

MARCIA GIMENES AMERICO

**DENSIDADE MICROVASCULAR LINFÁTICA E
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM NEOPLASIAS DE
GLÂNDULAS SALIVARES**



2012

MARCIA GIMENES AMERICO

**DENSIDADE MICROVASCULAR LINFÁTICA E PROLIFERAÇÃO
CELULAR EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Titular Yasmin Rodarte Carvalho
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos
2012

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

A35d Americo, Marcia Gimenes
Densidade microvascular linfática e proliferação celular em neoplasias de
glândulas salivares / Marcia Gimenes Americo. - São José dos Campos : [s.n.],
2012.
76.f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal)– Faculdade de Odontologia de
São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.
Orientador: Prof. Titular Yasmin Rodarte Carvalho
Co-orientadora: Profa Dra Renata Falchete do Prado.

1. Glândula salivar. 2. Linfangiogênese. 3. Imuno-histoquímica I. Carvalho,
Yasmin Rodarte. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP -
Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita
Filho". IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD79

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 11 de Setembro de 2012.

Assinatura :

E-mail: gimenesgimenes@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profª Tit. Yasmin Rodarte Carvalho (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

Profª Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

Profª Dra. Ana Cristina Posch Machado

São José dos Campos, 11 de setembro de 2012.

Dedicatória

*Dedico esse trabalho ao Meu Maior Mestre. **Jesus!** Obrigada por seus ensinamentos, pela sua presença em minha vida que me faz aprender sempre e me estimula a nunca desistir.*

*Aos meus queridos pais, **Luiz** e **Celia**, que me deram a vida, a educação, o provimento, mas acima de tudo o carinho e o apoio incondicional às minhas decisões. Desculpem-me por todas as vezes que eu deixei de dizer que os amo.*

*Aos meus irmãos, **Sergio**, **Luiz** e **Marcel**, meus melhores amigos, que souberam compreender por muitas vezes a minha ausência, mas sempre me incentivaram nas minhas buscas e mesmo de longe sempre se preocuparam comigo.*

*Ao meu amado marido **Del**. Um grande companheiro que soube ter paciência e compreensão nesta pequena etapa da minha vida. Obrigada pela sua confiança e carinho. Que Deus abençoe nossa pequena família.*

*Às crianças da família, **Juliana**, **Mateus** e **Eduardo** (meu querido filhinho) que ainda está por vir. Muito obrigada pela felicidade que vocês me proporcionam.*

*À doce amiga **Hilmar** pela confiança em mim depositada. Muito obrigada.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profª Tit. Yasmin Rodarte Carvalho**, pela orientação, amizade, tranquilidade e confiança em meu trabalho.

À **Profª Drª Renata Falchete do Prado**, minha co-orientadora, pela intensa dedicação e competência.

Ao **Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa** pela colaboração e amizade no transcurso da elaboração desse trabalho.

À **Micheline**, uma grande companheira, na qual pude contar dentro e fora do ambiente acadêmico se tornando uma grande amiga.

À aluna de graduação, **Aline Junia**, estimada colega com que pude contar nas etapas laboratoriais desta pesquisa. Obrigada.

Agradecimentos Institucionais

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Diretor da FOSJC **Carlos Augusto Pavanelli** pelo incentivo ao ensino e pesquisa.*

*Aos **docentes** do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal pelo convívio, colaboração e, acima de tudo, pelo ensinamento.*

*A todos os **colegas de Pós-Graduação** pela amizade e experiências compartilhadas.*

*Às amigas e técnicas **Ana Lourdes da Silva Machado** e **Maria Salete Faria**, pelo apoio nas fases laboratoriais.*

*Aos funcionários da Pós-Graduação **Rose, Erena, Bruno** e **Ivan** pela paciência, educação e atenção dispensadas.*

*“Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante
do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo...”*

(Raul Seixas)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	08
RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Neoplasias de glândulas salivares.....	13
2.2 Ki-67	19
2.3 Linfangiogênese	21
2.4 Fator de crescimento vascular endotelial – VEGF-C	22
2.5 Marcadores endoteliais linfáticos.....	23
2.6 Densidade microvascular linfática	24
3 PROPOSIÇÃO.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Amostra e seleção dos casos.....	27
4.2 Reação imuno-histoquímica	28
4.3 Análise do Ki-67	31
4.4 Análise da expressão do D2-40 e DML.....	32
4.5 Análise do VEGF-C	33
4.6 Análise estatística.....	33
5 RESULTADO.....	35
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	60
8 REFERÊNCIAS	62
APÊNDICES	70
ANEXO	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm = micrômetro

BM= banho Maria

BSA = soroalbumina bovina

D2-40 = anticorpo monoclonal contra a podoplanina

DAB = tetrahidrocloro de diaminobenzidina

DML = densidade microvascular linfática

DMV = densidade microvascular sanguínea

FOSJC = Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

HE = hematoxilina e eosina

Ki-67 = Antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal MIB-1

LSAB = complexo terciário streptavidina-biotina-peroxidase

LYVE-1 = receptor 1 do endotélio vascular linfático

pH = potencial hidrogeniônico

TA = temperatura ambiente

VEGF C= fator de crescimento endotelial vascular do tipo C

VEGF D= fator de crescimento endotelial vascular do tipo D

VEGFR-3 = Receptor para o fator de crescimento endotelial vascular do tipo 3

Americo MG. Densidade microvascular linfática e proliferação celular em neoplasias de glândulas salivares [dissertação], São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

As neoplasias de glândulas salivares compreendem cerca de 5% das neoplasias da região oral e maxilofacial. O estudo sobre a linfangiogênese pode permitir a melhor compreensão destas patologias. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre as características histológicas, a expressão do fator de crescimento vascular endotelial linfático (VEGF-C), a densidade microvascular linfática (DML) e a proliferação celular, em neoplasias de glândulas salivares. Foram analisados 67 casos de neoplasias benignas e malignas dos arquivos do Laboratório de Patologia da FOSJC-UNESP. O diagnóstico das lesões foi confirmado pela análise de lâminas coradas por HE. O material foi submetido à reação imuno-histoquímica para avaliar a proliferação celular pela detecção do Ki-67, da DML pelo D2-40 e do VEGF-C pelo anticorpo anti-VEGF-C. Foi realizada análise quantitativa da DML e do índice de proliferação celular e semi-quantitativa do VEGF-C. Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial utilizando o programa Minitab (versão 16.0), sendo aplicados os testes de *Pearson*, *Kruskal Wallis* e *t-Student*, adotando-se o nível de significância de 5%. Analisando as lesões separadamente, não houve significância na comparação entre o índice de proliferação celular e a DML com relação à expressão de VEGF-C, exceto no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, em que maior proliferação foi observada nos casos com forte marcação para VEGF-C. Em nenhuma neoplasia foi observada correlação entre o índice de proliferação celular e a DML. Comparando-se os grupos das neoplasias benignas (25 casos) e malignas (42 casos), verificou-se que o índice de marcação para o Ki-67 e a DML não apresentaram diferença estatística significativa e que houve maior expressão de VEGF-C em neoplasias benignas. Concluiu-se que na maioria dos tumores de glândula salivar não há relação entre o índice de proliferação celular, a expressão do VEGF-C e a DML, e que a proliferação celular não se correlaciona com a DML. Entre as neoplasias benignas e malignas o índice de proliferação celular e a DML são semelhantes.

Palavras chaves: Neoplasias. Linfangiogênese. Imuno-histoquímica.

Americo MG. *Lymphatic microvessel density and cell proliferation in salivary gland neoplasms* [dissertation] São José dos Campos: School of dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

ABSTRACT

The salivary gland neoplasms comprise about 5% of all cancers of the oral and maxillofacial region. The study of lymphangiogenesis may provide a better understanding of these diseases. The aim of this study was to evaluate the relationship among histological features, expression of lymphatic vascular endothelial growth factor (VEGF-C), lymphatic vessel density (LVD) and cell proliferation in salivary gland neoplasms. Sixty seven cases of benign and malignant neoplasms of the Laboratory of Pathology FOSJC-UNESP were analyzed. The diagnosis of the lesions were confirmed by analysis of slides stained with HE. The material was subjected to immunohistochemical staining to evaluate cell proliferation by detection of Ki-67, LVD by D2-40 and VEGF-C by anti-VEGF-C. Quantitative analysis of LVD and cell proliferation index and semi-quantitative analysis of VEGF-C were performed. The results were analyzed by descriptive and inferential statistics using Minitab (version 16.0), applying Pearson, Kruskal Wallis and t-test, with a significance level of 5%. Analyzing the lesions separately, there was no significance when comparing cell proliferation index and LVD to the expression of VEGF-C, except in polymorphous low grade adenocarcinoma, in which a higher proliferation index was observed in cases with strong staining of VEGF-C. There was no correlation between cell proliferation and LVD in any neoplasm. Comparing the groups of benign (25 cases) and malignant neoplasms (42 cases), the labeling index for Ki-67 and LVD showed no statistically significant difference and there was increased expression of VEGF-C in benign lesions. It was concluded that in the majority of salivary gland neoplasms there is no relation among the rate of cell proliferation, the expression of VEGF-C and LVD and that the cellular proliferation does not correlate with the LVD. Between benign and malignant neoplasms, cell proliferation rate and LVD are similar.

Keywords: Neoplasms. Lymphangiogenesis. immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândulas salivares compreendem cerca de 5% das neoplasias da região oral e maxilofacial (Long-jiang et al., 2008) e 0,3% de todas as malignidades (Barnes et al., 2005). As lesões benignas são as mais comuns (Ito, 2005; Tian et al., 2010) predominando tanto nas glândulas salivares maiores (Tian et al., 2010), quanto nas glândulas salivares menores (Loyola et al. 1995).

De acordo com a literatura, formam grupos complexos, apresentando histologia, morfologia e comportamentos biológicos diversos. A classificação histológica pode apresentar dificuldades devido a essas variantes (Barnes et al., 2005).

Os tumores de glândulas salivares apresentam três tipos de células epiteliais que, sozinhas ou em conjunto, formam a base etiopatogênica de tais neoplasias. São elas as células acinares, ductais e mioepiteliais (Leivo, 2006). A participação das células mioepiteliais nos tumores justificaria a sua grande diversidade morfológica, mesmo considerando-se um tipo tumoral específico (Dardick, Van Nostrand, 1987). Pela teoria bicelular semipluripotencial, a célula de reserva do ducto excretor glandular daria origem às células colunares e escamosas do ducto excretor e à célula do ducto intercalar e esta, uma vez gerada, daria origem aos ductos estriados, a outras células do ducto intercalar, a células acinares e a células mioepiteliais, independentemente. A célula do ducto intercalar assumiria então papel primário no fornecimento de outros tipos celulares, o que seria influenciado pelo mesênquima. (Eversole, 1971).

A complexidade do grupo de neoplasias salivares está ilustrada na classificação de tumores de glândulas salivares da Organização mundial da Saúde, em que mais de trinta tipos diferentes de

tumores estão incluídos (Barnes et al., 2005).

O marcador de proliferação celular Ki-67 tem sido vastamente estudado, sendo sua marcação imuno-histoquímica frequentemente correlacionada com o curso clínico das neoplasias. Os melhores exemplos deste contexto são encontrados nos estudos de câncer de mama e de próstata (Scholzen, Gerdes, 2000).

Prado et al., 2011, relataram que muitos autores têm avaliado a atividade das células em proliferação pela marcação imuno-histoquímica do Ki-67 em tumores de glândulas salivares, tanto para diferenciar entre neoplasias benignas e malignas quanto para avaliar o prognóstico de neoplasias malignas.

A disseminação de células neoplásicas malignas de um sítio primário para tecidos vizinhos e órgãos distantes, via sanguínea ou linfática, é característica de progressão tumoral (Staker et al., 2002). Logo, a metástase é uma importante ferramenta prognóstica nos tumores de cabeça e pescoço, incluindo as neoplasias de glândulas salivares (Mello et al., 2011).

A capacidade das células tumorais de induzir linfangiogênese, proliferação dos vasos linfáticos, pode estar relacionada à disseminação de células neoplásicas por via linfática (He et al., 2002). Portanto, a linfangiogênese é considerada um processo importante no desenvolvimento de metástases tumorais (Stacker et al., 2002; Franchi et al., 2004; Dadras et al., 2005; Gombos et al., 2005).

É de grande importância avaliar a atividade proliferativa celular para o entendimento biológico das neoplasias de glândulas salivares e a linfangiogênese como fator prognóstico para o desenvolvimento de metástases linfonodais. Diante disto, este estudo objetiva analisar a relação entre os aspectos histológicos, a proliferação celular, o fator de crescimento endotelial linfático e a formação de vasos linfáticos em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Neoplasias de Glândulas Salivares

A revisão de grandes séries de neoplasias de glândulas salivares mostra que 64% a 80% dos tumores primários de origem epitelial ocorrem em parótida, 7% a 11% em glândula submandibular, menos de 1% em glândula sublingual e de 9% a 23% em glândulas salivares menores (Eneroth, 1971; Spiro, 1986).

