico, papilar-cístico e folicular. As células neoplásicas originadas dos ácinos serosos das glândulas salivares (**Figura 4**), caracteristicamente organizam-se em camadas de grandes células poligonais, com citoplasma granular, uniforme e levemente basofílico, com um núcleo arredondado e excêntrico (Batsakis *et al.*, 1990; Ellis *et al.*, 1996). Outros tipos celulares que podem ser encontrados no CCA são: vacuolado, claro, aspecto de ducto intercalado (núcleo pequeno, escuro e central e citoplasma anfófilico) e inespecífico (bordos celulares indistintos, formando sincícios). Lipídeos intracitoplasmáticos já foram descritos na literatura através de estudos ultraestruturais (Chaudhry *et al.*, 1986; Ellis *et al.*, 1996).



**Figura4** - Carcinoma de células acinares. Notar células ricas em grânulos de zimogênio intracitoplasmático (H&E 200x).

O perfil histoquímico revela que o PAS (*periodic acid schiff*) é importante para identificação de diferenciação acinar e dos mucopolissacarídeos que podem ocorrer nos espaços císticos. As colorações de mucicarmim e alcian blue são geralmente negativas, podendo apresentar positividade apenas nas áreas císticas, microcísticas e vacuoladas (Ellis & Auclair, 1991). Quanto à imunohistoquímica, foi observada reatividade a citoqueratina, transferrina, lactoferrina, alpha-1-antitripsina, alpha-1-antiquimotripsina, IgA, CEA, antígeno Leu-M1, e amilase (Hunter *et al.*, 1983; Stanley *et al.*, 1988).

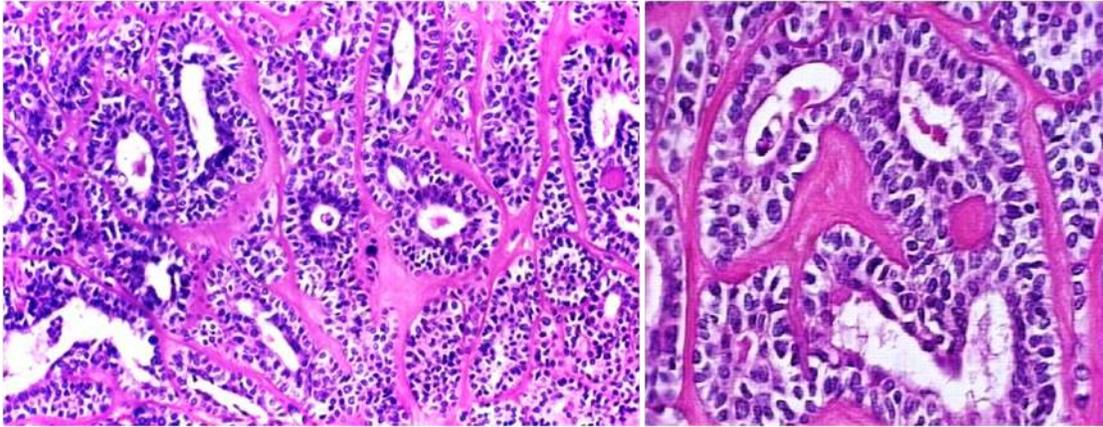
Quanto aos diagnósticos diferenciais, algumas lesões que podem levar a um diagnóstico equivocado de CCA são: cistadenocarcinoma, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma metastático de tireóide, APBG, carcinoma epitelial-mioepitelial, adenocarcinoma de células claras, carcinoma metastático renal (Ellis *et al.*, 1996). Atualmente, uma lesão que entrou para essa lista de diagnósticos diferenciais é o carcinoma secretor análogo da mama (Skálová *et al.*, 2010)

Com relação ao prognóstico, 35% apresentam recorrência e outros 16% mostram metástase e morte. As recorrências são mais prováveis de ocorrerem dentro dos 5 primeiros anos após a ressecção do tumor primário (Guimarães *et al.*, 1989), enquanto que a ocorrência de metástase pode ser constatada vários anos depois do tratamento inicial (Lewis *et al.*, 1991). Segundo Chiosea *et al.* (2012) a média sobrevida é de aproximadamente 10 anos.

#### **2.4 Carcinoma Epitelial-Mioepitelial**

O Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEME) é caracterizado por morfologia bifásica, ou seja: epitelial ductal e diferenciação mioepitelial (Fonseca & Soares, 2005). Representa cerca de 1% das neoplasias de glândula salivares, ocorrendo especialmente na parótida (mais de 70% dos casos), seguida pelas glândulas submandibulares e menores, em frequências aproximadamente iguais (Ellis *et al.*, 1996). É observada predileção pelo gênero feminino, principalmente em pacientes na 6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> décadas de vida (Cho *et al.*, 1995). Clinicamente é observado um aumento de volume assintomático ou doloroso em alguns casos (Corio *et al.*, 1982; Luna *et al.*, 1985).

Macroscopicamente, apresenta-se geralmente como uma massa firme, bem circunscrita, lobulada com 2 a 8 cm de diâmetro no momento do diagnóstico (Corio *et al.*, 1982; Luna *et al.*, 1985). Microscopicamente, a dupla população celular, epitelial e mioepitelial, apresentam características morfológicas e distribuições distintas. As células epiteliais delimitam as luzes nas estruturas ductais, podendo ser cúbicas ou colunares, apresentando citoplasma eosinófilo. As células mioepiteliais circundam as células epiteliais e possuem citoplasma amplo e claro, com núcleo arredondado e cromatina clara (**Figura 5**). Os padrões de crescimento pode ser: sólido, cístico e papilar (Ellis *et al.*, 1996). Este tipo histológico também pode apresentar diferenciação sebácea (Gnepp, 1983).



**Figura 5** – Carcinoma epitelial-mioepitelial. Observar a dupla população celular, sendo as células mioepiteliais claras e dispostas externamente nas estruturas ductais (H&E 200x, à esquerda; 400x, à direita).

Quanto à marcação histoquímica, pela análise do PAS antes e depois da digestão com diástase, observa-se que as células claras possuem glicogênio (Ellis et., 1996) e a avaliação da neoplasia pela coloração de mucicarmim demonstra que tanto as células ductais quanto as não ductais não apresentam mucina (Corio, 1991). O perfil imunohistoquímico mostra positividade das células claras para marcadores mioepiteliais (actina músculo liso, HHF35, p63 e/ou calponina), já as células ductais são positivas para citoqueratina (Fonseca & Soares, 2005).

Os diagnósticos diferenciais do CEME incluem neoplasias como adenoma pleomórfico, CCA, CAC, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma sebáceo e oncocitoma (Corio, 1991).

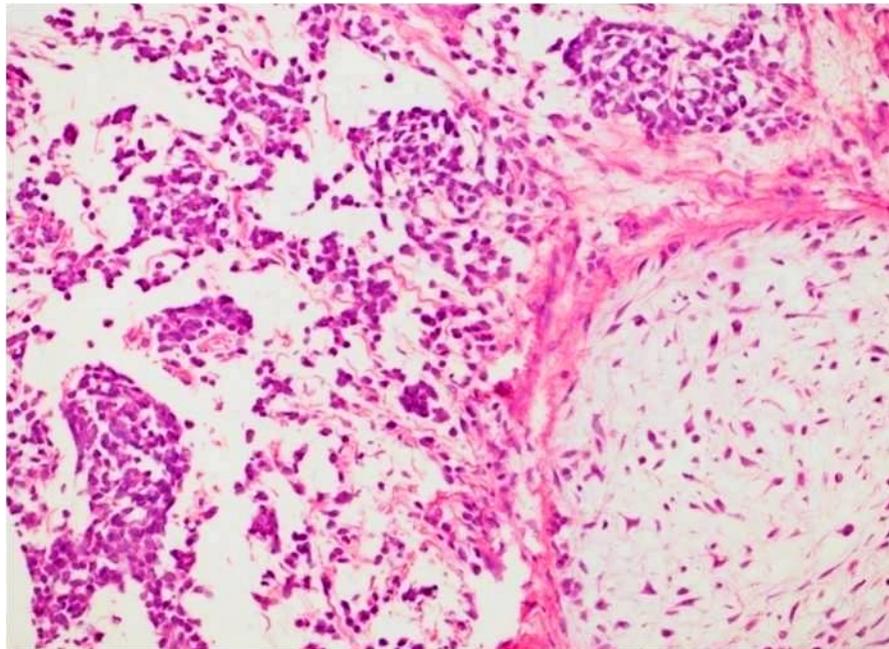
Segundo estudo de Fonseca & Soares (1993), a taxa de metástase é de 35% e a de recorrência 40%. A sobrevida dos pacientes em 5 anos é de 80% e em 10 anos é de 72%.

## **2.5 Carcinoma Mioepitelial**

O Carcinoma Mioepitelial (CM) representa uma neoplasia de glândula salivar composta principalmente por células neoplásicas com diferenciação mioepitelial (Skálová & Jäkel, 2005). Indivíduos de diversas idades podem ser afetados, sendo a média de idade 55 anos, sem predileção por gênero. É uma lesão incomum que representa menos de 2%

dos carcinomas de glândula salivar, afetando principalmente a glândula parótida (75% dos casos), seguida pelas glândulas salivares menores e depois pela submandibular. Clinicamente, caracteriza-se geralmente por uma massa assintomática (Ellis *et al.*, 1996; Saveria *et al.*, 2000).

Microscopicamente, diversos tipos de células podem ser encontradas, a saber: fusiformes, plasmocitóides, claras e epitelióides, podendo haver uma mistura delas (**Figura 6**). Diferenciação sebácea e/ou escamosa também pode estar presente. Caracteristicamente é observado um padrão de crescimento infiltrativo e ocasionalmente são observadas estruturas ductais (Ellis *et al.*, 1996). Segundo Saveria *et al.* (2000), essa neoplasia apresenta imunoreatividade para citoqueratina, vimentina, S-100, actina músculo liso, calponina, actina músculo específico, GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), CEA e EMA.



**Figura 6** - Carcinoma Mioepitelial composto por uma mistura de células plasmocitóides e epitelióides (H&E 200x).

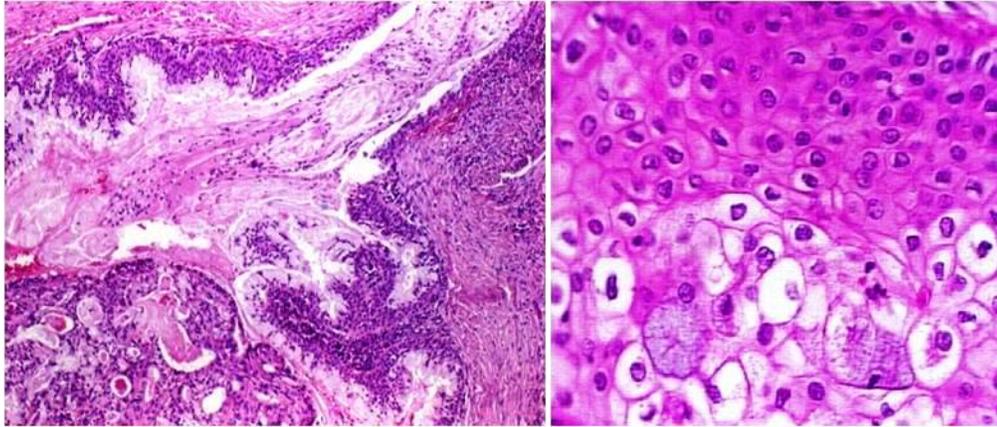
Existem diversas neoplasias que fazem diagnóstico diferencial com o CM, dentre as quais estão: mioepitelioma, leiomiosarcoma, fibrosarcoma, schwannoma maligno, sarcoma sinovial, histiocitoma fibroso maligno, melanoma maligno amelanótico metastático (Ellis *et al.*, 1996).