Quanto à sua natureza, de 54% a 79% das neoplasias de glândulas salivares são benignas e de 21% a 46% são malignas (Everson, Cawson, 1985; Ellis, Auclair, 1996; Ribeiro et al., 2002).

O pico de incidência encontrado entre as neoplasias malignas está entre a sexta e sétima década de vida. Entre as neoplasias benignas, a maior incidência ocorre entre a segunda e a quinta década de vida (Nagler, Laufer, 1997; Ito et al., 2005).

Num estudo retrospectivo de 6.982 casos de neoplasias de glândulas salivares realizado no leste da China por Tian e colaboradores em 2010, foi observado que o pico de incidência ocorreu na quarta década de vida, na qual se encontravam 46% dos casos, sendo 22% de lesões benignas e 24% de malignas.

O gênero feminino é afetado mais frequentemente que o masculino, mas há certa variação do gênero de acordo com o tipo do tumor (Everson, Cawson, 1985; Spiro, 1986; Ellis et al., 1991). No trabalho de Satko et al. (2000) foram encontrados 537 tumores de glândulas salivares em mulheres (52,6%) e 484 em homens (47,4%) com uma proporção de 1,1:1. Williams e colaboradores, em 2001, relataram que 59,4% dos tumores ocorreram em mulheres e os outros 40,6% em homens, com uma proporção de mulheres: homens de 1,46:1.

A neoplasia de glândula salivar mais comum é o adenoma pleomórfico representando aproximadamente 53% a 77% dos tumores de parótida, 44% a 68% dos tumores de glândula submandibular e 33% a 43% dos tumores de glândula salivar menor. O palato é a localização mais comum, quando acomete glândula salivar menor, representando aproximadamente 50% dos exemplares intraorais, seguido pelo lábio superior (27%) e pela mucosa jugal (17%) (Neville et al., 2009).

O adenoma pleomórfico apresenta uma grande diversidade morfológica e é composto de uma mistura de epitélio glandular e células mioepiteliais permeados por um fundo semelhante a mesênquima com proporções variadas (Barnes et al., 2005).

Os principais problemas associados ao adenoma pleomórfico são risco de recorrência e possibilidade de transformação maligna (Seifert, Sobin, 1992).

Apesar das células mioepiteliais comporem uma grande variedade de neoplasias de glândulas salivares, os tumores que exibem quase inteiramente células de fenótipo mioepitelial, são chamados de mioepiteliomas. As células podem assumir os seguintes aspectos: plasmocitoides, epitelioides, poligonais, basaloides, claras, fusiformes e oncocitoides, com diferentes arranjos e combinações (Gnepp, 2009).

O critério para distinguir adenoma pleomórfico com predominância de células mioepiteliais do mioepitelioma é subjetivo. Quando de 1% a 2% do tumor é composto por estruturas ductiformes, é diagnosticado como mioepitelioma (Gnepp, 2009).

Dentre as neoplasias malignas de glândula salivar, o carcinoma adenóide cístico, o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e o carcinoma mucoepidermoide são as mais comuns (Neville et al., 2009).

O carcinoma mucoepidermoide é o tumor maligno de glândula salivar mais comum, representando cerca de 15% a 30% dos tumores e o segundo tumor de glândula salivar mais frequente, ficando atrás somente do adenoma pleomórfico (Wahlberg et al., 2002).

Entretanto, os estudos britânicos têm demonstrado uma frequência relativamente menor. Talvez haja uma diferença geográfica verdadeira na prevalência desta lesão (Luksic et al., 2011).

A origem do carcinoma mucoepidermoide é epitelial, presumidamente de células de reserva do ducto excretor (Eversole, 1971). É composto por variada proporção de células mucosas, epidermóides, intermediárias, colunares e claras. Pode demonstrar um proeminente crescimento cístico, particularmente nos tumores de baixo grau de malignidade (Ellis, Auclair, 1996).

Para melhor relacionar o prognóstico do carcinoma mucoepidermoide, dois grupos de pesquisadores propuseram sistemas de gradação baseados em observações microscópicas relevantes. Auclair et al. (1992), pontuaram os seguintes parâmetros: componente intracístico, presença de invasão neural, necrose e anaplasia e contagem de figuras de mitose. Brandwein et al. (2001), estabeleceram um sistema de gradação modificado (grau I, II e III). Atribuíram valores pontuais para os seguintes parâmetros: componente intracístico, atipia nuclear pronunciada, invasão linfática/vascular e óssea, disseminação perineural, necrose, figuras de mitose e se o fronte tumoral invade em pequenos cordões e ilhas.

Segundo Neville et al. (2009), a quantidade de formação cística, o grau de atipia celular e o número relativo de células mucosas, epidermóides e intermediárias podem ser usados como critério para classificar o carcinoma mucoepidermoide em três graus histopatológicos: baixo grau, alto grau e grau intermediário. O prognóstico para pacientes com tumores de alto grau é reservado, com somente 30% a 54% de sobrevivência.

O carcinoma adenoide cístico pode ocorrer em qualquer glândula salivar, mas aproximadamente 50% a 60% originam-se nas glândulas salivares menores. O palato é a localização mais comum para as lesões de glândula salivar menor. Os demais tumores são encontrados

principalmente nas glândulas parótida e submandibular (Neville et al., 2009).

A origem do carcinoma adenoide cístico é epitelial. Presumidamente, é formado a partir de células do ducto intercalar (Dardick, Van Nostrand, 1987). O tumor é predominantemente composto de células mioepiteliais, mas pode apresentar células com diferenciação ductal. O padrão microscópico clássico é conhecido como cribriforme. No entanto, outros dois padrões, chamados de tubular e sólido, também podem ser observados (Ellis, Auclair, 1996).

É caracterizado por demonstrar tendência à recidiva local (Gnepp, 2009), além de invasão perineural, o que provavelmente justifica o achado clínico de dor nos pacientes (Neville et al., 2009). Entretanto, a influência da invasão perineural na sobrevida dos pacientes é contraditória (Barnes et al., 2005).

A incidência de metástases à distância é maior que nos linfonodos locais (Neville et al., 2009; Gnepp, 2009). Apresentam-se em aproximadamente 25% a 55% dos casos. O pulmão seguido dos ossos, cérebro e fígado são os sítios mais comuns e somente 20% destes pacientes sobrevivem em cinco anos (Barnes et al., 2005).

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau é um tumor quase exclusivo de glândulas salivares menores. Entretanto, raros exemplos têm sido relatados nas glândulas maiores, tanto surgindo *de novo* ou como um componente maligno de um carcinoma ex-adenoma pleomórfico (Neville et al., 2009).

As células tumorais do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau têm uma aparência uniforme, mas podem exibir diferentes padrões de crescimento, de onde vem o termo “polimorfo”. Podem formar um padrão sólido, cordões, ductos ou grandes espaços císticos. A presença de figuras de mitose é incomum (Leivo, 2006). Presumivelmente, esta neoplasia é formada de células originadas do segmento do ducto intercalar (Dardick, Van Nostrand, 1987).

Apesar das evidências microscópicas de invasão, os adenocarcinomas polimorfos de baixo grau possuem baixa capacidade para metástase (10%), ocorrendo apenas em nódulos linfáticos regionais (Seifert, Sobin, 1992).

O carcinoma de células acinares é uma neoplasia epitelial maligna de glândulas salivares com células que exibem diferenciação acinar serosa. Células salivares ductais também compõem este neoplasma. Cerca de 85% ocorre na glândula parótida, um achado racional tendo em vista que a parótida é a maior glândula salivar e inteiramente composta por elementos serosos. As glândulas salivares menores são envolvidas em 17% dos casos, cerca de 4% acometem a submandibular e menos de 1% ocorrem na glândula sublingual (Barnes et al., 2005).

Quanto à epidemiologia, o carcinoma de células acinares afeta predominantemente mulheres, não há predileção por nenhum grupo étnico e pode ocorrer em todas as idades, inclusive em crianças (Seifert, Sobin, 1991; Gnepp, 2009). Provavelmente sua origem seja das células do ducto intercalar (Eversole, 1971; Gnepp, 2009).

O carcinoma de células acinares apresenta um amplo espectro de características histopatológicas. Os padrões de crescimento podem ser descritos como: sólido, microcístico, cístico-papilar e folicular. As células são caracterizadas como: acinares, semelhantes ao ducto intercalar, vacuoladas, claras e inespecíficas. Os padrões morfológicos e os tipos celulares podem ser encontrados isoladamente ou em conjunto no mesmo tumor (Seifert, Sobin, 1991). As células mioepiteliais não participam desta neoplasia (Gnepp, 2009).

Em relação ao prognóstico do carcinoma de células acinares, o grau de células com diferenciação acinar ou os vários padrões de crescimento não influenciam no prognóstico (Dardick, 1996), que depende da invasão local e da adequada remoção cirúrgica da lesão (Seifert, Sobin, 1992). Aproximadamente um terço dos pacientes tem

recidivas locais, e as metástases desenvolvem-se em 10% a 15% dos pacientes. O óbito ocorre em 6% a 26% dos pacientes. O prognóstico para os tumores de glândula salivar menor é melhor do que o prognóstico dos tumores originários das glândulas salivares maiores. Esta lesão está associada aos melhores prognósticos dos tumores malignos de glândulas salivares (Neville et al., 2009).

O carcinoma em adenoma é definido como um adenoma pleomórfico que se apresenta com malignização epitelial. Este grupo conta com cerca de 95% das malignizações ocorridas nos adenomas pleomórficos (Gnepp, 2009). Provavelmente resulta do acúmulo de instabilidades genéticas em adenomas pleomórficos com longo tempo de evolução (Barnes et al., 2005). Em 75% dos casos, são as células epiteliais luminais que sofrem malignização, em 19% dos casos ocorre diferenciação em células epiteliais e mioepiteliais enquanto que em 6% apenas as células mioepiteliais que sofrem alterações malignas (Cheuk, Chan, 2007).

Epidemiologicamente, o carcinoma em adenoma surge em 6,2% dos pacientes com adenomas pleomórficos de uma década de existência. O pico de incidência é na sexta e sétima década de vida (Barnes et al., 2005).

Histologicamente, o carcinoma em adenoma pode mostrar áreas de adenoma pleomórfico típicas em grande parte ou em pequenas porções da lesão. No interior da lesão há áreas de degeneração maligna do componente epitelial com padrão de crescimento infiltrativo ou como um pequeno foco no centro de um tumor misto encapsulado (Neville, 2009).

Apesar das degenerações malignas, o critério de diagnóstico mais confiável é o padrão destrutivo de crescimento que se relaciona diretamente com o prognóstico. Sendo assim, os carcinomas em adenomas são divididos nos seguintes grupos: não invasivo, minimamente invasivo ($\leq 1,5$ milímetros de penetração do componente

maligno dentro do tecido extra capsular) e invasivo ($> 1,5$ milímetros de invasão da cápsula tumoral para os tecidos adjacentes). Os dois primeiros grupos geralmente têm um excelente prognóstico. Os dois últimos grupos têm um prognóstico mais reservado (Barnes et al., 2005) e possibilidades entre 40% a 50% dos pacientes vivenciarem uma ou mais recidivas (Gnepp, 2009). Metástases locais ou distantes variam de acordo com a severidade do grupo em que estão classificados os tumores. Os sítios acometidos mais comumente são: pulmão, ossos, abdômen e sistema nervoso central.

2.2 Ki-67

O anticorpo Ki-67 é um marcador que reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular das células proliferantes. É expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em seu estado quiescente (G0) (Gerdes et al., 1984). Com a progressão do ciclo celular, a expressão antigênica aumenta, alcançando um pico nas fases G2 e M (Sasaki et al., 1987).

É considerado um marcador de proliferação celular, frequentemente utilizado para estimar a fração de crescimento de tumores. Entretanto, existem certas dificuldades em definir o que seja uma célula proliferativa, pois o tempo entre as mitoses pode variar consideravelmente. Desta forma, o marcador poderia ser detectado sem que a célula estivesse de fato em proliferação (van Oijen et al., 1998).

O Ki-67 é, teoricamente, um parâmetro do estado fisiológico da célula, porém, não da sua capacidade de proliferação. É, entretanto, considerado o melhor marcador de proliferação por ter sido encontrada forte correlação entre este e o prognóstico de diversos tumores. Contudo, apesar destas considerações, a função biológica do Ki-

67 ainda permanece obscura (Scholzen, Gerdes, 2000).

Uma correlação significativamente alta entre o Ki-67 e características histopatológicas de malignidade tem sido relatada em tumores de glândulas salivares (Zhu et al., 1999; Lazzaro Cleveland, 2000; Alves et al., 2004). Em carcinomas mucoepidermóides, a expressão de Ki-67 tem sido correlacionada à agressividade, comportamento maligno, diminuição da sobrevida e pior prognóstico. Além disso, o aumento de sua expressão parece estar relacionado ao grau histológico e pode eventualmente ser útil para determinar se um tumor de grau intermediário pode se comportar como um tumor de baixo ou alto grau de malignidade (Skalova et al., 1994; Hicks, Flaitz, 2000; Okabe et al., 2001).

Num estudo comparando a expressão do Ki-67 em carcinomas de células acinares e carcinomas mucoepidermóides, Skalova et al. (1994), encontraram uma associação do marcador com o aspecto clínico e gradação histológica das neoplasias, concluindo que este marcador pode ser útil na detecção das lesões de comportamento clínico mais agressivo.

No estudo de Perez et al. (2004), foram observados através de imuno-histoquímica 53 casos de tumores de glândula salivar em crianças e adolescentes. Destes, metade era maligno e metade benigno. Não houve correlação entre a expressão do Ki-67 e o prognóstico de malignidade, visto que casos de recorrência e morte não mostraram padrão imuno-histoquímico diferente daqueles com evolução favorável.

Em estudo comparativo entre diversas neoplasias glandulares, Prado e colaboradores em 2011 observaram que houve maior expressão do Ki-67 no carcinoma mucoepidermoide, que demonstrou alto índice proliferativo, seguido pelo carcinoma adenoide cístico e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau.

2.3 Linfangiogênese

A linfangiogênese, proliferação de vasos linfáticos, no estroma de neoplasias tem sido correlacionada com metástases linfonodais e progressão tumoral (Stacker et al., 2002; Franchi et al., 2004; Dadras et al., 2005; Gombos et al., 2005).

Apesar da metástase nos linfonodos locais e distantes representar um evento comum na disseminação de tumores sólidos (Stacker et al., 2002), o mecanismo da metástase linfática ainda é pouco entendido (He et al. 2005).

Soares et al. (2007), realizaram um estudo comparando a linfangiogênese e a densidade vascular linfática em adenomas pleomórficos e carcinomas em adenomas. Verificaram que na comparação com glândulas salivares adjacentes, nenhuma das lesões apresentou aumento da densidade vascular linfática intra e peritumoral. Os vasos linfáticos intra e peritumorais eram preexistentes. Em adição os marcadores não mostravam proliferação linfática, contrastando com a forte marcação de proliferação celular pelo Ki-67 nas adjacências do tumor. Os resultados sugerem que não ocorre linfangiogênese, ou ocorre minimamente, durante o processo de progressão maligna do adenoma pleomórfico. Um dado relevante é que foi observada embolia de células metastáticas em vasos linfáticos intra e peritumorais nos carcinomas em adenomas altamente invasivos promovendo metástase.

Carcinomas em adenomas são como câncer de mama, em que a linfangiogênese ocorre minimamente no processo de malignização. Porém, diferem de carcinoma espinocelular e melanoma, nos quais a proliferação intratumoral de vasos linfáticos é observada. Estas descobertas levam à hipótese de que as células específicas de cada neoplasia são responsáveis pela ativação ou não da linfangiogênese (Soares et al., 2007).

2.4 Fator de Crescimento Vascular Endotelial – VEGF-C

Dois fatores de crescimento têm sido implicados na indução de linfangiogênese. São eles, VEGF-C e VEGF-D (fatores de crescimento vascular endotelial C e D). Ambos são primeiramente produzidos como um pré-pro-poli-peptídeo que através de um processo proteolítico aumenta sua especificidade ao receptor VEGFR-3 (receptor para o fator de crescimento vascular endotelial-3) (Stacker et al., 2002). O VEGFR-3 é um dos primeiros receptores linfáticos identificados e funciona como sinalizador para VEGF-C e D. É expresso nas células endoteliais de vasos linfáticos em desenvolvimento e maduros e em tumores associados a vasos sanguíneos (He et al. 2004).

A habilidade de células tumorais de espalharem-se por via linfática depende em parte da capacidade de expressão de VEGF-C e D (Stacker et al., 2002).

He et al., em 2002, induziram a expressão de VEGF-C por transfecção de genes em linhagens de células de tumor de pulmão pobremente metastatizante e inocularam estas células em tecido subcutâneo de camundongos. Observaram que houve indução intra e peritumoral de vasos linfáticos, mas não foi detectada metástase linfonodal. Isto sugere que a alta expressão de VEGF-C na linhagem celular pouco metastatizante não foi suficiente para converter estas células para um fenótipo altamente metastatizante. Concluíram que fatores adicionais também devem regular o fenótipo metastático.

Segundo Cao (2005), a linfangiogênese é regulada por muitos fatores de crescimento, entre os quais o VEGF-C que tem um papel chave. Porém, a contribuição desse fator de crescimento para a densidade vascular linfática e para a metástase nos carcinomas de glândulas salivares ainda tem que ser investigada.

2.5 Marcadores endoteliais linfáticos

A identificação de diferentes marcadores endoteliais linfáticos tem facilitado o estudo da linfangiogênese. Não há marcadores inteiramente específicos para células endoteliais linfáticas, mas podem ser usados sozinhos ou em conjunto para estudar a presença de vasos linfáticos em neoplasias e sua associação com metástase (He et al. 2004).

O receptor LIVE-1(receptor 1 do endotélio vascular linfático) tem sido usado como marcador endotelial específico para identificar vasos linfáticos em tecidos normais e associados a neoplasias. Também é expresso nas células endoteliais sinusoidais em fígado (He et al. 2004).

A podoplanina, uma proteína da membrana celular primeiramente identificada em células epiteliais glomerulares, é expressa em células endoteliais linfáticas (He et al. 2004). O anticorpo contra a podoplanina é um dos mais específicos marcadores endoteliais (Evangelou et al., 2005), contudo a proteína é expressa em células endoteliais de vasos sanguíneos da pele (He et al., 2004), células da camada basal do epitélio (Schacht et al., 2005), células mioepiteliais (Soares et al., 2007), e basais de ductos glandulares (Fujita et al., 2011), entre outras.

A ocorrência precoce da expressão da podoplanina no desenvolvimento tumoral, a forte associação entre sua alta expressão e o desenvolvimento do carcinoma e ainda seu papel na invasão celular revelados em experimentos *in vitro*, sugerem que a podoplanina pode ser usada como um biomarcador para avaliação do risco do carcinoma bucal (Kawaguchi et al., 2008).

O anticorpo D2-40 é um anticorpo contra a podoplanina disponível comercialmente. É um anticorpo monoclonal considerado de

alta especificidade que reconhece a podoplanina humana, podendo ser usado como rotina em estudos de imuno-histoquímica de células endoteliais linfáticas. Não marca vasos sanguíneos (Schacht et al., 2005).

A linfangiogênese foi investigada em carcinoma mucoepidermoide para analisar a expressão e quantificar os vasos linfáticos através da marcação imuno-histoquímica com o anticorpo D2-40. Além da reação dos vasos linfáticos, mostrou discreta expressão contra células mioepiteliais de tecido glandular normal adjacente à massa tumoral e nas células que compõem a lesão, revelando dois padrões diferentes. Um restrito às células da periferia do tumor e outro envolvendo a periferia, células epidermóides e intermediárias do tumoral (Gleber-Netto, et al., 2012).

2.6 Densidade microvascular linfática

A angiogênese tumoral em carcinoma de mama foi quantificada histologicamente por Weidner et al. (1991), em estudo imuno-histoquímico que avaliou a expressão do fator VIII nos vasos sanguíneos. Os autores quantificaram o número de microvasos na área mais vascularizada do tumor (*hot spot*), determinando a densidade microvascular sanguínea (DMV).

Assim como a angiogênese, a linfangiogênese tumoral também pode ser quantificada, sendo determinada como densidade microvascular linfática (DML) (Mohammad, 2008).

Os vasos linfáticos propiciam a metástase linfonodal nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, portanto a DML é considerada uma medida importante, pois a alta densidade parece ser um indicativo do risco de metástase linfática em tais carcinomas (Audet, 2005). A DML peritumoral é associada com o pobre prognóstico e à

recidiva de carcinoma de colo de útero, portanto pode ser analisada em estágios precoces do câncer cervical (Gombos, et al., 2005). Apesar de a linfangiogênese estar associada à metástase linfonodal, pouco se sabe a respeito de neoplasias de glândulas salivares (Soares et al., 2007).

A DML foi analisada em casos de adenomas pleomórficos e de carcinomas em adenomas intracapsulares, minimamente invasivos e altamente invasivos, comparando-os com o tecido adjacente normal da glândula salivar. Foi visto que não houve aumento da densidade microvascular linfática intra ou peritumoral, sugerindo que a atividade linfática nestas lesões partiu de vasos preexistentes (Soares et al., 2007; Soares et al., 2009).

A DML e a expressão de VEGF-C foram analisadas em diferentes tipos histológicos de carcinomas de glândulas salivares divididos de acordo com o risco de metástase linfonodal. Os tipos histológicos associados ao alto risco de metástases linfonodais não apresentaram aumento da DML ou da expressão do VEGF-C. Concluíram que a tendência para metástase nestes carcinomas parece estar relacionada à capacidade de invadir os linfonodos e não com o aumento do VEGF-C ou da DML (Mello et al., 2010).

A comparação entre a DML de carcinoma adenoide cístico e de tecido glandular normal não apresentou significância no estudo realizado por Fujita et al. (2011). Foi verificado que a linfangiogênese não é funcional neste tumor de glândula salivar.

3 PROPOSIÇÃO

Analisar a relação entre os aspectos histológicos, a proliferação celular, o fator de crescimento endotelial linfático e a formação de vasos linfáticos em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho experimental seguiu os princípios éticos de pesquisa em seres humanos, tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sob protocolo nº053/2011-PH/CEP.

4.1 Amostra e Seleção dos Casos

Do total de 156 casos de neoplasia de glândula salivar pertencentes ao arquivo de Patologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, foram selecionados 67 casos para realização deste estudo, entre os quais 25 neoplasias benignas e 42 malignas.

Os dados clínicos como idade, raça, gênero, localização anatômica e diagnóstico histopatológico foram coletados a partir das fichas de requisição dos arquivos da Disciplina de Patologia e transportados para uma planilha para posterior análise.

Para confirmação do diagnóstico de cada lesão, o material foi analisado por meio de microscopia de luz em cortes histológicos corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE). Foram incluídos no estudo os melhores blocos de adenoma pleomórfico e, nos demais tumores, os casos que apresentaram material suficiente nos blocos para realização das reações propostas.

4.2 Reação Imuno-histoquímica

Para análise da proliferação celular foi realizada a reação imuno-histoquímica para marcação do antígeno Ki-67. Também foi avaliado o fator de crescimento endotelial linfático (VEGF-C). A densidade microvascular linfática (DML) foi analisada por meio da marcação do antígeno endotelial D2-40.

A partir dos blocos de parafina dos casos selecionados foram obtidos cortes histológicos com 3µm de espessura, estendidos em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropilttriethoxi-silano (Sigma Chemical CO. St Louis, MO/USA) a 10% em álcool absoluto, para realização das reações imuno-histoquímicas.

Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol I seguido por xilol II ambos por 5 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente reidratados em série descendente de etanol absoluto I e II, álcool 70% I e II e finalmente álcool 50% I e II todos por 3 minutos cada. Posteriormente foram submetidos à recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e incubação com o anticorpo primário. Foram utilizados os métodos de estreptavidina-biotina (LSAB) e polímero (*Histofine*), revelação com cromógeno tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) e contracoloração com Hematoxilina de Mayer.

Os anticorpos primários, bem como suas diluições, sistema de visualização, tampão de lavagem e detalhes da recuperação antigênica estão listados no quadro 1.

Quadro 1 – Detalhe dos anticorpos primários utilizados

Anticorpo	Clone	Diluição	Sistema de visualização	Tampão de lavagem	Recuperação antigênica, temperatura, Tempo
VEGF-C	H-190**	1:20	Histofine***	Tris	BM (95°C), 45min – Citrato
KI-67	MIB-1*	1:100	LSAB*	Tris	BM (95°C), 45min – Citrato
D2-40	M3619*	1:150	Histofine***	Tris EDTA Target Retrieval Solition*	BM (95°C), 45min – Citrato

*DAKO CORPORATION, Glostrup, DENMARK,

**Santa Cruz Biothechnology, CA, USA

***Nichirei Biosciences Inc.

BM= banho Maria

Min=minutos

Para o Ki67, após desparafinização e reidratação procedeu-se da seguinte forma:

- a) lavagem em água corrente e água destilada;
- b) incubação por duas vezes de 10 minutos com peróxido de hidrogênio a 3%, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena tecidual;
- c) lavagem em água corrente e água destilada e imersão por duas vezes em tampão Tris (pH 7,4), durante 5 minutos cada;
- d) incubação de soroalbumina bovina (BSA) diluída em solução Tris (pH 7,4) por 1 hora.