Em um estudo, observou-se que 47% dos pacientes desenvolveram metástase, e 29% morreram da neoplasia (Savera *et al.*, 2000). Cerca de um terço dos pacientes apresentam recorrência (Skálová & Jäkel, 2005). Portanto, o CM é uma neoplasia agressiva que exibe diferentes resultados clínicos (Skálová & Jäkel, 2005).

## **2.6 Carcinoma Mucoepidermóide**

O Carcinoma mucoepidermóide (CME) é a neoplasia maligna mais comum de glândula salivar composta por três tipos de células: mucosas, intermediárias e epidermóides (El-Naggar & Huvos, 2005). A idade média dos pacientes é de 45 anos, com predileção pelo gênero feminino. Quanto aos locais acometidos, em ordem decrescente de frequência estão as glândulas parótida, submandibular, menores e sublingual. Ao exame clínico, quando presente nas glândulas salivares maiores, apresenta-se como aumento de volume indolor solitário, enquanto que quando afeta as glândulas salivares menores, a aparência clínica é variada podendo fazer diagnóstico diferencial com condições inflamatórias e neoplasias benignas (Ellis *et al.*, 1996).

Macroscopicamente, podem ser observadas cavidades císticas com conteúdo mucóide (Auclair & Ellis, 1991). Microscopicamente, os três tipos celulares (células mucosas, epidermóides e intermediárias) apresentam-se em proporções variadas (**Figura 7**). Por vezes, as células epidermóides podem se apresentar morfológicamente como células claras, colunares, oncócicas ou com diferenciação sebácea. Existem padrões de crescimento císticos, sólidos, papilíferos, entre outros. O CME pode ser classificado em três graus: baixo (mitoses raras, espaços císticos em mais de 20% de todo tumor, núcleos brandos), intermediário (características intermediárias entre o baixo e alto grau), alto (componente cístico menor que 20%, 4 ou mais figuras mitóticas em aumento de campo de 10x, invasão neural, necrose, anaplasia celular) (Gnepp, 1983; Ellis *et al.*, 1996). Quanto à histoquímica, pode ser evidenciada mucina através de mucicarmim e alcian blue. Imunohistoquimicamente, pode haver positividade para citoqueratina, EMA e p63 (Foschini *et al.*, 2002).



**Figura 7** - Carcinoma mucoepidermóide: à direita, detalhe da composição celular, com células intermediárias e mucosas; à esquerda, com área cística (H&E 100x, à esquerda; 400x, à direita).

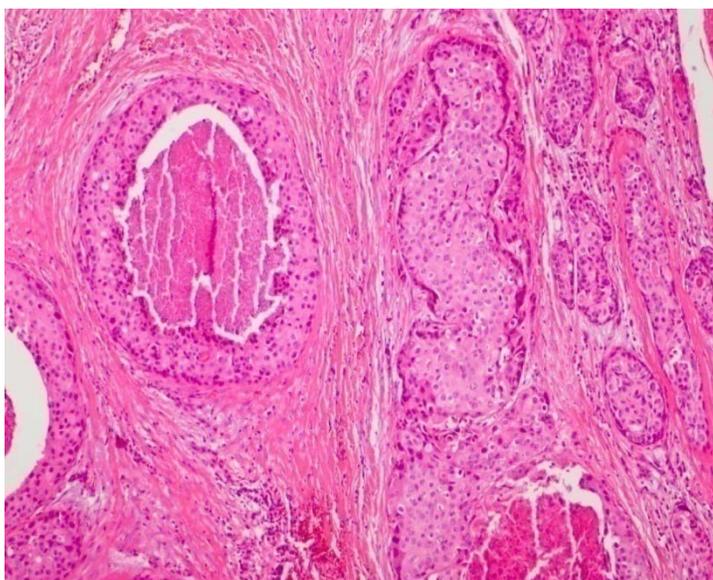
Existem diversas lesões que fazem diagnóstico diferencial com o CME, a saber: cistadenoma, cistadenocarcinoma, adenoma pleomórfico, carcinoma adenoescamoso, APBG, carcinoma de células escamosas primário ou metastático, carcinomas de células claras e adenocarcinoma sem outra especificação (Auclair & Ellis, 1991).

Quanto ao prognóstico, 5% dos tumores de baixo grau metastizaram para linfonodos regionais e 2,5% resultaram em morte. Já os tumores de alto grau apresentaram taxas de metástases e óbitos de 55% e 80%, respectivamente (Ellis *et al.*, 1996).

## **2.7 Carcinoma de Ducto Salivar**

O Carcinoma de ducto salivar (CDS) é uma neoplasia epitelial de alto grau pouco comum, que histologicamente assemelha-se ao carcinoma ductal da mama. É uma lesão que representa menos de 1% de todas as neoplasias salivares e 9% das malignidades de glândula salivar (Skálová *et al.*, 2005). Ocorre mais frequentemente em homens, preferencialmente na glândula parótida, seguida pelas glândulas submandibular e menores. Afeta principalmente indivíduos entre a sexta e oitava décadas da vida (Barnes *et al.*, 1994, Ellis *et al.*, 1996). Clinicamente observa-se um aumento de volume de crescimento rápido, podendo haver envolvimento neural com sintomatologia associada (Auclair *et al.*, 1991).

Macroscopicamente, apresenta-se como um tumor infiltrativo, com dimensões que variam de menos de 1cm a mais de 6cm (Auclair *et al.*, 1991). Microscopicamente, as células carcinomatosas apresentam citoplasma amplo, eosinófilo, finamente granuloso e núcleo com pleomorfismo acentuado e freqüentes mitoses. O CDS pode exibir padrão de crescimento cribiforme, com finas bandas de epitélio neoplásico arqueadas sobre pequenos espaços luminiais com comedonecrose, dando a aparência de “pontes romanas” (**Figura 8**). Crescimentos sólidos e papilares podem ser observados (Ellis *et al.*, 1996). Além disso, esta neoplasia geralmente apresenta elementos neoplásicos infiltrativos e o estroma é caracteristicamente de tecido conjuntivo fibroso denso que pode apresentar focos de hialinização (Auclair *et al.*, 1991).



**Figura 8** - Carcinoma do ducto salivar, na forma clássica. Notar focos de comedonecrose, composição celular: células carcinomatosas com citoplasma amplo, eosinófilo (H&E 100x).

Quanto ao perfil histoquímico, mucicarmim e alcian blue geralmente são negativos (Auclair *et al.*, 1991). Imunohistoquimicamente é observada reatividade para EMA, citoqueratina, GCDFP (*gross cystic disease fluid protein*), CEA, sendo geralmente observada negatividade para receptores de progesterona e estrogênio (Lewis *et al.*, 1996). Porém, é reconhecida a positividade nuclear do CDS para os receptores de androgênio (Kapadia *et al.*, 1998) e a de membrana para HER-2/neu (Skálová *et al.*, 2001).

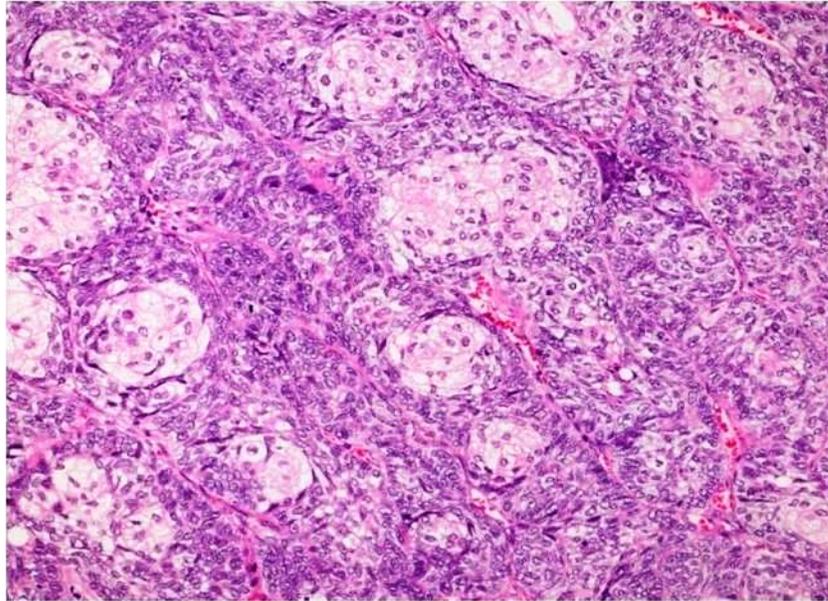
Algumas neoplasias que fazem diagnóstico diferencial com o CDS são: CCA, cistadenocarcinoma papilar, CME, carcinoma oncocítico, APBG (Auclair *et al.*, 1991).

Quanto ao comportamento, trata-se de uma neoplasia agressiva com recidivas e metástases frequentes, sendo que as metástases distantes ocorrem geralmente nos pulmões, cérebro, fígado e pele (Barnes *et al.*, 1994). Cerca de 30% dos pacientes desenvolvem recorrência, 60% metástases regionais e 50% metástases distantes. O tempo de sobrevida para a maioria dos pacientes é de 5 anos, ocorrendo muitas mortes em 3 anos, porém sendo relatadas taxas de sobrevidas de 12 anos (Ellis *et al.*, 1996).

## **2.8 Carcinoma Sebáceo**

O carcinoma sebáceo (CSeb) é uma neoplasia maligna composta por células sebáceas de maturidade variável. Existe um número elevado de casos na 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> décadas de vida, sem predileção por gêneros (Gnepp, 1983; Gnepp, 2005). Levando-se em conta os sítios anatômicos afetados pela doença, a glândula parótida representa a grande maioria dos casos, sendo acometida por aproximadamente 90%, seguida por ocasionais relatos nas glândulas menores intra orais e glândula submandibular (Ellis *et al.*, 1996). Clinicamente, aumento de volume doloroso com envolvimento neural é o principal sinal e sintoma (Auclair *et al.*, 1991).

Macroscopicamente, observa-se que as dimensões da lesão podem variar de 0,6cm a 8,5cm (Auclair *et al.*, 1991). Quanto aos achados microscópicos, observa-se uma cápsula parcial, circunscrevendo células neoplásicas que podem ser basalóides (**Figura 9**), escamosas e raramente mucosas. A organização das células cancerosas pode ser em ilhas e cordões, podendo formar estruturas ductais (Ellis *et al.*, 1996). Geralmente observa-se pleomorfismo celular, necrose e fibrose (Auclair *et al.*, 1991). Muthusamy *et al.*(2006) mostraram que esta neoplasia apresenta positividade à marcação para o adipophilin, indicando assim a presença de conteúdo lipídico intracitoplasmático, sendo que esse marcador foi sugerido como uma técnica auxiliar para demonstração de lipídeos em carcinoma sebáceo em material parafinizado.



**Figura 9** - Carcinoma sebáceo apresentando células neoplásicas sebáceas circundadas por células basalóides (H&E 200x).

Nas glândulas salivares, algumas neoplasias que podem fazer diagnóstico diferencial com o CSeb, são: CME, outras neoplasias salivares com diferenciação sebácea e metástase (Siriwardena *et al.*, 2003).