Todos os procedimentos a seguir foram precedidos de duas lavagens em Tris (pH 7,4), durante 5 minutos cada. São eles:

- e) incubação com anticorpo primário diluído em solução de uso por 1 hora;
- f) incubação com o anticorpo secundário biotinilado (DAKO LSAB Kit, Peroxidase), por 30 minutos, à temperatura ambiente (TA);
- g) lavagem;
- h) exposição ao complexo terciário streptavidina-biotina-peroxidase (DAKO LSAB Kit, Peroxidase), por 30 minutos, (TA);
- i) lavagem;
- j) incubação com DAB (DAKO Liquid DAB), por 10 minutos;
- k) lavagem em água corrente e água destilada.

Para o D2-40 e VEGF-C, após desparafinização e reidratação dos tecidos, realizou-se:

- a) lavagem em água corrente e água destilada;
- b) recuperação antigênica;
- c) incubação com peróxido de hidrogênio a 3% por duas vezes de 10 minutos;
- d) bloqueio das ligações inespecíficas (DAKO Protein Blocking Serum Free- Ready to use), por 15 minutos;
- e) incubação do anticorpo primário diluído em diluente de anticorpo (DAKO Antibody Diluent with Background reducing Components DBS-K004);
- f) lavagem com solução tampão Tris EDTA (pH=9) para o D2-40 e Tris pH=7,4 para o

VEGF-C.

- g) sistema de visualização Histofine Simple Stain Max PO Multi (Universal Immuno-peroxidase polymer anti mouse and rabbit), Nichirei Biosciences Inc.;
- h) incubação com DAB (DAKO Liquid DAB), por 5 minutos.

Posteriormente, foi realizada a contracoloração dos cortes com hematoxilina de Mayer por 1 minuto, seguido de banho de hidróxido de amônia por 15 segundos com a finalidade de azular o corte, lavagem em água corrente e destilada. Para finalizar, desidratação com série ascendente de etanol 50% II e I, 70% II e I, absoluto II e I por 1 minuto cada. Diafanização em xilol II e I durante 1 minuto e montagem das lâminas em resina *Permout®*.

Controles positivos foram utilizados para cada anticorpo empregado. Assim, para o Ki-67 foi utilizado carcinoma epidermoide, para o D2-40 e VEGF-C foi utilizado linfangioma. Como controle negativo para todas as reações imuno-histoquímicas, os cortes histológicos foram incubados com a solução diluente do anticorpo no lugar do anticorpo primário.

4.3 Análise do Ki-67

A análise quantitativa das células positivas do Ki-67 foi realizada por um único observador. Somente as células que apresentaram núcleos corados em marrom foram consideradas positivas, independente da intensidade da coloração.

Para a análise da expressão do Ki-67 (índice de

proliferação) foram identificados em microscópio de luz Zeiss Axiophot-2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), os campos microscópicos considerados de maior densidade de marcação, com aumento de 100X (objetiva e ocular de 10X). Nestes campos foram obtidas imagens digitais com ocular de 10X e objetiva de 40X. As imagens dos campos foram capturadas por meio de câmera digital de alta resolução AxioCam MRc5 (Zeiss) acoplada ao microscópio. A câmera permaneceu conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA) contendo um programa de aquisição e análise de imagens (Axivision Rel 4.7, Zeiss, Jena, Alemanha). Sobre tais imagens foi feita a contagem de células positivas para o Ki-67, com utilização do programa computacional desenvolvido pelo *National Institutes of Health* (NIH), *Image-J* (versão *Windows* - domínio público). O índice de proliferação foi a porcentagem de células positivas de um total de 1.000 células tumorais.

4.4 Análise do D2-40 e DML

A análise quantitativa do antígeno D2-40 para quantificação microvascular tumoral linfática seguiu o método preconizado por Maeda et al. (1995).

Inicialmente, foi utilizada uma ampliação de 200X em microscópio de luz já descrito, a fim de identificar áreas de maior densidade vascular linfática. Foram obtidas imagens digitais em 5 diferentes campos, com ampliação original de 400X, para realização da contagem. A média foi então registrada como DML.

A contagem dos vasos foi realizada por um único investigador. Qualquer célula ou grupo celular endotelial, corado positivamente pelo marcador D2-40, separado dos microvasos adjacentes, das células tumorais e de outros elementos do tecido

conjuntivo, foi considerado como vaso unitário, assim como os vasos contendo lúmen. Estruturas ramificadas foram contadas como vaso único.

4.5 Análise do VEGF-C

A análise do VEGF-C foi feita por um observador no equipamento descrito anteriormente, com ocular de 10X e objetiva de 40X. A expressão imuno-histoquímica do antígeno pelas células tumorais foi avaliada por método semi-quantitativo de escores. Este se baseou na soma da proporção e intensidade das células tumorais com marcação positiva, conforme proposto por Soini et al. (2001). A proporção das células positivas foi avaliada e classificada em cinco escores: 0= ausência de células tumorais positivas; 1= menos de 25% de células tumorais positivas; 2= 26 a 50% de células tumorais positivas; 3= 51 a 75% de células tumorais positivas e 4= mais de 75% de células tumorais positivas. Em seguida procedeu-se a análise e classificação da intensidade, através dos seguintes escores: 0= ausência de marcação; 1= marcação fraca; 2= marcação moderada; 3= marcação forte e 4= marcação intensa. Os valores obtidos foram somados, resultando em índices de marcação classificados em três categorias: 0 (soma zero) = ausência de marcação; 1 (soma de 1 a 4) = marcação fraca e 2 (soma de 5-8) = marcação forte.

4.6 Análise Estatística

Todos os registros das informações sobre os dados clínicos, microscópicos e referentes às reações imuno-histoquímicas empregando Ki-67, D2-40 e VEGF-C foram armazenados em um banco

de dados elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial utilizando o programa estatístico Minitab versão 16.0.

Foram aplicados os testes de *Pearson* para analisar a correlação entre os marcadores Ki-67 e D2-40 em cada neoplasia e de *Kruskal Wallis* para comparar, em cada tumor, a marcação forte ou fraca do VEGF-C com o índice de proliferação celular e densidade microvascular linfática. O teste *t-Student* foi utilizado para avaliar a associação entre as variáveis benignas e malignas com a expressão dos marcadores. Para todos os testes adotou-se o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análises dos dados clínicos

A análise dos dados clínicos dos 67 casos estudados foi sintetizada em dois quadros contendo os resultados das neoplasias benignas e malignas respectivamente evidenciando o predomínio de cada item avaliado.

Quadro 2 – Análise dos dados clínicos das neoplasias benignas de glândulas salivares

NEOPLASIAS BENIGNAS								
Lesões benignas (25)	Raça %		Sexo %		Sintoma %		média de idade	Localização prevalente
	L	M	masc	fem	sim	não		
Adenoma Pleomórfico (19)	68,5	31,5	45	55	13,3	86,6	44,7	Palato duro
Mioepitelioma (5)	75	25	40	60	40	60	42,5	Palato duro
Cistoadenoma (1)	-	-	-	100	90	-	-	-

L= leucoderma

M= melanoderma

Masc= masculino

Fem= feminino

- = informação não disponível

Quadro 3 - Análise dos dados clínicos das neoplasias malignas de glândulas salivares

NEOPLASIAS MALIGNAS								
Lesões malignas (42)	Raça %		Sexo %		Sintoma %		média de idade	Localização prevalente
	L	M	masc	fem	sim	não		
Carcinoma mucoepidermoide (17)	75	25	52,9	47,1	44,4	55,5	46,9	Palato*
Carcinoma adenoide cístico (9)	57,1	42,8	33,3	66,7	100	-	56,2	Palato*
Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (11)	72,2	27,4	-	100	50	50	52,9	Palato duro
Carcinoma de células acinares (2)	100	-	50	50	-	100	43,5	Mucosa labial superior/ Palato
Adenocarcinoma de células basais (1)	100	-	100	-	-	-	67	Mucosa labial superior
Carcinoma em adenoma (1)	-	-	100	-	100	-	39	Mucosa labial superior
Mioepitelioma maligno (1)	100	-	100	-	-	100	59	Palato mole

L= leucoderma

M= melanoderma

Masc= masculino

Fem= feminino

- = informação não disponível.

*= não especificado

5.2 Análise imuno-histoquímica

Em relação aos aspectos morfológicos da marcação com os anticorpos estudados podemos verificar que a positividade da marcação do Ki-67 foi observada nos núcleos das células neoplásicas caracterizada por uma coloração acastanhada, geralmente com presença

de grânulos, eventualmente homogênea. Foi considerada a marcação de células das estruturas ductais, lumbais e não lumbais, e das células que compõem a porção sólida de cada lesão. Não foram consideradas marcações no estroma (Figuras 1e 2).

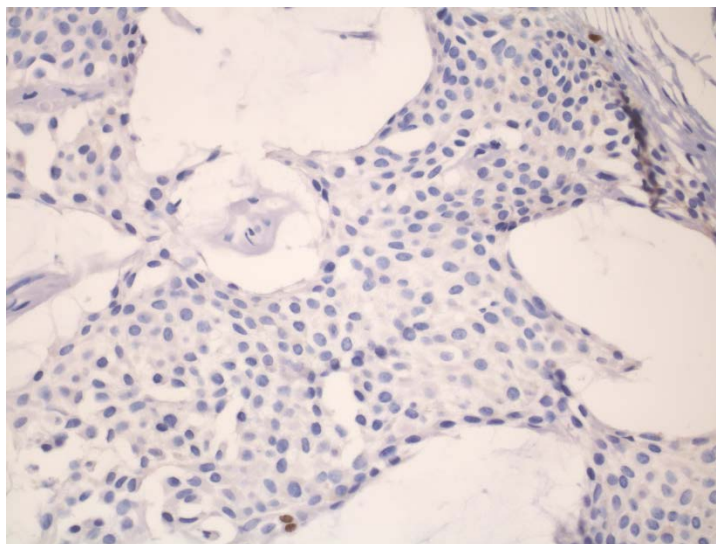


Figura 1 – Expressão da marcação do Ki-67 em mioepitelioma. Aumento original de 400x.

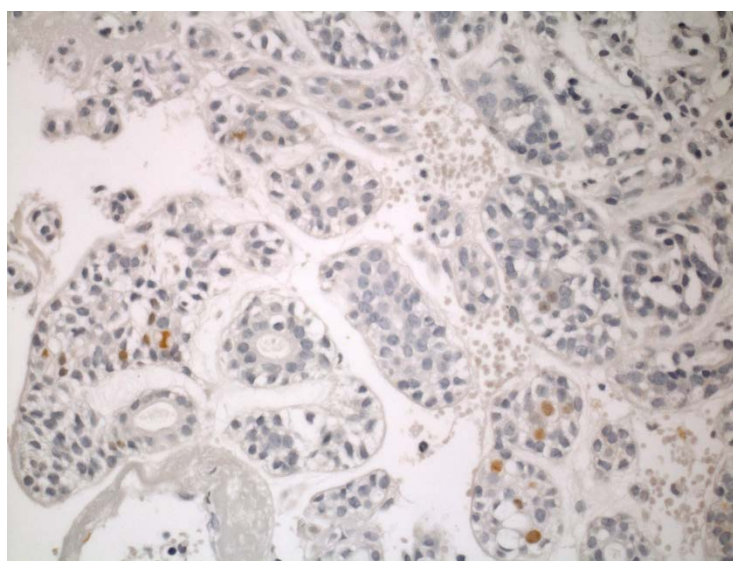


Figura 2 – Expressão da marcação do Ki-67 em carcinoma adenoide cístico. Aumento original de 400x.

Os vasos linfáticos intratumorais foram identificados pela marcação em célula ou grupo celular com o D2-40, no estroma da lesão. Este anticorpo também é expresso em células mioepiteliais, em células basais de ducto estriado e excretor e na camada basal do epitélio de revestimento, porém, a marcação destas não foi considerada (Figuras 3,4 e 5).