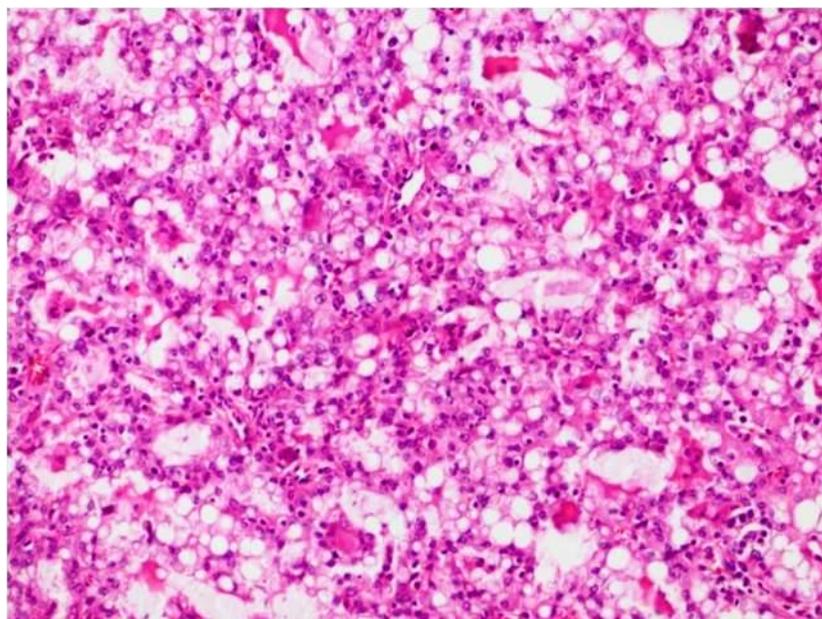
A média de sobrevida foi de 4,5 anos sendo o maior tempo de sobrevivência de 13 anos, sendo que 26% dos pacientes tiveram seu óbito decorrente de causas secundárias à neoplasia (Auclair *et al.*, 1991).

## **2.9 Carcinoma secretor análogo da mama**

Skálová *et al.* (2010) descreveram uma neoplasia em glândula salivar nomeada como carcinoma secretor análogo da mama (CSAM) ou MASC (*mammary analogue secretor carcinoma*), entidade esta análoga ao carcinoma secretor da mama quando avaliadas as características histopatológicas, imunohistoquímicas e moleculares. Quanto à idade, a média era de 46 anos, havendo uma predileção pelo gênero masculino. Quanto à localização observou-se que a maioria dos casos ocorre na glândula parótida, seguida por

glândulas salivares menores. Clinicamente, foi-se relatado que a maioria dos pacientes apresentou um nódulo de crescimento lento.

Microscopicamente, observa-se uma lesão dividida por septos cujas bordas são circunscritas, mas não encapsuladas, apresentando invasão do tecido circunjacente. As células apresentam citoplasma eosinofílico ou vacuolado (**Figura 10**), com um núcleo vesicular e núcleo centralmente localizado. Os padrões de crescimentos observados são: microcístico, tubular e sólido. Nos espaços microcísticos e tubulares podem ser vistas secreções positivas para PAS (mesmo após digestão com diástase), mucicarmim, MUC1, MUC4. O perfil imunohistoquímico mostra reatividade forte para citoqueratinas, proteína S-100, vimentina, STAT5a e mamoglobina. A avaliação molecular mostrou que esta neoplasia apresenta a translocação ETV6-NTRK3 t(12;15) (p13;q25), podendo ser comprovada por exames de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), PCR (*polymerase chain reaction*) e sequenciamento (Skálová *et al.*, 2010).



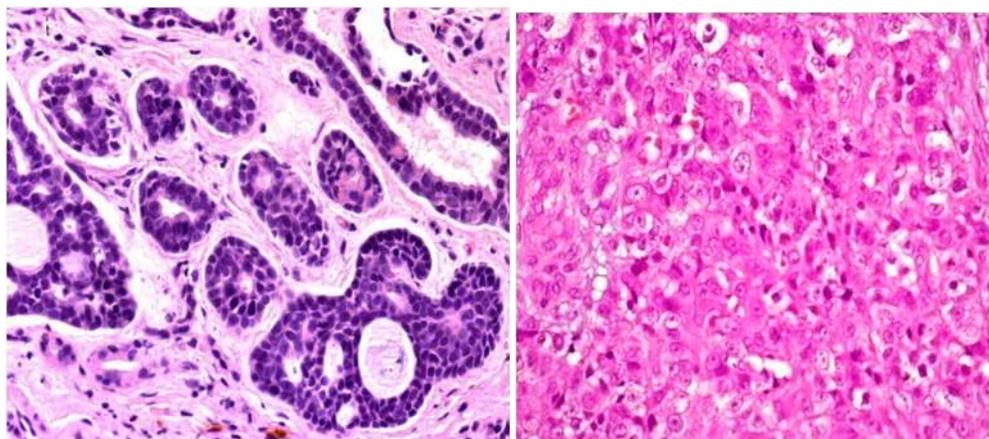
**Figura10** - Carcinoma secretor análogo da mama. Observar células com citoplasma eosinófilo e vacuolado (H&E 200x).

As principais neoplasias que fazem diagnóstico diferencial com o MASC são: CCA, cistadenocarcinoma sem nenhuma outra especificação, CME. Clinicamente, pode ter um curso indolente ou até mesmo agressivo (Skálová *et al.*, 2010).

## **2.10 Carcinomas de glândulas salivares com transformação para alto grau**

Transformação para alto grau ou dediferenciação é a mudança fenotípica e genotípica de células para um estado de menor diferenciação, resultando em um comportamento mais agressivo e com maior capacidade de proliferação (Kato *et al.*, 2004). Quanto aos aspectos epidemiológicos, geralmente observa-se que afeta pacientes de elevada faixa etária, além disso há predominância pelo gênero masculino (Henley *et al.*, 1997).

Este processo tem sido observado em diversos carcinomas de glândulas salivares, incluindo: CAC (Cheuk *et al.*, 1999) (**Figura 11**), CME (Nagao *et al.*, 2003), CM (Ogawa *et al.*, 2003), CEM (Kusafuka *et al.*, 2008) e em CCA (Stanley *et al.*, 1988). O diagnóstico se baseia em características morfológicas, tais como: presença de células anaplásicas, pleomorfismo nuclear, mitoses, nucléolos proeminentes (**Figura 11**) e necrose (Simpson *et al.*, 2002; Skálová *et al.*, 2009). Além disso, a utilização de um marcador comprovando a alta atividade proliferativa auxilia na comprovação diagnóstica. O marcador que melhor embasa um discernimento e que age como um parâmetro entre os componentes convencionais e transformados das neoplasias é o Ki-67 (Costa *et al.*, 2011).



**Figura 11** – A- Área convencional do carcinoma adenóide cístico padrão cribiforme (200x).

**B-** Área com transformação para alto grau do carcinoma adenóide cístico apresentando pleomorfismo nuclear, nucléolos evidentes (H&E 200x).

Quanto à evolução destas neoplasias, elas apresentam uma maior tendência para metástases e recorrência (Simpson *et al.*, 2002; Seethala *et al.*, 2007). Porém, como a transformação para alto grau é um processo muito raro, existem poucos dados para embasar afirmações acerca do prognóstico (Costa *et al.*, 2011).

### **3 PROPOSIÇÕES**

#### **3.1 Geral:**

Avaliar a frequência e quantidade das GLs citoplasmáticas e a expressão de proteínas relacionadas ao mecanismo secretor celular em carcinomas de glândulas salivares, correlacionando-as com a morfologia tumoral, grau de diferenciação e proliferação celular.

#### **3.2 Específicas:**

- a) Verificar a frequência e quantidade das GLs em carcinomas salivares subdivididos quanto ao tipo histológico.
- b) Verificar a expressão de proteínas relacionados ao mecanismo secretório celular (STAT5a e mamoglobina) em carcinomas salivares subdivididos quanto ao tipo histológico.
- c) Correlacionar a frequência e quantidade das GLs com o índice de proliferação celular dos carcinomas salivares.
- d) Comparar a frequência e quantidade das GLs entre as áreas diferenciadas e pouco diferenciadas nos carcinomas salivares com transformação para alto grau.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Grupo de estudo**

Foram analisados 79 casos de carcinomas salivares. Através da técnica de *Tissue Micro Array* (TMA) foram estudados 53 tumores subdivididos quanto ao tipo histológico em Carcinoma Mioepitelial (CM) - 6 casos, Carcinoma Epitelial Mioepitelial (CEME) - 12 casos, Carcinoma Mucoepidermóide (CME) - 10 casos, Carcinoma Adenóide Cístico (CAC) - 15 casos, Adenocarcinoma Polimórfico de Baixo Grau (APBG) - 6 casos e Carcinoma do Ducto Salivar (CDS) - 4 casos. Além desses, foram estudados separadamente: 2 casos de Carcinoma Sebáceo (CSeb), 14 casos de Carcinoma de Células Acinares (CCA), 10 casos de carcinoma secretor análogo da mama (MASC), 6 casos de CAC com transformação para alto grau. Todos os casos são pertencentes ao Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, coletados no período de 1990 a 2012.

### **4.2 Avaliação histológica e Tissue Micro Array**

Os diagnósticos de todos os casos foram revistos em cortes de parafina corados por Hematoxilina-Eosina (H&E) e classificados de acordo com “World Health Organization’s Histological Classification of Salivary Gland Tumors” (Eveson *et al.*, 2005). Além disso, foram selecionadas áreas representativas de cada tumor para a montagem do TMA.

As áreas que foram selecionadas no H&E foram identificadas no bloco de parafina e puncionadas com uma agulha de 1mm (Tissue-Tek Quick-Ray Tissue Microarray System; Sakura, California, USA). Os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco de parafina receptor em posição bidimensional determinada e gravada pelo equipamento. Um mapa com identificação detalhada de cada cilindro foi construído em planilha de Excel®, permitindo a localização exata de cada caso. Foram coletadas amostras de três áreas do bloco original para confecção em triplicata do bloco receptor. O bloco receptor posteriormente foi cortado na espessura de 5 µm e os cortes foram colhidos em lâminas adesivas oriundas da Instrumedics (Hackensack NJ, EUA). O tape com o material

foi colado com a pressão manual de um rolo fixado na lâmina, e submetido à irradiação com UV por 30 min. Em seguida mergulhadas em solução solvente (TPC), e seca a temperatura ambiente. Os tapes foram retirados após a secagem.

As lâminas excedentes passaram por banho de parafina, e foram armazenadas em freezer. Os casos foram definidos como adequados quando o corte resultante ocupou pelo menos 24% da área total do cilindro.

### **4.3 Técnica de Imunohistoquímica**

Para estudo imunohistoquímico foram utilizados os anticorpos adipophilin (Fitzgerald, AP125), Ki-67 (Dako, MIB-1), mamoglobina (Bio SB, 31A5) e STAT5a (Epitomics, E289). As colorações foram realizadas seguindo protocolos previamente estabelecidos. Nos blocos selecionados de cada caso foram feitas secções de 3 µm de espessura, e o material colocado em lâminas tratadas com solução de organossilano a 4% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, SIGMA código A3648). A seguir, as lâminas foram colocadas em estufa a 110 °C por uma hora, antes do início da reação. A desparafinização foi feita com três banhos de xilol e hidratação em dois banhos de álcool absoluto. Posteriormente, as lâminas foram banhadas em álcool nas concentrações decrescentes de 80% e 50% e depois lavadas em água corrente seguida de água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito através de três banhos de imersão (3 minutos cada) em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 10%, à temperatura ambiente, seguidos de lavagem em água corrente e passagem por água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada pela imersão das lâminas em solução tampão fostato (PBS), com adição de solução tampão Tris-EDTA (pH 8,9) para Ki-67 e mamoglobina e com adição de solução tampão de citrato (pH 6,0) para STAT5a, sob ação de calor úmido da panela a vapor T-fal (Stem Cuisine Hi-Speed 700) a 95°C por 30 minutos. Para marcação com adipophilin não é necessária recuperação antigênica. Após esfriarem durante 15 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, permanecendo em PBS. Posteriormente, foi pingado sobre os cortes o bloqueador de proteínas Dako (x0909) deixando-o agir por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foi realizada a reação antígeno-anticorpo primário, na qual o adipophilin (sem diluição), Ki-67 (1:500),

STAT5a (1:250) e mamoglogina (1:250) foram gotejados sobre os cortes histológicos e incubados em câmara úmida por 30 minutos na estufa a 37°C. Logo após, as lâminas permaneceram overnight (16-18 horas) em câmara úmida a 4°C. Em seguida a incubação, houveram 3 lavagens em solução salina tampão (PBS), por 3 minutos cada, à temperatura ambiente, para retirada do excesso do anticorpo primário.