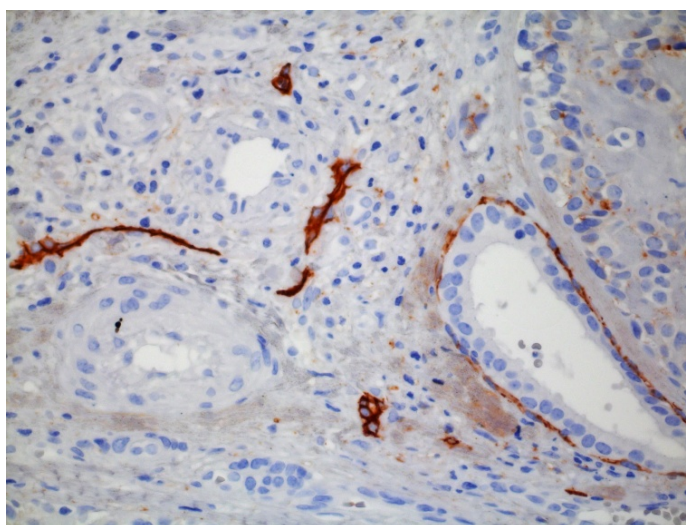


Figura 3 – Expressão da marcação do D2-40 em adenoma pleomórfico. Aumento original de 400x.

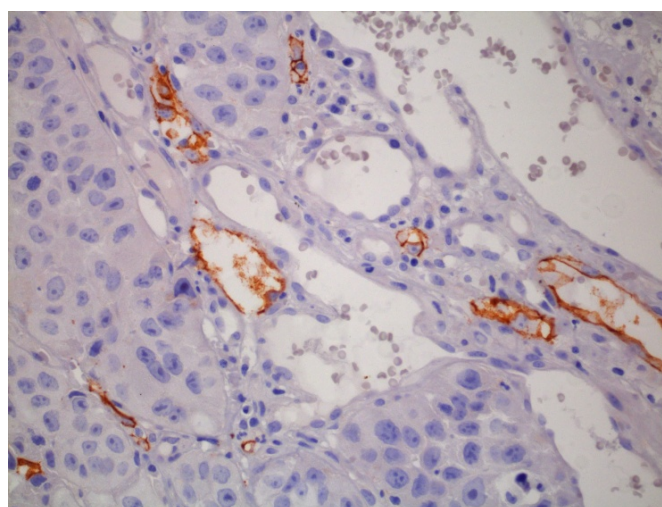


Figura 4 – Expressão da marcação do D2-40 em carcinoma mucoepidermoide. Aumento original de 400x.

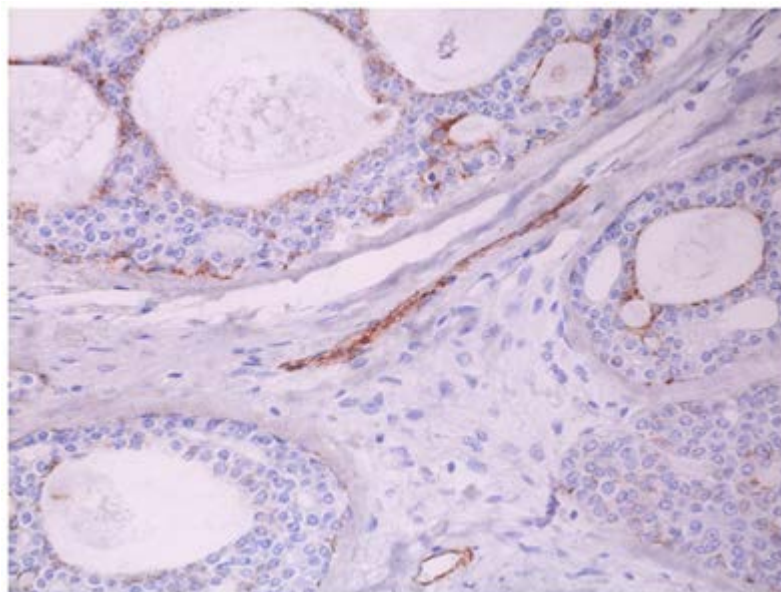


Figura 5 – Expressão da marcação do D2-40 em carcinoma adenoide cístico. Aumento original de 400x.

A imunoexpressão do VEGF-C foi localizada no citoplasma, membrana e, eventualmente, no núcleo das células tumorais e do estroma. No adenoma pleomórfico, observou-se marcação nas estruturas ductais, tanto nas células luminais quanto nas não luminais (mioepiteliais), nas células mioepiteliais em blocos sólidos e nas células tumorais em meio ao estroma mixoide, condroide ou hialino. No carcinoma mucoepidermoide foi observada marcação nas estruturas císticas e sólidas, independente do tipo celular, e também no estroma. A imunoexpressão do VEGF-C foi observada nas células luminais e não luminais das estruturas ductais no carcinoma adenoide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, sendo por vezes diferente entre esses dois tipos celulares. Observou-se também marcação nas estruturas sólidas e eventualmente no estroma desses dois tumores. No mioepitelioma (benigno e maligno), carcinoma de células acinares, carcinoma em adenoma, cistoadenoma e adenocarcinoma de células basais, o VEGF-C foi analisado no todo da lesão (Figuras 6 e 7).

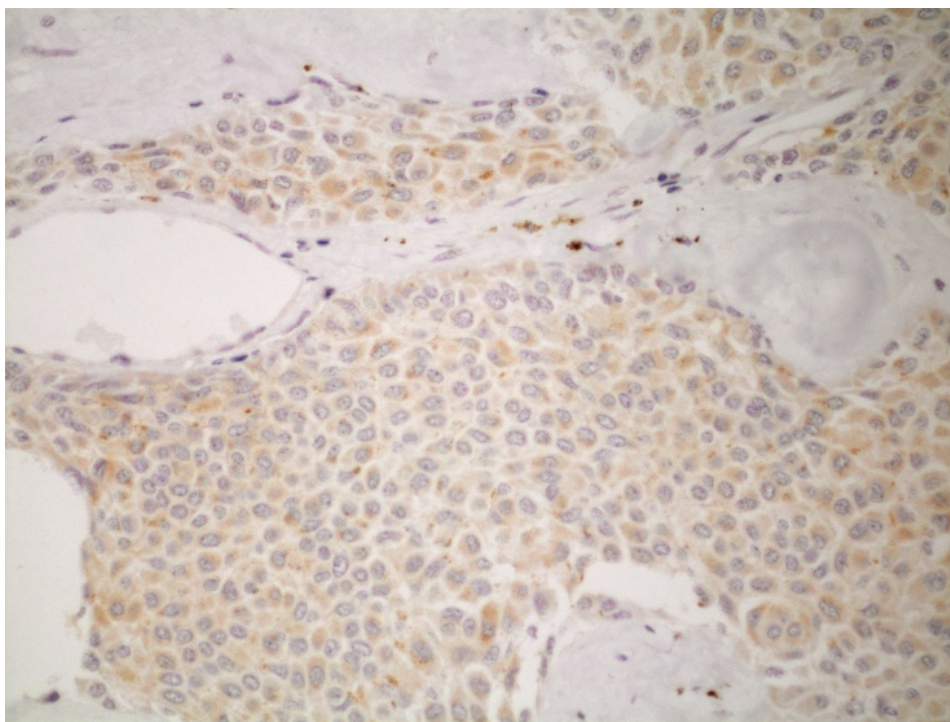


Figura 6 – Expressão da marcação do VEGF-C em mioepitelioma. Aumento original de 400x.

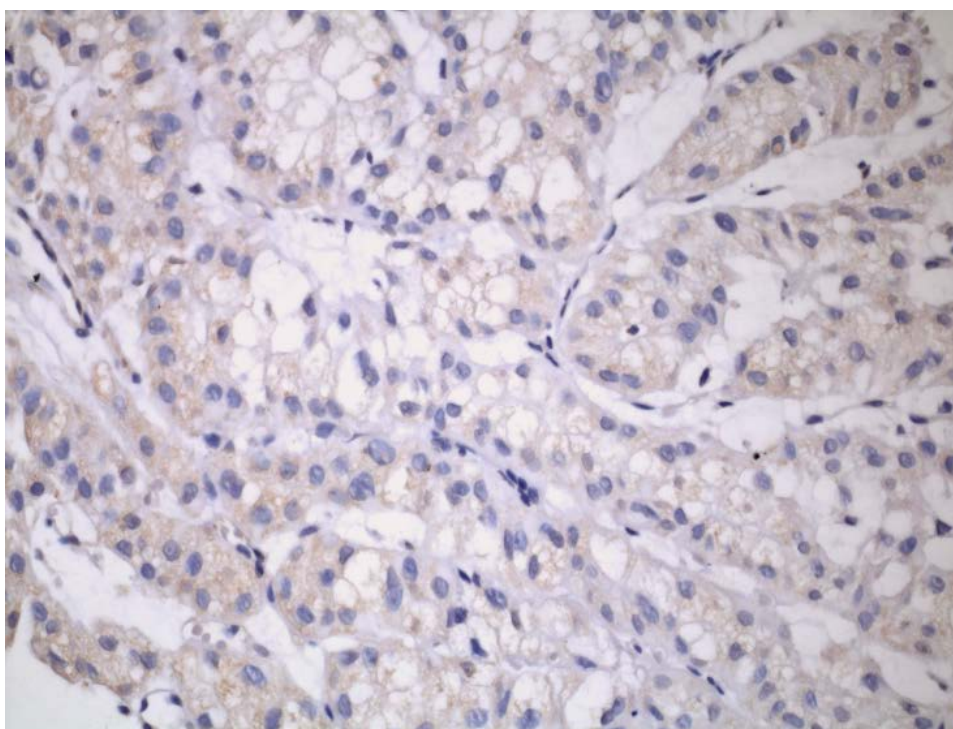


Figura 7 – Expressão da marcação do VEGF-C em carcinoma de células acinares. Aumento original de 400x.

Nas tabelas a seguir constam todos os resultados imuno-histoquímicos dos casos de lesões de glândulas salivares estudados (Tabelas 1 a 10). Os dados individualizados poderão ser consultados nos apêndices de A a F.

Tabela 1 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 19 casos de adenoma pleomórfico

casos\anticorpos	Ki-67(%)	DML (D2-40)*	VEGF-C Escore final/índice de marcação
4105	0,1	7,2	4,6=Fraco
5244	0	6,4	5,3=Forte
5738	1,5	2	7=Forte
7361	1	5,8	2=Fraco
7472	1,4	4,8	1,3=Fraco
7613	0	1,8	3=Fraco
7846	1,2	12,6	3,3=Fraco
8077	0,8	1,8	5,6=Forte
8084	1,1	2,6	4,6=Fraco
8166	0,8	2,4	3,3=Fraco
8437	0	1,6	2,6=Fraco
8454	2,3	1,4	5,6=Forte
9336	0,8	4,6	7,3=Forte
9803	0,5	4,2	8=Forte
9973	1,4	8,2	6,3=Forte
10137	2,5	7,4	3,6=Fraco
10167	0,8	4,6	7,6=Forte
10679	1	4,8	4=Fraco
11152	2,7	4,8	5,6=Forte

*densidade microvascular linfática = media do número de vasos em cinco campos por caso.

Tabela 2 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 5 casos de mioepitelioma

casos\anticorpos	Ki-67(%)	DML(D2-40*)	VEGF-C Escore final/índice de marcação
1089	0	0	8=Forte
5688	0	2,2	5=Forte
8266	0	0,2	7=Forte
8939	0,4	0	4=Fraco
11573	0,6	0,2	8 =Forte

*densidade microvascular linfática = media do número de vasos em cinco campos por caso

Tabela 3 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 1 caso de cistoadenoma

caso\anticorpo	Ki-67(%)	DML(D2-40*)	VEGF-C Escore final/índice de marcação
3287	0	1	6=Forte

*densidade microvascular linfática = media do número de vasos em cinco campos por caso.

Tabela 4 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 9 casos de carcinoma adenoide cístico

casos\anticorpos	Ki-67(%)	DML(D2-40*)	VEGF-C Escore final/índice de marcação
335	0,7	-	1=Fraco
3537	2,1	5,4	3,5=Fraco
4320	1,5	2	4=Fraco
5627	4,3	3,8	5,7=Forte
6689	1,5	1,6	5=Forte
7235	0	3,2	0=Ausência
9260	1,1	4,2	3,2=Fraco
9787	3,1	4,2	2,2=Fraco
10704	3,5	3,2	0=Ausência

*densidade microvascular linfática = média do número de vasos em cinco campos por caso.

- = material insuficiente.

Tabela 5 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 2 casos de carcinoma de células acinares

casos\anticorpos	Ki-67(%)	DML(D2-40*)	VEGF-C Escore final/índice de marcação
1881	-	0	8=Forte
9672	0,1	0	4=Fraco

*densidade microvascular linfática = média do número de vasos em cinco campos por caso.

- = material insuficiente.

Tabela 6 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 17 casos de carcinoma mucoepidermoide

casos\anticorpos	Ki-67(%)	DML (D2-40*)	VEGF-C Escore final/índice de marcação
257	1,8	10,4	4,6=Fraco
534	0	0	6=Forte
1582	0,3	0	7=Forte
2807	0,2	-	3=Fraco
3176	0	-	2=Fraco
3608	0	6,6	8=Forte
3635	0	0,4	7=Forte
4269	0,5	-	4=Fraco
6067	2,1	3,8	6,6=Forte
7036	0	-	6,3=Forte
7617	2,7	0	2=Fraco
7622	7,9	1,2	4,6=Fraco
7749	0,1	0	3,3=Fraco
7970	0	2	3,3=Fraco
7973	0	5	0=Ausência
9128	0	7,2	3,3=Fraco
10385	1,5	3,2	3,3=Fraco

*densidade microvascular linfática = media do número de vasos em cinco campos por caso.

- = material insuficiente.

Tabela 7 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 11 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau

casos\anticorpos	Ki-67(%)	DML (D2-40*)	VEGF-C Escore final/índice de marcação
3782	0,7	1,4	3,7=Fraco
6210	3,4	-	2,2=Fraco
6397	1,1	1,4	1,5=Fraco
7237	1,4	1,4	2=Fraco
7281	0	0,4	0,5=Fraco
8056	0,1	0	4=Fraco
8645	0,2	0	0=Ausência
9173	2,9	1,8	5=Forte
9628	2,4	2,2	0=Ausência
11276	4	1,8	6=Forte
11466	19	0,4	5,2=Forte

*densidade microvascular linfática = média do número de vasos em cinco campos por caso.

- = material insuficiente.

Tabela 8 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 1 caso de adenocarcinoma de células basais

caso\anticorpos	Ki-67(%)	DML (D2-40*)	VEGF-C Escore final/índice de marcação
6333	1,3	0	7=Forte

*densidade microvascular linfática = média do número de vasos em cinco campos por caso.

Tabela 9 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 1 caso de carcinoma em adenoma

caso\anticorpo	Ki-67(%)	DML (D2-40*)	VEGF-C Escore final/índice de marcação
2453	0	0,2	5=Forte

*densidade microvascular linfática = média do número de vasos em cinco campos por caso.

Tabela 10 – Resultados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular (Ki-67), densidade microvascular linfática (D2-40) e fator de crescimento (VEGF-C) em 1 caso de mioepitelioma maligno

caso\anticorpo	Ki-67(%)	DML (D2-40*)	VEGF-C Escore final/índice de marcação
3099	0,3	2,4	6=Forte

*microdensidade microvascular linfática = média do número de vasos em cinco campos por caso.

5.3 Análise estatística

5.3.1 Adenoma pleomórfico

Foi realizado o teste de correlação de *Pearson* entre Ki-67 e D2-40 na amostra dos adenomas pleomórficos. Não houve significância ($p=0,64$).

O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar o índice de marcação do VEGF-C com a DML e a taxa de proliferação celular (Tabela 11)

Tabela 11 – Resultados do teste de *Kruskal Wallis* comparando o índice de marcação do VEGF-C com a DML e a taxa de proliferação celular em 19 casos de adenoma pleomórfico

Marcadores (mediana)	VEGF-C		p*
	Forte	Fraco	
Ki-67	0,80	1,00	0,62
D2-40	4,6	4,8	0,49

*=Nível de significância de 5%

Foi verificado que não existe diferença estatisticamente significativa da taxa de proliferação celular e da DML entre os tumores com índice de marcação forte ou fraco do VEGF-C.

5.3.2 Mioepitelioma

O teste de correlação de *Pearson* entre Ki-67 e D2-40 nos casos de mioepiteliomas demonstrou que não houve significância, pois resultou em $p=0,53$.

O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar o índice de marcação do VEGF-C com a DML e a taxa de proliferação celular nos casos de mioepitelioma (Tabela 12).

Tabela 12 – Resultados do teste de *Kruskal Wallis* para comparar os casos de mioepiteliomas com marcação forte ou fraco do VEGF-C com a DML e a proliferação celular

Marcadores (mediana)	VEGF-C		p*
	Forte	Fraco	
Ki-67	0,00	0,40	0,48
D2-40	0,20	0,00	0,29

*=Nível de significância de 5%

No caso dos mioepiteliomas, não houve diferença significativa do índice de proliferação celular ($p=0,48$) e da DML ($p=0,29$), comparando-se os tumores com alta e a baixa expressão do VEGF-C.

5.3.3 Carcinoma mucoepidermoide

Para esta neoplasia a correlação de *Pearson* entre Ki-67 e D2-40 resultou em $p=0,74$, sem significância. Não foram incluídas as amostras dos casos 2807, 3176, 4269, 7036 para a marcação de D2-40 devido à falta de material para análise.

O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar o índice de marcação do VEGF-C com a DML e a taxa de proliferação celular (Tabela 13)

Tabela 13 – Resultados do teste de *Kruskal Wallis* para comparar os casos de carcinomas mucoepidermoides com marcação forte ou fraca do VEGF-C com a DML e proliferação celular

Marcadores (mediana)	VEGF-C			p*
	Forte	Fraco	Ausência	
Ki-67	0,00	1,50	0,00	0,37
D2-40	0,40	2,00	5,00	0,61

*=Nível de significância de 5%

Nas amostras de carcinomas mucoepidermoides, também não foi significativa a diferença do índice de proliferação celular ($p=0,37$) e da DML ($p=0,61$), comparando-se as lesões com alta e baixa expressão do VEGF-C.

5.3.4 Carcinoma adenoide cístico

A correlação de *Pearson* entre Ki-67 e D2-40 resultou em $p=0,57$, sem significância. Não foi incluída a amostra do caso 335 para a marcação de D2-40 devido à falta de material para análise.

O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar o índice de marcação do VEGF-C com a DML e a taxa de proliferação celular (Tabela 14)

Tabela 14 – Resultados do teste de *Kruskal Wallis* para comparar os casos de carcinomas adenoides císticos com marcação forte ou fraca do VEGF-C com a DML e proliferação celular

Marcadores (mediana)	VEGF-C			p*
	Forte	Fraco	Ausência	
Ki-67	2,90	1,80	1,75	0,70
D2-40	2,70	4,20	3,20	0,35

*=Nível de significância de 5%

Os resultados do teste de *Kruskal Wallis* demonstraram que os tumores de alta e baixa expressão de VEGF-C possuem proliferação celular bem como DML semelhantes, com valores de $p=0,70$ e $p=0,35$ respectivamente.

5.3.5 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau

Não houve correlação da expressão do D2-40 com a expressão do Ki-67 para esta amostra, segundo o teste de *Pearson*, visto que $p=0,76$. Não foi incluída a amostra do caso 6210 para a marcação de

D2-40 devido à falta de material para análise.

O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar o índice de marcação do VEGF-C com a DML e a taxa de proliferação celular (Tabela 15)

Tabela 15 – Resultados do teste de *Kruskal Wallis* para comparar os adenocarcinomas polimorfos de baixo grau com marcação forte ou fraca do VEGF-C com a DML e proliferação celular

Marcadores (mediana)	VEGF-C			p*
	Forte	Fraco	Ausência	
Ki-67	4,00	0,70	1,30	0,05
D2-40	1,80	1,40	1,10	0,59

*=Nível de significância de 5%

Nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau, o resultado do teste de *Kruskal Wallis* mostrou um valor muito próximo da significância para o índice de proliferação celular ($p=0,05$), entre as lesões com alta e baixa expressão do VEGF-C. Com relação ao D2-40, não houve significância ($p=0,59$).

5.3.6 Comparação entre as amostras benignas e malignas

Foi realizada análise estatística para comparação da marcação para cada anticorpo entre o grupo das lesões benignas e das malignas, pelo teste *t-Student* (tabela 16).

Tabela 16 – Resultado do teste *t-Student* para analisar tumores benignos X malignos quanto à expressão dos marcadores Ki-67, D2-40 e VEGF-C

Anticorpo	Média±dp.		p*
	Benigno	Maligno	
Ki-67	0,87±0,80	1,97±3,46	0,08
D2-40	3,82±3,09	2,37±2,44	0,06
VEGF-C	5,03±2,05	3,78±2,31	0,03

*=Nível de significância de 5%

Os índices de proliferação e de DML foram semelhantes entre os tumores benignos e malignos, com $p=0,08$ e $p=0,06$ respectivamente. Para a comparação da expressão do marcador VEGF-C pelo teste *t-Student*, foi utilizado o escore final de marcação. Este teste mostrou diferença significativa da expressão de VEGF-C entre as neoplasias benignas e malignas ($p=0,03$), sendo a média de expressão nos benignos maior que nos malignos.

6 DISCUSSÃO

A epidemiologia dos tumores de glândulas salivares não é bem documentada, mas estima-se que a incidência anual global seja de 0,4 a 13,5 casos por 100.000 pessoas (Auclair et al., 1991). O acometimento é de 2 a 6,5% dentre todas as neoplasias de cabeça e pescoço (Spiro, 1986). Segundo Luksic et al. (2011), os estudos de vários países mostram diferenças na incidência de tumores de glândulas salivares e variações na frequência de cada tipo histológico. No presente estudo as neoplasias de glândulas salivares corresponderam a 1,35% de todas as lesões diagnosticadas no laboratório.

Há um predomínio das lesões benignas (Ito et al., 2005, Lima et al., 2005) tanto nas glândulas salivares menores quanto nas maiores (Loyola et al. 1995; Neville et al., 2009). Num estudo retrospectivo de 6.982 casos de neoplasias de glândulas salivares na população chinesa, Tian e seus colaboradores em 2010, encontraram uma proporção entre tumores benignos e malignos de 2,12:1.

Neste trabalho a casuística analisada apresentou o adenoma pleomórfico como a mais comum de todas as neoplasias de glândula salivar e também dentre as benignas, corroborando com a maioria dos estudos (Lima et al., 2005; Tian et al., 2010; Luksic et al., 2011).

Das neoplasias malignas, o mais comum foi o carcinoma mucoepidermoide, concordando com vários estudos (Williams et al 2001; Perez et al., 2004; Ito et al., 2005), porém, discordando de Luksic et al. (2011), em cuja casuística o carcinoma adenoide cístico representou a maioria. Em segundo lugar foi o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, concordando com Barnes et al. (2005) e discordando de Tian et al. (2010) que classificam em segundo lugar o carcinoma adenoide cístico. Isto

talvez se deva à relativa recente descrição do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (Ellis, Auclair, 1996) que foi adicionado ao grupo dos carcinomas apenas em 1991 pela Organização Mundial de Saúde (Gnepp, 2009).

Tanto para as neoplasias benignas quanto para as malignas, o local mais comum neste estudo foi o palato, o que está de acordo com os estudos que demonstram ser esta a localização mais comum de neoplasias de glândulas salivares menores (Ito et al., 2005; Tian et al., 2010; Luksic et al., 2011). Segundo Neville et al., (2009), isto se justifica pela riqueza de glândulas salivares que há na porção entre o palato duro e mole.

No presente estudo, o gênero feminino predominou. Dos 25 casos de neoplasias benignas, 64% eram de pacientes do sexo feminino. Nos 42 casos de neoplasias malignas estudadas, o predomínio do sexo feminino foi de 62%. Esta ligeira predominância também foi vista em outros estudos (Williams et al., 2001; Ito et al., 2005), ressaltando que pode haver uma certa variação de acordo com o tipo de tumor (Barnes et al., 2005). Em contraste, Luksic et al. (2011), estudaram 779 pacientes com tumores de glândulas salivares maiores e menores e observaram que 392 casos (50,3%) eram do gênero masculino e 387 (49,7%) pertenciam ao gênero feminino.

A média de idade dos pacientes com neoplasias benignas foi de 43,6 anos e 52 anos para os pacientes com neoplasias malignas. Na maioria dos estudos, a média de idade dos pacientes com neoplasia maligna é superior à dos pacientes com neoplasia benigna. Foi relatada a média de incidência de 46 anos para neoplasias benignas e de 47 anos para as malignas (Ellis, Auclair, 1996; Barnes et al., 2005). Luksic e colaboradores (2011) encontraram uma média de idade para pacientes com tumores benignos de 50 anos e para pacientes com tumores malignos de 56 anos.

No presente estudo, pacientes leucodermas tiveram um

predomínio na incidência. Nas neoplasias benignas, o acometimento foi de 64% enquanto que nas neoplasias malignas foi de 70,7%. O acometimento de pacientes melanodermas foi de 36% e 29,3% respectivamente. Tal informação é escassa na literatura.