A detecção do anticorpo primário foi efetuada utilizando-se o Sistema EnVision Plus (Dako). A solução foi gotejada sobre os cortes histológicos que permaneceram, durante uma hora, em câmara úmida a 37 °C. Após, as lâminas foram submersas em solução salina tampão (PBS), à temperatura ambiente. A coloração foi realizada utilizando o DAB (3,3-tetra-hidrocloro de diaminobenzidina, SIGMA, código D5637) por 5 minutos à 37 °C. A seguir, as lâminas foram submetidas novamente à lavagem em água corrente e passagem por água destilada.

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

#### **4.4 Avaliação imunohistoquímica**

A positividade dos marcadores foi evidenciada pela coloração marrom. As células positivas exibiram os padrões de coloração tipo nuclear (Ki-67 e STAT5a) e citoplasmático (adipophilin e mamoglobina). Apenas o Ki-67 apresenta controle interno da reação: camada basal do epitélio de superfície.

##### **A) Avaliação das células positivas**

Para todos os casos, as secções coradas foram analisadas no menor aumento para se identificar as áreas de maior densidade de marcação. As reações de imunohistoquímicas foram interpretadas simultaneamente por três pesquisadores (AA, FVM e HT).

##### **B) Quantificação dos anticorpos**

O índice de proliferação celular pelo o Ki-67 foi calculado através da relação entre o número de células positivas e o número total de células tumorais em três áreas selecionadas (hotspots) da amostra com um total de 1000 células. A avaliação da positividade da reação do adipophilin, STAT5a e mamoglobina foi realizada em pequeno aumento (5 x), sendo utilizada a seguinte escala semi-quantitativa:

- 0: coloração ausente ou positividade < 5% das células examinadas;
- +: positividade  $\geq 5\%$  e < 50% das células examinadas – positivo focal;
- ++: positividade  $\geq 50\%$  das células examinadas – positivo difusa

A intensidade de marcação do STAT5a e mamoglobina foi subjetivamente avaliada como fraca/moderada (+) ou intensa (++) ou ausente.

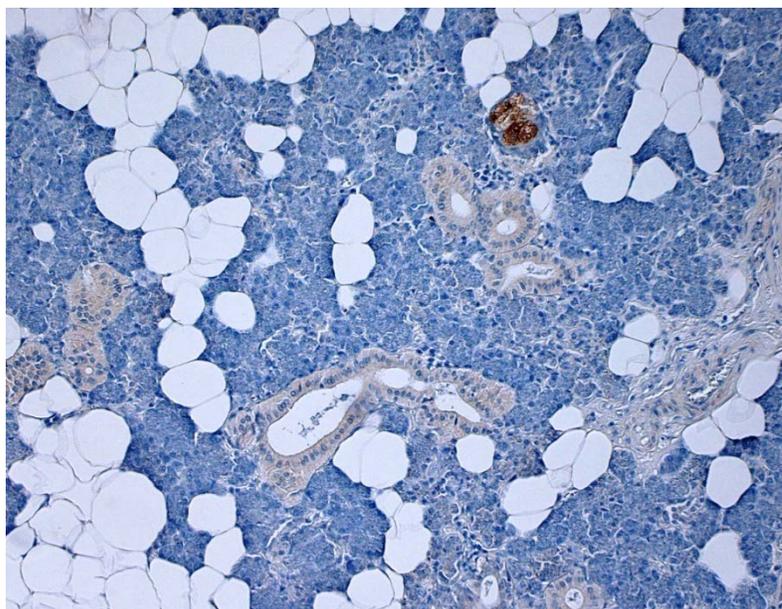
#### **4.5 Aspectos éticos**

O presente projeto foi aprovado no Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP sob protocolo nº 06683312.8.0000.5404.

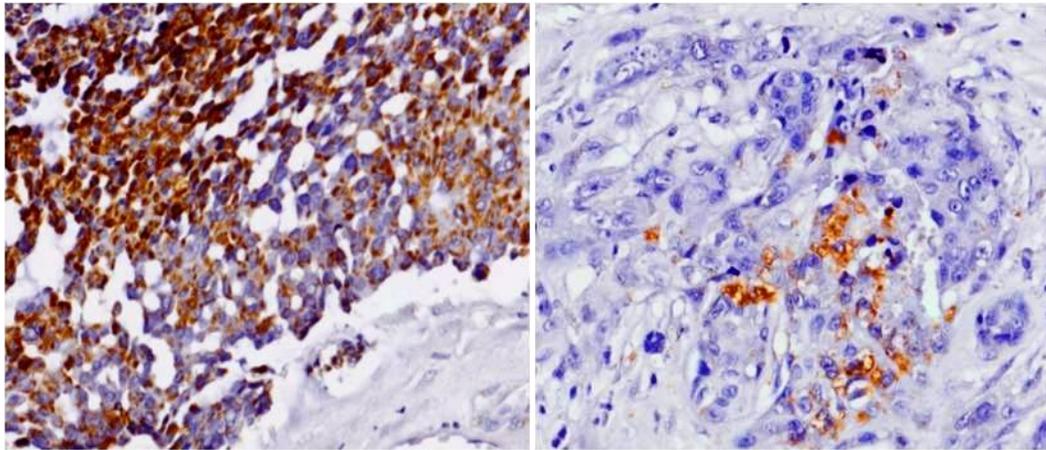
## 5 RESULTADOS

A Tabela 1 mostra o resultado da avaliação dos 73 carcinomas salivares com o anticorpo adipophilin. Nestes tumores, 43% não apresentaram GLs citoplasmáticas, enquanto que em 37% a positividade era focal (+) e em 20% difusa (++).

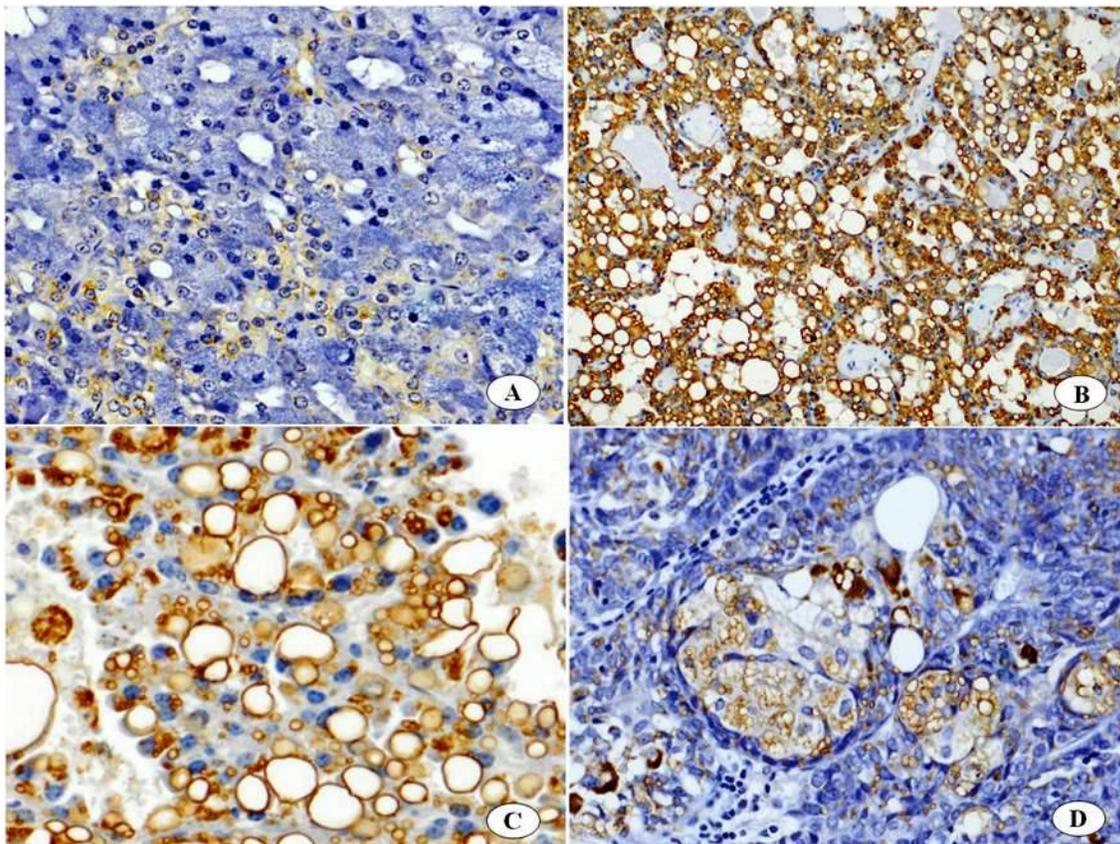
Não ocorreu expressão do adipophilin no parênquima salivar normal, exceto por ocasionais células ductais com diferenciação sebácea (**Figura 12**). Os subtipos histopatológicos que apresentaram positividade para adipophilin em 50% ou mais das células foram os casos: MASC (100%), CCA (85,64%), CM (83%), CDS (75%) e CSeb (50%) (**Figura 13**). Destes (com exceção dos MASCs e CSebs), a maior parte dos casos apresentou positividade focal para adipophilin (+) e o padrão de coloração era de microgotas citoplasmáticas (**Figura 14A**). Em contraste, todos os casos de MASC mostravam positividade difusa (++) para adipophilin, sendo sempre sob a forma de grandes gotas citoplasmáticas (**Figura 14B,C**). O grupo de CSeb era constituído por apenas 2 casos (tumor muito raro) e apenas um deles foi positivo para adipophilin. Este apresentava marcação difusa, com padrão de grandes gotas, semelhante ao MASC (**Figura 14D**).



**Figura 12** –Reação de imunohistoquímica com adipophilin – Ausência de expressão no parênquima salivar, exceto por ocasionais células ductais com diferenciação sebácea (100x).



**Figura 13** – Reação de imunohistoquímica com adipophilin– Positividade em mais de 50% das células. Carcinoma mioepitelial à esquerda e carcinoma do ducto salivar à direita (200x, à esquerda; 400x, à direita).



**Figura 14** - Reação de imunohistoquímica com adipophilin- **A**- Carcinoma de células acinares apresentando padrão de marcação de microgotas (200x). **B, C**- Positividade difusa e presença de gotas citoplasmáticas em carcinoma secretório análogo da mama (100x e 400x, respectivamente).

**D-** Marcação difusa e também presença de gotas citoplasmáticas em carcinoma sebáceo (200x).

As neoplasias que apresentaram menos de 50% das células positivas para adipophilin foram: CAC (26,6%), CEM (41,6%), CM (40%) e o APBG (16,6%). Nestes tumores, o padrão de expressão também foi de microgotas.

**Tabela 1-** Imunoexpressão de adipophilin em neoplasias de glândulas salivares.

Tipo Histológico	Total de Casos	Casos Positivos			Padrão de Expressão
		Total	+	++	
Carcinoma de células acinares	14	12	11 (78,5%)	1 (7,14%)	Microgotas
Carcinoma adenóide cístico	15	4	4 (26.6%)	0%	Microgotas
Carcinoma epitelial-mioepitelial	12	5	4 (33.3%)	1 (8.3%)	Microgotas
Carcinoma secretor análogo da mama	10	10	0%	10 (100%)	Gotas
Carcinoma Mioepitelial	6	5	2 (33,3%)	3 (50%)	Microgotas
Carcinoma mucoepidermóide	10	4	4 (40%)	0%	Microgotas
Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau	6	1	1 (16.6%)	0%	Microgotas
Carcinoma do ducto salivar	4	3	3 (75%)	0%	Microgotas
Carcinoma sebáceo	2	1	0%	1 (50%)	Gotas

Como os casos de MASC mostraram alta positividade para adipophilin, com padrão distinto de expressão (macrogotas) em comparação com os demais (microgotas), decidimos aprofundar a investigação nessas lesões. Morfologicamente, as células carcinomatosas do MASC apresentam citoplasma vacuolado semelhante àquele das células mamárias lactacionais, além da secreção de material semelhante a leite. Estes achados levaram-nos à hipótese que estes tumores poderiam apresentar diferenciação similar à lactacional. Por esse motivo, comparamos a extensão e intensidade de expressão de

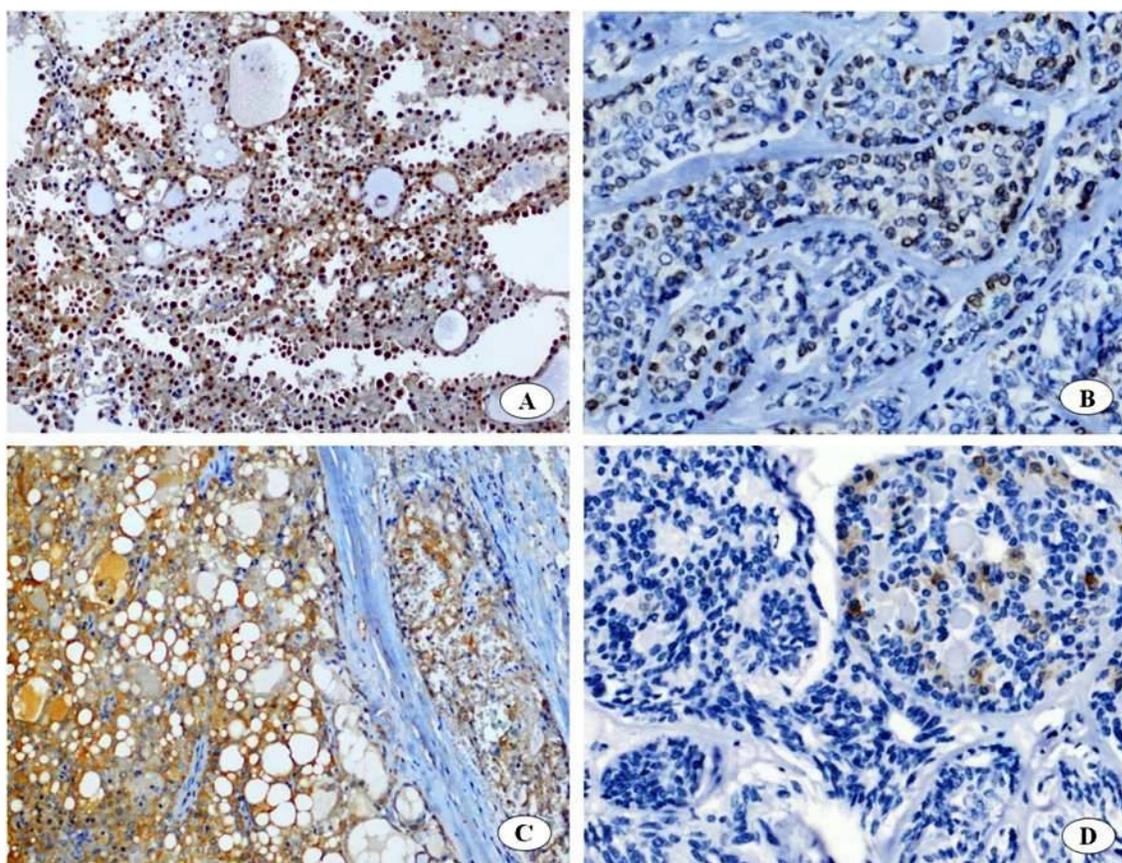
proteínas relacionadas à secreção, isto é, STAT5a e mamoglobina, entre os casos de MASC e os outros tipos de carcinomas salivares (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Imunoexpressão para adipophilin, STAT 5a e mamoglobina em carcinomas de glândulas salivares.

Subtipos Histológicos	ADIOPHILIN			STAT 5a			MAMOGLOBINA		
	Nº de casos positivos (%)	Padrão de Marcação	Qt. cels. pos.	Nº de casos positivos (%)	Int. Marcação	Qt. cels. pos.	Nº de casos positivos (%)	Int. Marcação	Qt. cels. pos.
			+ ++		+ ++	+ ++		+ ++	+ ++
MASC	10/10 (100)	G	- 10	10/10 (100)	- 10	- 10	10/7 (70)	- 7	4 3
CCA	14/12 (85.7)	MG	11 1	8/3 (37.5)	3 -	3 -	8/0 (0)	- -	- -
CAC	15/4 (26.7)	MG	4 -	17/5 (29.4)	3 2	4 1	17/0 (0)	- -	- -
CEME	12/5 (41.7)	MG	4 1	13/8 (61.5)	6 2	4 4	13/1 (7.7)*	1 -	1* -
CM	6/5 (83.3)	MG	2 3	6/5 (83.3)	4 1	4 1	6/0 (0)	- -	- -
APBG	6/1 (16.7)	MG	1 -	6/0 (0)	- -	- -	6/3 (50)*	3 -	3* -
CME	10/4 (40)	MG	4 -	14/0 (0)	- -	- -	14/0 (0)	- -	- -
CDS	4/3 (75)	MG	3 -	14/2 (50)	2 -	2 -	4/0 (0)	- -	- -
CSeb	2/1 (50)	G	- 1						

MASC: Carcinoma secretor análogo da mama; CCA: Carcinoma de células acinares; CAC: Carcinoma adenóide cístico; CEME: Carcinoma epitelial-mioepitelial; CM: Carcinoma mioepitelial; APBG: Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CME: Carcinoma mucoepidermóide; CDS: Carcinoma de ducto salivar; CSeb: Carcinoma sebáceo; G: gotas; MG: micro-gotas; Int. Marcação: Intensidade de marcação: + (fraca/moderada), ++ (intensa); Qt. cels. pos.: quantidade de células positivas: + ( $\geq 5$  e  $<50\%$  de células positivas), ++ ( $\geq 50\%$  de células positivas); \*Nestes casos, a quantidade de células positivas foi  $<20\%$  de todas células tumorais.

Entre os carcinomas salivares, todos os casos de MASC mostraram uma expressão difusa de STAT5a (**Figura 15A**). Em outros carcinomas salivares, STAT5a foi observado em áreas focais (**Figura 15B**), exceto por poucos casos nos quais a sua expressão foi intensa e difusa. No grupo de MASC, a expressão da mamoglobina foi vista em células tumorais em sete de dez casos (70%); ela foi forte em todos os casos (**Figura 15C**), e em quatro de sete (57,1%) foi observado um padrão focal. A mamoglobina foi negativa em outros carcinomas salivares, exceto por um CEME e três APBG (**Figura 15D**). Entretanto, nestes tumores, a proporção de células positivas foi pequena (<20%).



**Figura 15** – Reação imunohistoquímica com STAT5a (A e B) e mamoglobina (C e D) – Observar a expressão do STAT5a difusa e forte no MASC (A, 100x) e fraca no carcinoma epitelial-mioepitelial (B, 200x). Expressão da mamoglobina forte no MASC (C, 100x) e fraca no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (D, 200x).

A Tabela 3 mostra a correlação entre a porcentagem de casos positivos para adipophilin e o índice de proliferação celular dos carcinomas salivares. Índice de

proliferação maior que 10% das células tumorais foi observado no CSeb (Ki-67 = 29%), seguido do CDS (Ki-67 = 23,11%) e do CM (Ki-67 = 12,15%). Todos esses tumores apresentaram um total de casos positivos para adipophilin igual ou maior de 50% (CSeb – 50%, CDS - 75% e CM -83%). Entre os tumores com baixo índice proliferativo, isto é, menor de 10%, apenas os casos de MASC e CCA mostraram positividade em 50% ou mais dos casos.

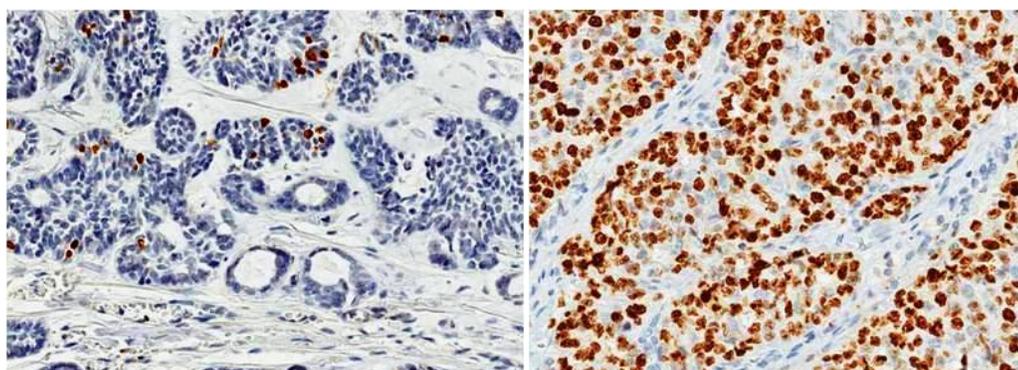
**Tabela 3-** Comparação da porcentagem de casos positivos para Adipophilin e Ki-67 em carcinomas de glândulas salivares.

<b>Casos</b>	<b>Total de Casos</b>	<b>Adipophilin (%)</b>	<b>Ki-67 (%)</b>
Carcinoma de células acinares	14	85,64%	1,71%
Carcinoma adenóide cístico	15	26,60%	5,37%
Carcinoma epitelial-mioepitelial	12	41,60%	4,83%
Carcinoma secretor análogo da mama	10	100%	8,24%
Carcinoma mioepitelial	6	83%	12,15%
Carcinoma mucoepidermóide	10	40%	7,05%
Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau	6	16,60%	0,86%
Carcinoma do ducto salivar	4	75%	23,11%
Carcinoma sebáceo	2	50%	29%

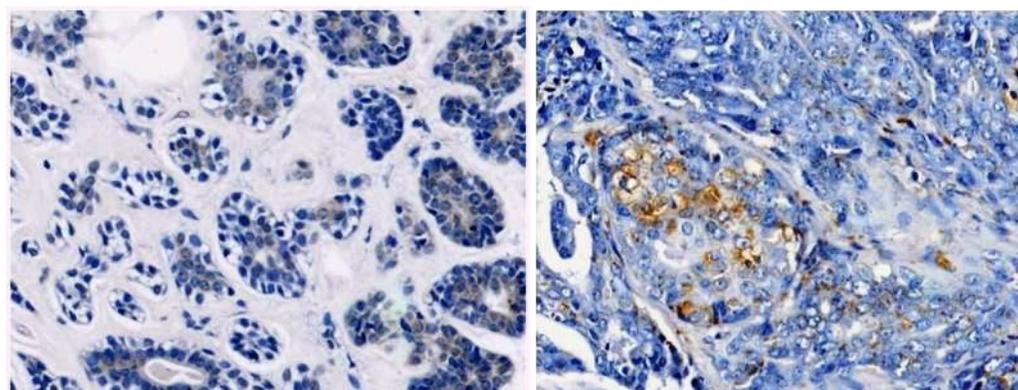
Na Tabela 4, aprofundamos a avaliação da lipogênese e proliferação celular através do estudo das áreas diferenciadas e pouco diferenciadas de seis casos de CAC com transformação para alto grau. Observamos que o índice de proliferação médio da área convencional (Ki-67 = 14,65%) é menor que o da área transformada (Ki-67 = 46,88%) (**Figura 16**). Realizando-se uma comparação da frequência e quantidade de gotas lipídicas entre as áreas diferenciadas e pouco diferenciadas nos CAC com transformação para alto grau, observa-se que quanto maior o índice de proliferação celular, maior a imunoreatividade ao adipophilin. A área transformada apresentou uma positividade difusa (++) ao adipophilin em 83,3% dos casos e 16,6% dos casos com positividade focal (+). Por outro lado, a área convencional mostrou 50% dos casos com intensidade de marcação "+" e outra metade com nenhuma marcação "0" (**Figura 17**).