Segundo Leivo (2006), o comportamento de certas neoplasias de glândulas não se correlaciona muito bem com a classificação histopatológica e tumores classificados dentro de uma mesma categoria podem exibir desfechos clínicos bastante diferentes. Recentes avanços na classificação histopatológica têm contado com novas ferramentas como o diagnóstico imuno-histoquímico incluindo marcadores de proliferação celular, fatores de crescimento e seus receptores.

Em relação aos marcadores imuno-histoquímicos de proliferação celular, o Ki-67 é o marcador mais útil para prever o comportamento das neoplasias de glândulas salivares (Cheuck, Chan, 2007). Somente as células em proliferação expressam a proteína Ki-67, principalmente na fase S e G2 do ciclo celular (Kurokawa et al., 2005).

No presente trabalho o índice de marcação para o Ki-67 mostrou variação entre os casos. Embora a média tenha sido maior no grupo de neoplasias malignas, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos benigno e maligno. O maior índice de proliferação encontrado nos casos malignos pode estar relacionado com maior agressividade, entretanto, não foi possível detectar diferenças significativas do índice de proliferação entre os dois grupos, provavelmente devido ao tamanho da amostra estudada que foi de 67 casos.

Diversos estudos demonstraram diferença no índice de proliferação celular entre neoplasias glandulares benignas e malignas. Ito et al. (2009), compararam a marcação imuno-histoquímica do Ki-67 em 41 casos de adenomas pleomórficos, 30 de carcinomas mucoepidermóides e 30 de carcinomas adenoide císticos. Verificaram que a maior marcação foi

observada nos carcinomas mucoepidermóides de alto grau. Concluíram que a marcação do Ki-67 é importante na tumorigênese das neoplasias de glândulas salivares, corroborando com o trabalho de Alves et al. (2004), que constataram que o adenoma pleomórfico exibe uma baixa taxa de proliferação comparado ao carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoide cístico.

Prado et al. (2011), também observaram que taxa de proliferação celular, evidenciada pela positividade do Ki-67, foi mais alta em tumores malignos.

O índice de proliferação celular é utilizado também como indicador prognóstico. Segundo Luukkaa et al. (2006), um alto índice de marcação de Ki-67 correlaciona-se com uma pobre sobrevida em carcinoma mucoepidermoide, carcinoma de células acinares e carcinoma adenoide cístico. Por outro lado, o trabalho de Perez et al. (2004) não mostrou diferenças na expressão do Ki-67 entre os casos de tumores malignos de glândulas de alto e baixo grau de malignidade, considerando os casos de recidiva e óbitos nos pacientes estudados.

Os vasos linfáticos de tecidos normais e neoplásicos podem ser marcados com o anticorpo monoclonal D2-40 que reconhece a podoplanina (Evangelou et al., 2005). Esta é expressa também em células não endoteliais como as mioepiteliais e ductais, mas não impede a identificação dos vasos linfáticos (Schacht et al., 2005.)

No presente estudo, realizou-se a marcação dos vasos linfáticos através da reação imuno-histoquímica com o anticorpo D2-40, obtendo-se a densidade microvascular linfática das lesões. Procurou-se correlacionar esta densidade com a marcação das células tumorais pelo Ki-67, em cada tipo de lesão. Os dados foram cruzados, mas não houve correlação significativa em nenhum caso.

A proposição da pesquisa de Soares et al. (2007) foi de comparar a DML e proliferação celular em células endoteliais linfáticas de adenomas pleomórficos e carcinomas ex-adenomas pleomórficos

classificados segundo o grau de invasão. Realizaram marcação com D2-40 e Ki-67 e verificaram que em nenhum caso houve atividade proliferativa dos vasos linfáticos, concluindo que no carcinoma ex-adenoma a rede linfática é composta predominantemente de linfáticos preexistentes.

A falta de correlação entre a vascularização linfática e a agressividade das neoplasias foi verificada por Soares et al. (2009), analisando a DML em amostras de adenoma pleomórfico e adenoma pleomórfico recidivante. Foi utilizado o anticorpo D2-40 para marcação dos vasos linfáticos e Ki-67 para a marcação de proliferação celular. Foi verificado que apesar do comportamento clínico mais agressivo dos adenomas pleomórficos recidivantes, não houve diferença significativa na DML e taxa de proliferação celular entre os dois grupos. Concluíram que o crescimento destas neoplasias não desencadeia a linfangiogênese. Na comparação do presente estudo, entre neoplasias benignas e malignas, também se verificou que a proliferação celular nas neoplasias malignas não desencadeia a linfangiogênese.

Diversos autores afirmam que a linfangiogênese não ocorre em neoplasias de glândulas salivares. A atividade linfática, neste caso, provém de vasos preexistentes (Soares et al., 2007; Soares et al., 2009; Fujita et al., 2011). Contudo, a metástase envolve as células endoteliais no mecanismo de invasão e disseminação das células tumorais por via linfática (He et al., 2004; He et al., 2005).

A DML tem sido relacionada à metástase linfonodal em algumas neoplasias (Audet et al.; 2005; Gombos et al., 2005), mas o presente estudo não abordou este aspecto visto que não houve acompanhamento clínico dos pacientes. Tratou-se de um estudo retrospectivo de casos do arquivo de Patologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal.

Um dos fatores de crescimento que regula a linfangiogênese é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-C),

mas pouco se sabe acerca de sua importância, relação com a densidade microvascular linfática e metástase, nas neoplasias de glândulas salivares (Cao, 2005).

Analisando o VEGF-C em cada tipo de lesão, verificou-se que não houve significância na comparação da marcação fraca ou forte deste com a proliferação celular, exceto no grupo de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau. Neste, o valor de p no teste de *Kruskal-Wallis* foi muito próximo da significância ($p=0,05$), sendo observada maior marcação de Ki-67 nos casos com marcação forte do VEGF-C. Por outro lado, não se observou diferença significativa da DML entre as lesões com marcação forte ou fraca de VEGF-C, indicando que não há correspondência entre aumento do fator de crescimento e quantidade de vasos linfáticos nesta lesão. A interpretação desses resultados foi prejudicada pelo tamanho da amostra, pois, havia apenas três casos com forte marcação de VEGF-C no grupo de 11 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau.

A DML obtida pela marcação do D2-40 e a expressão do VEGF-C foi avaliada por Mello et al. (2011), em diferentes tipos histológicos de carcinomas de glândula salivar divididos em dois grupos, alto e baixo risco para metástase linfonodal. O grupo de alto risco foi composto principalmente por carcinoma mucoepidermoide de alto grau enquanto que o de baixo risco contava com carcinoma adenoide cístico e carcinoma mucoepidermoide de baixo e moderado grau. Não houve diferença entre a DML nos pacientes que tiveram ou não metástase e não houve relação entre a expressão do VEGF-C e a DML. Concluíram que a tendência para a metástase está relacionada à capacidade de invasão celular nos vasos linfáticos.

No presente estudo foram observados índices de marcação baixos de D2-40 e VEGF-C nos casos de carcinoma adenoide cístico, sugerindo que a linfangiogênese é mínima ou não ocorre neste tumor. Esta hipótese é reforçada pelos achados de Fujita et al. (2011),

que avaliaram a DML e a expressão do VEGF-C em carcinoma adenoide cístico em comparação com o tecido normal da glândula submandibular. Verificaram que a DML nas neoplasias não excedeu àquela encontrada no tecido glandular normal. Além disso, a expressão imuno-histoquímica do VEGF-C foi fraca no tumor e forte nos tecidos normais. Os autores concluíram que não ocorre linfangiogênese no carcinoma adenoide cístico e relacionaram com o fato das metástases linfonodais serem incomuns nesta lesão.

Nos carcinomas mucoepidermóides do presente estudo, o índice de marcação do VEGF-C foi fraco na maioria dos casos e não mostrou relação com a DML ($p=0,61$). Gleber-Netto et al. (2012) verificaram expressão moderada e forte de VEGF-C em todos os casos de carcinoma mucoepidermoide estudados, porém, também não observaram relação desta marcação com a DML, concluindo que estes parâmetros não podem prever o comportamento deste tumor.

A associação da DML com a expressão do VEGF-C no presente estudo foi testada também nos demais grupos de neoplasias. Verificou-se que não houve relação da intensidade de marcação do VEGF-C com o número de vasos linfáticos nas lesões estudadas.

Os estudos de He et al., (2002), com linhagens celulares derivadas de câncer de pulmão implantadas em camundongos, demonstraram que a sobre-expressão do VEGF-C induz formação de vasos linfáticos, porém, não aumenta as metástases linfonodais. Os autores sugerem que estas devem ser reguladas por outros fatores, além do VEGF-C.

Comparando as lesões benignas e malignas neste estudo, foi verificado que a expressão do VEGF-C e a DML foram maiores no grupo das benignas, com diferença significativa para o VEGF-C segundo o teste *t-Student*. Esses resultados podem ser decorrentes do tamanho da amostra e da grande variação da marcação de VEGF-C e de D2-40 em cada lesão. Diante desses resultados pode-se inferir que

ambos marcadores não apresentam valor prognóstico na avaliação de neoplasias de glândulas salivares.

Em neoplasias de glândulas salivares, muitos estudos ainda devem ser realizados para se entender o papel da linfangiogênese e sua relação com o fator de crescimento vascular endotelial e o índice de proliferação celular, bem como a correlação das marcações imuno-histoquímicas dos tumores com o prognóstico de pacientes.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nesta amostra permitiu concluir que:

- a) a taxa de proliferação celular é semelhante nas lesões com diferentes intensidades de expressão do fator de crescimento vascular endotelial linfático, tanto nas neoplasias glandulares benignas quanto nas malignas, exceto nos casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau;
- b) no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau há maior expressão do fator de crescimento vascular endotelial linfático nas lesões com maiores taxas de proliferação celular, porém, a densidade microvascular linfática é semelhante nessas lesões;
- c) o fator de crescimento vascular endotelial linfático e a densidade microvascular linfática não apresentam relação direta entre si e com as características histológicas das neoplasias de glândulas salivares;
- d) não há correlação entre o índice de proliferação celular e a densidade microvascular linfática nos tumores de glândulas salivares;
- e) os índices de proliferação celular são semelhantes entre os tumores benignos e malignos de glândulas

salivares;

- f) a linfangiogênese é semelhante entre os tumores benignos e malignos de glândulas salivares.

8 REFERÊNCIAS*

Alves FA, Pires FR, De Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(6):593-7.

Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands: evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer*. 1992;69(8):2021-30.

Auclair PL, Ellis G, Gnepp DR, Wenig BM, Janney CG. Salivary gland neoplasms: general considerations. In: Ellis G, Auclair PL, Gnepp DR. *Surgical pathology of salivary glands*. Philadelphia: WB Saunders; 1991.p.135-64.

Audet N, Beasley NJ, Macmillan C, Jackson DG, Gullane PJ. Lymphatic vessel density, nodal metastases, and prognosis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;131(12):1065-70.

Barbosa TV, Rosas MP, Costa AC, Rapoport A. Valor prognóstico do Ki-67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003 Set-Out; 69(5):629-34.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon IARC Press 2005.

¹ Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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

Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):735-43.

Cheuk W, Chan JK. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology*. 2007 Jul;51(1):1-20.

Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L., Vora A, Muzi K, Ksiazek T, et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol*. 2005;18(9):1232-42.

Dardick I. Color atlas/text of salivary gland tumor pathology. New York: Igaku medical publishers, 1996.

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

Ellis GL, Auclair PL. Tumours of the salivary glands. Atlas of tumour pathology. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.

Eneroth CM. Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular gland, and the palate region. *Cancer*. 1971;27(6):1415-8.

Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol*. 2005 Nov;18(11):1490-7.

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

Eveson J W, Cawson RA. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol.* 1985;146(1):51-8.

Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in headand neck squamous cell carcinoma:a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004;101(5):973-8.

Fujita G, Sato S, Kishino M, Iwa S, Nakazawa M, Toyosawa S, et al. Lymphatic vessels and related factors in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Modern Pathology.* 2011;24(7):885–91.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984 Oct;133(4):1710-5.

Gleber-Netto FO, Florêncio TN, de Sousa SF, Abreu MH, Mendonça EF, Aguiar MC. Angiogenesis and lymphangiogenesis in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. *J Oral Pathol Med.* 2012 May;15: 1-7.

Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2005;11(23):8364-71.

Gnepp DR. Diagnostic surgical pathology on the head and neck. 2. Ed. Philadelphia,PA:Saunders-Elsevier;2009.

He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lynphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1654(1):3-12.

He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K , Yla-Herttuala S, Takahashi T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *Cancer Inst.* 2002 Jun;94(11):819-25.

He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res.* 2005 Jun;65(11):4739-46.

Hicks J, Flaitz C. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescents: assessment of proliferation markers. *Oral Oncol.* 2000; 36(5):454-60.