**Tabela 4-** Avaliação da proliferação celular e lipogênese em CAC com transformação para alto grau.

Casos	Área Convencional		Área Transformada	
	Ki-67	Adipophilin	Ki-67	Adipophilin
1	24,51	+	34,95	++
2	9,6	+	17,05	++
3	9,04	+	87,95	++
4	4,36	0	94,07	++
5	27,9	0	33,6	++
6	12,5	0	13,7	+



**Figura 16** – Reação de imunohistoquímica com Ki-67- Notar que o índice de proliferação médio da área convencional à esquerda é menor que o da área transformada à direita (100x, à esquerda; 200x, à direita).



**Figura 17** – Reação de imunohistoquímica com adipophilin –Observar que a presença de microgotas lipídicas é menor na área convencional à esquerda em comparação com a área transformação para alto grau à direita (200x).

## 6 DISCUSSÃO

O adipophilin é uma proteína expressa não somente em adipócitos (Jiang & Serrero 1992; Eisinger & Serrero 1993), mas também em uma variedade de células e tecidos, como por exemplo: hepatócitos esteatóticos, células de Sertoli e Leydig, córtex adrenal e epitélio glandular da mama em lactação (Heid *et al.*, 1998; Muthusamy *et al.*, 2006). Quando comparada com outras proteínas da família PAT, o adipophilin apresenta além de maior sensibilidade, uma alta especificidade para detecção de GLs intracitoplasmáticas. Estabelecendo-se um paralelo entre o Oil Red e o adipophilin, observa-se que o primeiro pode mostrar reatividade em 36% dos casos, enquanto que o segundo 88% (Muthusamy *et al.*, 2006). Portanto, enquanto métodos de coloração convencionais para gordura como o Oil Red, necessitam de material congelado dificultando a rotina diagnóstica, a detecção do adipophilin além de aparentar ser um método mais sensível para detecção das GLs, pode ser realizada em material parafinado.

A esteatogênese está aumentada em diversas neoplasias (Swinnen *et al.*, 2006), sendo que diversos mecanismos podem estar relacionados a modulação desta via metabólica, a saber: receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (Shimizu *et al.*, 2006), ubiquitinação (Eastman *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2010) e via PI3K/Akt (Yamashita *et al.*, 2009). Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos são uma família de receptores nucleares (Desvergne *et al.*, 1999) que estimulam a expressão de genes atuantes no metabolismo e mobilização de lipídios (Lemberger *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 2006) através de enzimas como as mitocondrial e peroxissômica  $\beta$  de oxidação (Desvergne *et al.*, 1999). Uma segunda via de modulação envolve a ubiquitina, um peptídeo que se conjuga com proteínas alvo para degradação proteossômica com o objetivo de eliminá-las, alterando assim as funções a elas associadas (Ciechanover *et al.*, 1998). Xu *et al.* (2005) e Xu *et al.* (2006) relataram que as proteínas da família perilipin podem ser ubiquitinadas e posteriormente degradadas por proteossomos, mostrando que essa pode ser uma via de modulação pós-traducional das proteínas associadas as GLs. Por último, a via de sinalização intracelular PI3K/Akt leva à síntese e acúmulo nuclear do fator de transcrição SREBP-1 (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-1) que atua no aumento de enzimas lipogênicas e gordura (Wang *et al.*, 2005) através da ativação de genes associados ao

metabolismo de ácido graxo, triglicerídeos, fosfolipídios, colesterol e um cofator necessário para produção destas moléculas, o NADPH (Brown *et al.*, 1997; Horton *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 2000; Sakakura *et al.*, 2001).

O presente estudo mostrou uma frequência de 57% de GLs em carcinomas de glândulas salivares, embora ela seja variável nos diversos subtipos histopatológicos. Na maioria deles, a GLs foram observadas em um padrão focal ( $\geq 5\%$  e  $< 50\%$  das células examinadas). Isto está de acordo com o estudo de Straub *et al.* (2010) que descreve que a formação de GLs representa um mecanismo comum em células neoplásicas, sendo que o número, localização e tamanho dessas organelas intracitoplasmáticas varia em diferentes neoplasias. Portanto, acreditamos que a expressão aumentada de adipophilin em nosso estudo representa um aumento da lipogênese em alguns casos e diferenciação celular em outros. O aumento da lipogênese, à semelhança do bem conhecido fenômeno do aumento da glicólise aeróbica nas células cancerosas, possivelmente representa uma adaptação destas células a uma maior demanda metabólica e energética.

Straub *et al.*(2010) mostraram que a intensidade de marcação do adipophilin correlacionava-se positivamente com proliferação celular em carcinomas de mama e no processo de hepatocarcinogênese. Nestes tumores, adipophilin recobria pequenas GLs (microgotas) citoplasmáticas. As microgotas são geradas e liberadas rapidamente, sendo que estas micro-GLs são requeridas por células neoplásicas em divisão (Straub *et al.*, 2010), devido à necessidade de biossíntese de membranas e outras macromoléculas, como por exemplo, ácidos nucleicos e proteínas (Atshaves *et al.*, 2001). Em nosso estudo, a correlação entre proliferação celular e GLs foi estudada através da comparação entre a marcação para Ki-67 e adipophilin, mostrando que os casos com maior índice proliferativo apresentaram um total de casos positivos para adipophilin igual ou maior que 50% (CDS: Ki-67 = 23,11%, adipophilin = 75%; CSeb: Ki-67 = 29%, adipophilin = 50%). Estes achados sugerem que a maior proliferação celular nesses tumores foi possivelmente um fator importante para o acúmulo de GLs, refletindo o aumento da lipogênese como forma de suprimento de nutrientes.

Entretanto, as GLs também podem estar associadas a filamentos intermediários e vimentina (Franke *et al.*, 1987; Traub *et al.*, 1987), desempenhando funções, que não

refletem necessariamente demanda metabólica/energética. Os filamentos intermediários aparentemente estão envolvidos na deposição, *turn-over* e movimentação de GLs (Franke *et al.*, 1987). O carcinoma mioepitelial é uma neoplasia que pode apresentar uma quantidade acentuada de filamentos intermediários (Dardick, 1985), o que poderia justificar a alta frequência de GLs que detectamos nestes tumores (83,3% dos casos).

O acúmulo de GLs citoplasmáticas, além de ter implicação potencial nos mecanismos de proliferação, também pode estar associado à diferenciação celular (Accioly *et al.*, 2008). Por exemplo, em tumores adipogênicos, hepatocelulares e sebáceos, a expressão de perilipin foi relacionada à diferenciação celular ao invés de fenótipo metabólico (Straub *et al.*, 2010). Em glândulas salivares é possível que a expressão de adipophilin nos casos de MASC e no CSeb esteja associada a diferenciação celular. Na nossa série de carcinomas, estes dois tipos de tumores foram os únicos que apresentaram depósito de grandes gotas citoplasmáticas, em contraste aos outros tumores nos quais adipophilin recobria microgotas. No CSeb, as grandes GLs representam diferenciação do tipo sebócito, que quando maduros contém grande quantidade de lipídeos formando o sebo. Nos casos de MASC, acreditamos que o acúmulo de GLs observado em 100% dos casos é devido principalmente à diferenciação lactacional-like, visto que o índice proliferativo destes tumores foi baixo. No epitélio alveolar mamário, a formação de GLs é um sinal precoce de lactogênese e o aumento acentuado do tamanho das GLs é considerado uma alteração histológica marcante do começo da lactação (Anderson *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 2001). As gotas de gordura do leite são recobertas por uma membrana complexa, sendo que adipophilin é um de seus componentes principais (Cebo *et al.*, 2010; Price-Schiavi *et al.*, 1998).

Quanto a expressão dos marcadores relacionados ao mecanismo secretório, a expressão forte e difusa de STAT5a detectada em todos os nossos casos de MASC e naqueles descritos na série de Skálová *et al.* (2010) corrobora com nossa hipótese sobre a diferenciação lactacional – like destes tumores. Em camundongos, STAT5a é importante para a lactogênese (Peterson *et al.*, 2001). Esta proteína é responsável pela transcrição de uma variedade de proteínas reguladoras de diferenciação e pode ser ativada por diversas citocinas e hormônios (Strauss *et al.*, 2006). Na nossa série de carcinomas, apenas os casos

de MASC apresentaram superexpressão de STAT5a em todos os casos. Nos outros tipos de carcinomas salivares tal superexpressão foi ocasionalmente observada.

A mamoglobina é uma proteína secretora que está superexpressa em carcinomas mamários e alguns outros tumores, tais como, carcinomas endometriais, salivares e de glândulas sudoríparas (Bhargava *et al.*, 2007; Heizmann *et al.*, 2002; Skálová *et al.*, 2010). Em relação aos tumores salivares, a mamoglobina tem sido estudada apenas em pequenas séries de lesões benignas e malignas (Bhargava *et al.*, 2007; Heizmann *et al.*, 2002). Na nossa série de carcinomas salivares, a mamoglobina foi observada predominantemente nos casos de MASC, sendo rara e muito focal nos outros tumores, reforçando a sua importância para o diagnóstico de MASC (Skálová *et al.*, 2010). Apesar disso, mesmo que a mamoglobina esteja relacionada a mecanismos celulares secretórios, sua expressão não parece estar relacionada estritamente à diferenciação lactacional-like, pois a expressão desta proteína pode ser vista em outros tipos de carcinomas, como por exemplo, dentro de secreções glandulares nos carcinomas endometriais (Bhargava *et al.*, 2007).

Alguns de nossos casos estudados apresentavam transformação para alto grau. É um raro fenômeno descrito em uma diversidade de neoplasias de glândulas salivares. Esta transformação é caracterizada pela justaposição de áreas convencionais de determinada neoplasia com áreas apresentando morfologia de adenocarcinoma pobremente diferenciado ou carcinoma indiferenciado. Em geral, o componente de alto grau apresenta-se sob a forma de sólidos ninhos de células com abundante citoplasma, núcleo vesicular e nucléolo bem evidente (Nagao *et al.*, 2003). O perfil imunohistoquímico de uma lesão de alto grau pode ser avaliado por diversos marcadores, dentre eles: Ki-67 (Kusafuka *et al.*, 2008), Ciclina D1 (Seethala *et al.*, 2007), pRB (Nagao *et al.*, 2003), E-caderina (Malhotra *et al.*, 2009), Bcl2 (Simpson *et al.*, 2002), b-catenina (Skálová *et al.*, 2009), GLUT 1 (Kawamura *et al.*, 2001), p53 (Fonseca *et al.*, 2000). Segundo Costa *et al.* (2011), o Ki-67 é o único destes marcadores que pode ser visto claramente mais expressado nas áreas com transformação para alto grau, de modo que a melhor maneira de se identificar a área transformada seria uma associação compreendendo aspectos morfológicos e proliferação celular avaliada por imunohistoquímica. Seis casos de CACs com transformação para alto

grau foram avaliados, sendo que as áreas convencionais apresentaram metade dos casos com uma positividade focal (+) para o adipophilin e a outra metade foi negativa. Nas áreas transformadas 16,6% e 83,3% dos casos apresentaram positividade focal (+) e difusa (++), respectivamente. Acreditamos que a maior atividade proliferativa reflita no aumento da lipogênese da área transformada ( $Ki-67_{\text{médio}} = 46,88\%$ ) em relação a áreas convencionais ( $Ki-67_{\text{médio}} = 14,65\%$ ).

Anti-inflamatórios não esteroidais e inibidores de *fatty acid synthase* (FAS) podem exercer um papel anticarcinogênico através da inibição da produção de GLs afetando a proliferação tumoral. Entretanto, o mecanismo envolvido na inibição da biogênese das GLs ainda não está bem esclarecido (Accioly *et al.*, 2008). Acreditamos que a avaliação de GLs em tecidos humanos poderia ser utilizada como um alvo terapêutico para o tratamento de câncer. No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer aplicação terapêutica.

## 7 CONCLUSÕES

7.1 A presença de gotas lipídicas é comum em carcinomas de glândulas salivares, sendo que o número, localização e tamanho destas organelas intracitoplasmáticas varia em diferentes subtipos histopatológicos.

7.2 O acúmulo de gotas lipídicas não está necessariamente associada ao alto índice proliferativo. A alta lipogênese em carcinoma de células acinares (tumor com baixo índice proliferativo), sugere que este fenômeno pode refletir uma alteração do metabolismo possivelmente relacionada a uma diferenciação tumoral.

7.3 Em carcinomas adenóides císticos com transformação para alto grau a quantidade de gotas lipídicas intracitoplasmáticas nas áreas transformadas provavelmente reflete um aumento da necessidade metabólica relacionada com aumento da proliferação tumoral.

7.4 A presença de grandes gotas lipídicas observadas nos casos de carcinoma secretor análogo da mama possivelmente é uma diferenciação secretória tipo lactacional, o que explica a imunoreatividade em forma de macro-gotas ao adipophilin, além da forte positividade a STAT5a e mamoglobina. A expressão ocasional e usualmente fraca de STAT5a e mamoglobina nos outros carcinomas salivares corrobora com essa hipótese.

## REFERÊNCIAS\*

1. Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS et al. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2008; 68(6): 1732-40.
2. Anderson C, Krutchkoff D, Pedersen C, Cartun R, Berman M. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland: a clinicopathologic and comparative immunohistochemical study. *Modern Pathol.* 1990; 3(1): 76-82.
3. Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis!. *Breast Cancer Res.* 2007; 9(1): 204-217.
4. Araújo V, Sousa S, Jaeger M, Jaeger R, Loyola A, Crivelini M et al. Characterization of the cellular component of polymorphous low-grade adenocarcinoma by immunohistochemistry and electron microscopy. *Oral Oncol.* 1999; 35(2):164-72.
5. Atshaves BP, Storey SM, McIntosh AL, Petrescu AD, Lyuksyutova OI, Greenberg AS et al. Sterol carrier protein-2 expression modulates protein and lipid composition of lipid droplets. *J Biol Chem.* 2001; 276(27):25324-35.
6. Auclair PL, Ellis GL, Gnepp DR. Other Malignant Epithelial Neoplasms. In: Auclair PL, Ellis GL, Gnepp DR, editores. *Surgical pathology of the salivary glands.* Filadélfia: WB Saunders; 1991. v. 25. p. 455 – 88.
7. Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid Carcinoma. In: Auclair PL, Ellis GL, Gnepp DR, editores. *Surgical pathology of the salivary glands.* Filadélfia: WB Saunders; 1991. v. 25. p. 269-98.
8. Barnes L, Rao U, Krause J, Contis L, Schwartz A, Scalamogna P. Salivary duct carcinoma. Part I. A clinicopathologic evaluation and DNA image analysis of 13 cases with review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(1): 64-73.
9. Batsakis JG, Luna MA, el-Naggar AK. Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: II. Acinic cell carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1990; 99(11): 929-33.
10. Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 127(1): 103-113.

---

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

11. Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 2007; 113(1): 30-49.
12. Bozza PT, Viola JP. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010; 82(4-6): 243-50.
13. Brasaemle DL. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* 2007; 48(12): 2547-59.
14. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997; 89(3):331-40.
15. Castle JT, Thompson LD, Frommelt RA, Wenig BM, Kessler HP. Polymorphous low grade adenocarcinoma: a clinicopathologic study of 164 cases. *Cancer.* 1999; 86(2): 207-19.
16. Cebo C, Caillat H, Bouvier F, Martin P. Major proteins of the goat milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 2010; 93(3): 868-876.
17. Chaudhry AP, Cutler LS, Leifer C, Satchidanand S, Labay G, Yamane G. Histogenesis of acinic cell carcinoma of the major and minor salivary glands. An ultrastructural study. *J Pathol.* 1986; 148(4): 307-20.
18. Chen JC, Gnepp DR, Bedrossian CW. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: an immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 65(3): 316-26.
19. Chen JS, Greenberg AS, Wang SM. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem.* 2002; 86(4): 784-91.
20. Cheuk W, Chan JK, Ngan RK. Dedifferentiation in adenoid cystic carcinoma of salivary gland: an uncommon complication associated with an accelerated clinical course. *Am J Surg Pathol.* 1999; 23(4): 465-72.
21. Chiosea SI, Griffith C, Assaad A, Seethala RR. The profile of acinic cell carcinoma after recognition of mammary analog secretory carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2012; 36(3): 343-50.
22. Cho KJ, El NaggAR AK, Ordonez NG, Luna MA, Austin J, Batsakis JG. Epithelial-myoepithelial carcinoma of salivary glands. A clinicopathologic, DNA flow cytometric, and

- immunohistochemical study of Ki-67 and HER-2/neu oncogene. *Am J Clin Pathol.* 1995; 103(4): 432-7.
23. Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(6): 2727-30.
  24. Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P et al. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes.* 2004; 53(5): 1261-70.
  25. Conley J, Dingman DL. Adenoid cystic carcinoma in the head and neck (cylindroma). *Arch Otolaryngol.* 1974; 100(2): 81-90.
  26. Corio RL, Sciubba JJ, Brannon RB, Batsakis JG. Epithelial-myoeepithelial carcinoma of intercalated duct origin. A clinicopathologic and ultrastructural assessment of sixteen cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 53(3): 280-7.
  27. Corio RL. Epithelial-Myoeepithelial Carcinoma. In: Auclair PL, Ellis GL, Gnepp DR, editores. *Surgical pathology of the salivary glands.* Filadélfia: WB Saunders; 1991. v. 25. p. 412-421.
  28. Costa AF, Altemani A, Hermsen M. Current Concepts on Dedifferentiation/High-Grade Transformation in Salivary Gland Tumors. *Patholog Res Int.* 2011; 2011:325965.
  29. Dardick I. Malignant myoeepithelioma of parotid salivary gland. *Ultrastruct Pathol.* 1985; 9(1-2): 163-8.
  30. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999; 20(5): 649-88.
  31. Ducharme NA, Bickel PE. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology.* 2008; 149(3): 942-9.
  32. Eastman SW, Yassaee M, Bieniasz PD. A role for ubiquitin ligases and Spartin/SPG20 in lipid droplet turnover. *J Cell Biol.* 2009; 184(6): 881-94.
  33. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1529(1-3): 103-13.
  34. Eisinger DP, Serrero G. Structure of the gene encoding mouse adipose differentiation-related protein (ADRP). *Genomics.* 1993; 16(3): 638-44.
  35. Ellis GL, Auclair PL. Acinic Cell Adenocarcinoma. In: Auclair PL, Ellis GL, Gnepp DR, editores. *Surgical pathology of the salivary glands.* Filadélfia: WB Saunders; 1991. v. 25. p. 299 -317.

36. Ellis GL, Auclair PL. Tumours of the salivary glands. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1996
37. Ellis GL, Corio RL. Acinic cell adenocarcinoma. A clinicopathologic analysis of 294 cases. *Cancer*. 1983; 52(3): 542-9.
38. El-Naggar AK, Huvos AG. Adenoid cystic carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. *World Health Organization Pathology and Genetics Head and Neck Tumours*. Lyons: IARC; 2005. p. 221-222.
39. Fonseca FP, Carvalho M, de Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG, Vargas PA. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012; 114(2): 230-9.
40. Fonseca I, Félix A, Soares J. Dedifferentiation in salivary gland carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2000; 24(3): 469-71.
41. Fonseca I, Soares J. Epithelial-myoepithelial carcinoma..In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. *World Health Organization Pathology and Genetics Head and Neck Tumours*. Lyons: IARC; 2005. p. 226-226
42. Foschini MP, Marucci G, Eusebi V: Low-grade mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: Characteristic immunohistochemical profile and evidence of striated duct differentiation. *Virchows Arch* 440:536-542, 2002.
43. Franke WW, Hergt M, Grund C. Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell*. 1987; 49(1): 131-41.
44. Fujimoto T, Kogo H, Ishiguro K, Tauchi K, Nomura R. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J Cell Biol*. 2001; 152(5): 1079-85.
45. Gnepp DR (1983). Sebaceous neoplasms of salivary gland origin: a review. *Pathol Annu*. 1983; 18 Pt 1: 71-102.
46. Gnepp DR. Malignant sebaceous Tumours. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. *World Health Organization Pathology and Genetics Head and Neck Tumours*. Lyons: IARC; 2005. p. 231-231.
47. Guimarães DS, Amaral AP, Prado LF, Nascimento AG. Acinic cell carcinoma of salivary glands: 16 cases with clinicopathologic correlation. *J Oral Pathol Med*. 1989; 18(7): 396-9.

48. Hall AM, Brunt EM, Chen Z, Viswakarma N, Reddy JK, Wolins NE et al. Dynamic and differential regulation of proteins that coat lipid droplets in fatty liver dystrophic mice. *J Lipid Res.* 2010; 51(3): 554-63.
49. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 1998; 294(2): 309-21.
50. Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions, and pathology. *Front. Biosci.* 2002; 7; 1356–68.
51. Henley JD, Geary WA, Jackson CL, Wu CD, Gnepp DR. Dedifferentiated acinic cell carcinoma of the parotid gland: a distinct rarely described entity. *Hum Pathol.* 1997; 28(7): 869-73.
52. Horton JD, Shimomura I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10(2): 143-50.
53. Hunter RM, Davis BW, Gray GF Jr, Rosenfeld L. Primary malignant tumors of salivary gland origin. A 52-year review. *Am Surg.* 1983; 49(2): 82-9.
54. Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 1995; 11; 69-74.
55. Jiang HP, Serrero G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(17): 7856-60.
56. Kapadia SB, Barnes L. Expression of androgen receptor, gross cystic disease fluid protein, and CD44 in salivary duct carcinoma. *Mod Pathol.* 1998; 11(11): 1033-1038.
57. Katoh M, Shaw C, Xu Q, Van Driessche N, Morio T, Kuwayama H et al. An orderly retreat: dedifferentiation is a regulated process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(18): 7005-10.
58. Kawamura T, Kusakabe T, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Nashimoto A et al. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer.* 2001; 92(3): 634-41.
59. Kelsch RD, Bhuiya T, Fuchs A, Gentile P, Kahn MA, Fantasia JE. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: flow cytometric, p53, and PCNA analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84(4): 391-9.
60. Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res.* 2006; 66(12): 5977-80.

61. Kusafuka K, Takizawa Y, Ueno T, Ishiki H, Asano R, Kamijo T et al. Dedifferentiated epithelial-myoepithelial carcinoma of the parotid gland: a rare case report of immunohistochemical analysis and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(1): 85-91.
62. Kusafuka K, Takizawa Y, Ueno T, Ishiki H, Asano R, Kamijo T et al. Dedifferentiated epithelial-myoepithelial carcinoma of the parotid gland: a rare case report of immunohistochemical analysis and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(1): 85-91.
63. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996; 12: 335-63.
64. Lewis JE, McKinney BC, Weiland LH, Ferreiro JA, Olsen KD. Salivary duct carcinoma. Clinicopathologic and immunohistochemical review of 26 cases. *Cancer.* 1996; 77(2): 223-30.
65. Lewis JE, Olsen KD, Weiland LH. Acinic cell carcinoma. Clinicopathologic review. *Cancer.* 1991; 67(1): 172-9.
66. Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* 1997; 11(2); 179-186.
67. Luna MA, Ordonez NG, Mackay B, Batsakis JG, Guillaumondegui O. Salivary epithelial-myoepithelial carcinomas of intercalated ducts: a clinical, electron microscopic, and immunocytochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 59(5): 482-90.
68. Luna MA, Wenig BM. Polymorphous low-grade adenocarcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. *World Health Organization Pathology and Genetics Head and Neck Tumours.* Lyons: IARC; 2005. p. 223-224
69. Malhotra KP, Agrawal V, Pandey R. High grade transformation in adenoid cystic carcinoma of the parotid: report of a case with cytologic, histologic and immunohistochemical study. *Head Neck Pathol.* 2009; 3(4): 310-4.
70. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):373-8.

71. Matsuba HM, Thawley SE, Simpson JR, Levine LA, Mauney M. Adenoid cystic carcinoma of major and minor salivary gland origin. *Laryngoscope*. 1984; 94(10): 1316-8.
72. Mishra R, Simonson M. Saturated free fatty acids and apoptosis in microvascular mesangial cells: palmitate activates pro-apoptotic signaling involving caspase 9 and mitochondrial release of endonuclease G. *Cardiovasc Diabetol*. 2005; 4(1): 2.
73. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 2001; 40(5): 325-438.
74. Muthusamy K, Halbert G, Roberts F. Immunohistochemical staining for adipophilin, perilipin and TIP47. *J Clin Pathol*. 2006; 59: 1166–1170.
75. Muthusamy K, Halbert G, Roberts F. Immunohistochemical staining for adipophilin, perilipin and TIP47. *J Clin Pathol*. 2006; 59(11): 1166–1170.
76. Nagao T, Gaffey TA, Kay PA, Unni KK, Nascimento AG, Sebo TJ et al. Dedifferentiation in low-grade mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland. *Hum Pathol*. 2003; 34(10): 1068-72.
77. Nagao T, Gaffey TA, Serizawa H, Sugano I, Ishida Y, Yamazaki K et al. Dedifferentiated adenoid cystic carcinoma: a clinicopathologic study of 6 cases. *Mod Pathol*. 2003;16(12):1265-72.
78. Nascimento AG, Amaral AL, Prado LA, Kligerman J, Silveira TR. Adenoid cystic carcinoma of salivary glands. A study of 61 cases with clinicopathologic correlation. *Cancer*. 1986; 57(2): 312-9.
79. Nikitakis N, Tosios KI, Papanikolaou VS, Rivera H, Papanicolau SI, Ioffe OB. Immunohistochemical expression of cytokeratins 7 and 20 in malignant salivary gland tumors. *Mod Pathol* 2004; 17(4): 407–415.
80. Ogawa I, Nishida T, Miyauchi M, Sato S, Takata T. Dedifferentiated malignant myoepithelioma of the parotid gland. *Pathol Int*. 2003; 53(10): 704-9.
81. Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands: a correlation of histologic features and clinical course. *Cancer*. 1978; 42(1): 265-82.
82. Peterson JA, Scallan CD, Ceriani RL, Hamosh M. Structural and functional aspects of three major glycoproteins of the human milk fat globule membrane. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2001; 501: 179-187.

83. Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol.* 2001; 152(5): 1057-70.
84. Price-Schiavi SA, Carraway CA, Fregien N, Carraway KL. Post-transcriptional regulation of a milk membrane protein, the sialomucin complex (Ascites sialoglycoprotein (ASGP)-1/ASGP-2, rat muc4), by transforming growth factor beta. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(52): 35228-37.
85. Robenek H, Robenek MJ, Troyer D. PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J Lipid Res.* 2005 Jun;46(6):1331-8. Epub 2005 Mar 1.
86. Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H et al. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 286(1): 176-83.
87. Sasaki E, Tsunoda N, Hatanaka Y, Mori N, Iwata H, Yatabe Y. Breast-specific expression of MGB1/mammaglobin: an examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB1-positive breast cancers. *Mod. Pathol.* 2007; 20(2): 208-214.
88. Savera AT, Sloman A, Huvos AG, Klimstra DS. Myoepithelial carcinoma of the salivary glands: a clinicopathologic study of 25 patients. *Am J Surg Pathol.* 2000; 24(6): 761-74.
89. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-22.
90. Seethala RR, Hunt JL, Baloch ZW, Livolsi VA, Leon Barnes E. Adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation: a report of 11 cases and a review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 2007; 31(11): 1683-94.
91. Shimizu M, Yamashita D, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T. Aspects of the regulatory mechanisms of PPAR functions: analysis of a bidirectional response element and regulation by sumoylation. *Mol Cell Biochem.* 2006; 286(1-2): 33-42.
92. Simpson RH, Pereira EM, Ribeiro AC, Abdulkadir A, Reis-Filho JS. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands with transformation to high-grade carcinoma. *Histopathology.* 2002; 41(3): 250-9.
93. Siriwardena BS, Tilakaratne WM, Rajapakshe RM. A case of sebaceous carcinoma of the parotid gland. *J Oral Pathol Med.* 2003 Feb;32(2):121-3.

94. Skálová A, Nagao T, Brandwein-Gensler MS. Salivary duct carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. World Health Organization Pathology and Genetics Head and Neck Tumours. Lyons: IARC; 2005. p. 236-237.
95. Skálová A, Sima R, Vanecek T, Muller S, Korabecna M, Nemcova J et al. Acinic cell carcinoma with high-grade transformation: a report of 9 cases with immunohistochemical study and analysis of TP53 and HER-2/neu genes. *Am J Surg Pathol.* 2009; 33(8): 1137-45.
96. Skálová A, Starek, Kucerova V, Szepe P, Plank L. Salivary duct carcinoma—a highly aggressive salivary gland tumor with HER-2/neu oncoprotein overexpression. *Pathol Res Pract.* 2001; 197(9): 621-626.
97. Skálová A, Vanecek T, Sima R, Laco J, Weinreb I, Perez-Ordóñez B et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34(5): 599-608.
98. Skálová A., Jäkel KT. Myoepithelial carcinoma. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. World Health Organization Pathology and Genetics Head and Neck Tumours. Lyons: IARC; 2005. p. 240-241
99. Stanley RJ, Weiland LH, Olsen KD, Pearson BW. Dedifferentiated acinic cell (acinous) carcinoma of the parotid gland. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1988; 98(2): 155-61.
100. Straub BK, Herpel E, Singer S, Zimbelmann R, Breuhahn K, Macher-Goeppinger S et al. Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis. *Mod Pathol.* 2010; 23(3): 480-92.
101. Strauss BL, Bratthauer GL, Tavassoli FA. STAT 5a expression in the breast is maintained in secretory carcinoma, in contrast to other histologic types. *Hum. Pathol.* 2006; 37(5); 586-592.
102. Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Care Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006; 9(4): 358-65.
103. Szanto PA, Luna MA, Tortoledo ME, White RA. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer.* 1984; 54(6): 1062-9.
104. Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem.* 2002; 277(46): 44507-12.

105. Tomich CE. Adenoid Cystic Carcinoma. In: Auclair PL, Ellis GL, Gnepp DR, editores. Surgical pathology of the salivary glands. Filadélfia: WB Saunders; 1991. v. 25. p. 333 -49.
106. Traub P, Perides G, Kühn S, Scherbarth A. Efficient interaction of nonpolar lipids with intermediate filaments of the vimentin type. *Eur J Cell Biol.* 1987; 43(1): 55-64.
107. Waldron CA, el Mofty SK, Gnepp DR. Tumors of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 66(3): 323-33.
108. Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene.* 2005; 24(22): 3574-82.
109. Welte MA. Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol.* 2007; 17(8): 363-9.
110. Wenig BM, Gnepp DR. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary glands. In: Auclair PL, Ellis GL, Gnepp DR, editores. Surgical pathology of the salivary glands. Filadélfia: WB Saunders; 1991. v. 25. p. 390 -411.
111. Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bickel PE. S3-12, adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280(19): 19146-55.
112. Wolins NE, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bensch KG, Bickel PE. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem.* 2003; 278(39): 37713-21.
113. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(2): 162-76.
114. Xu G, Sztalryd C, Londos C. Degradation of perilipin is mediated through ubiquitination-proteasome pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1761(1): 83-90.
115. Xu G, Sztalryd C, Lu X, Tansey JT, Gan J, Dorward H et al. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem.* 2005; 280(52): 42841-7.
116. Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H et al. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2009; 50(1): 100-10.

117. Yao M, Huang Y, Shioi K, Hattori K, Murakami T, Nakaigawa N et al. Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(1): 152-60.
118. Yao M, Tabuchi H, Nagashima Y, Baba M, Nakaigawa N, Ishiguro H et al. Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J Pathol.* 2005; 205(3): 377-87.
119. Yaqoob P. Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends Immunol.* 2003; 24(12): 639-45.
120. Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM et al. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 1998; 152(3): 759-69.
121. Yu W, Cassara J, Weller PF. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood.* 2000; 95(3): 1078-85.

## ANEXO

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP (CAMPUS  
CAMPINAS)



### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Gotas lipídicas intracitoplasmáticas em tumores de glândulas salivares. Estudo imunohistoquímico

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 06683312.8.0000.5404

**Pesquisador:** Harim Tavares dos Santos

**Instituição:** Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP  
(Campus Campinas)

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 100.234

**Data da Relatoria:** 25/09/2012

**Apresentação do Projeto:**

Gotas lipídicas intracitoplasmáticas em tumores de glândulas salivares. Estudo imunohistoquímico

**Objetivo da Pesquisa:**

Verificar a frequência e quantidade das GLs em carcinomas salivares subdivididos quanto ao tipo histológico, índice de proliferação celular e comparar as áreas diferenciadas e pouco diferenciadas nos carcinomas salivares com transformação para alto grau.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Não há riscos ou desconfortos previsíveis ao sujeito, uma vez que se trata de estudo a partir de material previamente coletado (amostras histológicas em blocos de parafina).

**Benefícios:**

Não há benefício direto ao sujeito, havendo potenciais benefícios sociais pela construção do conhecimento como um todo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Todas as células são capazes de armazenar lipídios em estruturas intracelulares, dinâmicas e multifuncionais, denominadas gotas lipídicas (GLs).

Estruturalmente observa-se um centro lipídico coberto por fosfolípidos e diversas proteínas, sendo adipophilin, a principal delas. O aumento da lipogênese, fenômeno importante para a independência tumoral, tem sido observado em vários carcinomas humanos, como o de cólon, renal, hepático, entre outros. Nestes, o perfil lipogênico evidenciado pelo acúmulo de GLs citoplasmáticas tem sido associado com fenotipo tumoral e comportamento biológico. Em alguns carcinomas de glândulas salivares com diferenciação sebácea, como carcinoma sebáceo e infundibulocarcinoma sebáceo, os depósitos lipídicos já são conhecidos. No entanto, mesmo na ausência de diferenciação sebácea, GLs já foram detectadas em outros tumores salivares, como o carcinoma de células acinares. Historicamente, a identificação de lipídeos intracelulares era viável

somente através do uso de material fresco e estudos ultraestruturais. Entretanto, atualmente, a principal proteína da cobertura das GLs, a adipophilin, pode ser detectada em material parafinado, através de imunohistoquímica. Portanto, o objetivo deste estudo é analisar a imunoposição de adipophilin em diferentes subtipos histológicos de carcinomas de glândulas salivares, com a finalidade de analisar a frequência de GLs

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-487

**UF:** SP **Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-4036 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

citoplasmáticas e sua possível associação com morfologia tumoral, grau de diferenciação e proliferação celular.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto da CONEP com assinatura da pesquisadora responsável e do diretor da FCM/Unicamp, complementada por carta de autorização do responsável pelo setor de Anatomia Patológica do HC/Unicamp. Foi solicitada dispensa do TCLE por se tratar de estudo a partir de amostras previamente coletadas. O presente projeto encontra-se nos termos das Resoluções 196/96 e 251/97, e é importante para a avaliação e estudo em tumores de glândulas salivares. Estudo imunohistoquímico

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado com dispensa do TCLE.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

CAMPINAS, 18 de Setembro de 2012.

---

Assinado por:  
Carlos Eduardo Steiner