Ito FA, Ito K, Coletta RD, Graner E, Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors: immunohistochemical study of EGF, EGFR, ErbB-2, FAS and Ki-67. *Anal Quant Cytol Histol.* 2009;31(5):280-7.

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

Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan Y, Feng L, et al. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J Clin Oncol.* 2008;26(3):354-60.

Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S et al. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(10):602-7.

Lazzaro B, Cleveland D. P53 and Ki-67 antigen expression in small oral biopsy specimens of salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89(5):613-7.

Leivo, I. Insights into a complex group of neoplastic disease: advances in histopathologic classification and molecular pathology of salivary gland cancer. *Acta Oncol.* 2006;45(6):662-8.

Lima SS, Soares AF, Amorim RFB, Freitas RA. Perfil epidemiológico das neoplasias de glândulas salivares: análise de 245 casos. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005 mai/jun;71(3):335-40.

Loyola AM. Minor salivary gland tumours: a retrospective study of 164 cases in Brazilian population. *Eur J Cancer B Oral Oncol.*1995;31B(3):197-201.

Long-jiang L, Yi L, Yu-ming W, Hua L, Hong-wei Z. Clinical analysis of salivary gland tumor cases in West China in past 50 years. *Oral Oncol.* 2008;44(2):187–92.

Luksic I, Virag M, Manojlovic S, Macan D. Salivary gland : 25 years of experience from a single institution in Croatia. *Cranio-maxillo- Facial Surge.* 2011 doi: 10.1016/j.jcms..05.002.

Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Vahlberg T, Grenman R. Prognostic significance of Ki-67 and p53 as tumor markers in salivary gland malignancies in Finland: an evaluation of 212 cases. *Acta oncol.* 2006;45(6):669-75.

Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Onoda N, Sawada T et al. Tumour angiogenesis and tumor cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J cancer.* 1995 Aug;72(2):319-23.

Mello MF, Costa AP, Freitas LL, Soares AB, Araujo VC, Tincani AJ, et al. Lymphatic vessel density and expressions of lymphangiogenic growth factors in salivary carcinomas. *Neoplasma.* 2011;58(4):331-6.

Mohammad A. Lymphatic microvessel density and the expression of Lymphangiogenic factors in oral squamous cell carcinoma. *Med Princ Pract* 2008;17:486-92.

Nagler RM, Laufer D. Tumors of major and minor salivary glands: review of 25 years of experience. *Anticancer Res.*1997;17(1):701-7.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

Okabe M, Inagaki H, Murase T, Inoue M, Nagai N, Eimoto T. Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. *Mod Pathol*. 2001;14(10):1008-14.

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

Prado RF, Machado AI da S, Colombo CED, Carvalho YR. Immunohistochemical study of the expression of fatty acid synthase and Ki-67 in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(6):467-75.

Ribeiro KC, Kowalski LP, Saba LM, Camargo B. Epithelial salivary glands neoplasms in children and adolescents: a forty-four year experience. *Med Pediatr Oncol*. 2002;39(6):594-600.

Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol*. 1987 Dec;133(3):579-84.

Satko I, Stanko P, Longauerová I. Salivary gland tumours in the stomatological clinics in Bratislava. *J Craniomaxillofac Surg*. 2000;28(1): 56-61.

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*. 2005 Mar;166(3):913-21.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22.

Seifert G, Sobin LH. Histological typing of salivary gland tumours. 2. ed Berlin: Springer-Verlag;1991.

Seifert G, Sobin LH. The world health organization's histological classifications of salivary gland tumours: a commentary on the second edition. *Cancer*. 1992;70(2):379-85.

Skalova A, Lehtonen H, von Bogulawsky K, Leivo I. Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB 1 antibody in paraffin sections. *Hum Pathol*. 1994;25(9):929-35.

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, Säily M, Pääkkö P, Koistinen P, et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. *Histopathology*. 2001 Aug;39(2):179-86.

Soares AB, Araújo VC, Juliano PB, Altemani A. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(8):623-29.

Soares AB, Ponchio L, Juliano PB, Araújo VC, Altemani A. Lymphatic vascular density and lymphangiogenesis during tumour progression of carcinoma ex pleomorphic adenoma. *J Clin Pathol*. 2007;60(9):995-1000.

Spiro RH. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2.807 patients. *Head Neck Surg*. 1986;8(3):177-84.

Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):573-83.

Tian Z, Li L, Wang L, Hu Y, Li J. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Mar;39(3):235-42.

van Oijen MG, Medema RH, Slooteg PJ, Rijksen G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in nocycling cells. *Am J Clin Pathol*. 1998;110(1):24-31.

Wahlberg P, Anderson H, Biörklund A, Möller T, Perfekt R. Carcinoma of the parotid and submandibular glands – a study of survival in 2465 patients. *Oral Oncol.* 2002;38(7):706-13.

Weidner N, Semple JP, Welch Wr, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324(1):1-8.

Williams NP, Boyd DL, Choy L, Hanchard B. Salivary gland lesions: a jamaican perspective. *West Indian Med J*, 2001;50(1):62-65.

Zhu Q, Tipoe GL, White FH. Proliferative activity as detected by immunostaining with Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the human parotid gland. *Anal Quant Cytol Histol.* 1999;21(4):336-42.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise e contagem individual dos marcadores Ki-67, D2-40 e VEGF-C dos casos de adenoma pleomórfico

ADENOMA PLEOMÓRFICO										
Casos/ anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C		
								Estruturas:		
		5 campos					DML	Ductais	Mioepiteliais	Estroma
4105	1	4	6	13	9	4	7,2	4+3	3+2	1+1
5244	0	7	4	13	5	3	6,4	4+4	3+2	1+2
5738	15	6	1	1	1	1	2	4+4	4+4	2+3
7361	10	13	4	4	2	6	5,8	1+1	1+1	1+1
7472	14	5	5	4	5	5	4,8	1+1	1+1	0+0
7613	0	2	2	3	2	0	1,8	4+1	3+1	0+0
7846	12	18	7	10	16	12	12,6	4+1	2+1	1+1
8077	8	2	4	2	1	0	1,8	4+4	3+4	1+1
8084	11	3	4	1	1	4	2,6	4+1	4+1	3+1
8166	8	5	2	1	1	3	2,4	4+1	2+1	1+1
8437	0	1	2	5	0	0	1,6	3+1	1+1	1+1
8454	23	3	2	0	1	1	1,4	4+3	4+3	1+2
9336	8	8	2	3	8	2	4,6	4+4	4+4	4+2
9803	5	3	1	3	9	5	4,2	4+4	4+4	4+4
9973	14	10	8	4	2	17	8,2	4+2	3+2	4+4
10137	25	9	4	8	9	7	7,4	4+1	3+1	1+1
10167	8	2	4	8	6	3	4,6	4+4	4+4	4+3
10679	10	7	5	3	2	7	4,8	4+4	4+1	1+1
11152	27	9	5	4	4	2	4,8	4+2	4+2	4+1

APÊNDICE B – Análise e contagem individual dos marcadores Ki-67, D2-40 e VEGF-C dos casos carcinoma adenoide cístico

CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO											
Casos/ Anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C			
								Estruturas:			
		5 campos					DML	ductais		sólidas	Estroma
								Lumiais	não luminais		
335	7	-	-	-	-	-	-	-	-	1+1	0+0
3537	21	1	5	11	3	7	5,4	4+1	4+1	3+1	0+0
4320	15	2	7	1	0	0	2	4+2	3+2	3+2	0+0
5627	43	6	2	5	2	4	3,8	4+4	1+4	4+4	1+1
6689	15	7	1	0	0	0	1,6	4+1	4+1	4+1	4+1
7235	0	3	3	1	5	4	3,2	0+0	0+0	0+0	0+0
9260	11	1	4	6	4	6	4,2	4+1	3+1	3+1	0+0
9787	31	2	3	6	6	4	4,2	4+2	0+0	2+1	0+0
10704	35	4	1	4	5	2	3,2	0+0	0+0	0+0	0+0

APÊNDICE C – Análise e contagem individual dos marcadores Ki-67, D2-40 e VEGF-C dos casos de carcinoma mucoepidermoide

CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE										
Casos/ anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C		
								Estruturas:		
		5 campos					DML	císticas	sólidas	estroma
257	18	11	5	14	10	12	10,4	4+3	3+2	1+1
534	0	0	0	0	0	0	0	4+2	4+3	4+1
1582	3	0	0	0	0	0	0	4+4	4+4	3+2
2807	2	-	-	-	-	-	-	4+3	1+1	0+0
3176	0	-	-	-	-	-	-	3+1	1+1	0+0
3608	0	11	2	7	-	-	6,6	4+4	4+4	4+4
3635	0	1	1	0	0	0	0,4	-	4+4	4+2
4269	5	0	0	0	0	0	0	4+4	3+1	0+0
6067	21	5	5	2	5	2	3,8	4+3	4+3	4+2
7036	20	-	-	-	-	-	-	4+3	4+3	3+2
7617	27	0	0	0	0	0	0	1+1	3+1	0+0
7622	79	1	2	1	1	1	1,2	3+1	4+1	4+1
7749	1	0	0	0	0	0	0	4+1	0+0	0+0
7970	0	2	1	2	4	1	2	4+1	4+1	0+0
7973	0	4	4	6	6	-	5	0+0	0+0	0+0
9128	0	7	13	4	2	10	7,2	4+2	3+1	0+0
10385	15	5	4	3	1	-	3,2	4+1	4+1	0+0

APÊNDICE D – Análise e contagem individual dos marcadores Ki-67, D2-40 e VEGF-C dos casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau

ADENOCARCINOMA POLIMORFO DE BAIXO GRAU											
Casos/ anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C			
								Estruturas:			
		5 campos					DML	ductais		sólidas	Estroma
								células luminais	células não luminais		
3782	7	1	2	3	0	1	1,4	4+1	4+1	4+1	0+0
6210	34	-	-	-	-	-	-	1+1	1+1	3+1	0+0
6397	11	2	1	3	1	0	1,4	1+1	1+1	1+1	0+0
7237	14	2	2	2	0	1	1,4	-	-	4+2	0+0
7281	0	0	0	1	0	1	0,4	0+0	0+0	1+1	0+0
8056	1	0	0	0	0	0	0	4+1	4+1	4+4	4+1
8645	2	0	0	0	0	0	0	0+0	0+0	0+0	0+0
9173	29	5	1	1	0	2	1,8	4+1	4+1	4+1	-
9628	24	2	0	2	3	4	2,2	0+0	0+0	0+0	0+0
11276	40	3	1	2	2	1	1,8	4+2	4+2	4+2	4+2
11466	19	1	0	0	0	1	0,4	4+2	1+2	3+2	4+3

APÊNDICE E – Análise e contagem individual dos marcadores Ki-67, D2-40 e VEGF-C dos casos de mioepitelioma e mioepitelioma maligno

MIOEPITELIOMA								
Casos/ Anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C
		5 campos					DML	Estruturas
1089	0	0	0	0	0	0	0	4+4
5688	0	5	1	4	0	1	2,2	1+4
8266	0	1	0	0	0	0	0,2	4+3
8939	4	0	0	0	0	0	0	3+1
11573	6	1	0	0	0	0	0,2	4+4

MIOEPITELIOMA MALIGNO								
Casos/ anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C
		5 campos					DML	Estruturas
3099	0,3	2	1	4	3	2	2,4	4+2

APÊNDICE F – Análise e contagem individual dos marcadores Ki-67, D2-40 e VEGF-C dos casos de carcinoma de células acinares, adenocarcinoma de células basais, carcinoma em adenoma, cistoadenoma:

CARCINOMA DE CÉLULAS ACINARES								
Casos/ Anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C
		5 campos					DML	Estruturas
1881	-	0	0	0	0	0	0	4+4
9672	1	0	0	0	0	0	0	3+1

ADENOCARCINOMA DE CÉLULAS BASAIS								
Casos/ Anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C
		5 campos					DML	Estruturas
6333	13	0	0	0	0	0	0	4+3

CARCINOMA EM ADENOMA								
Casos/ Anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C
		5 campos					DML	Estruturas
2453	0	1	0	0	0	0	0,2	4+1

CISTOADENOMA								
Casos/ Anticorpos	Ki-67 (%)	D2-40						VEGF-C
		5 campos					DML	Estruturas
3287	0	1	-	-	-	-	1	4+4

ANEXO

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 053/2011-PH/CEP, referente ao Projeto intitulado “Correlação entre a densidade microvascular sanguínea e linfática e a proliferação celular em neoplasias de glândulas salivares”, sob a responsabilidade de YASMIN RODARTE CARVALHO, tendo como orientada MARCIA GIMENES AMERICO, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme, Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 09 de agosto de 2011.


Prof. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora