

YASMIN RODARTE CARVALHO



**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA CO-
EXPRESSÃO DE CITOQUERATINAS,
VIMENTINA E ACTINA EM NEOPLASIAS DE
GLÂNDULA SALIVAR**

YASMIN RODARTE CARVALHO

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA CO-
EXPRESSÃO DE CITOQUERATINAS,
VIMENTINA E ACTINA EM NEOPLASIAS DE
GLÂNDULA SALIVAR**

Tese apresentada ao Departamento de
Patologia da Faculdade de Odontologia de
São José dos Campos da UNESP, para
obtenção do título de Livre-Docente.

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

1998

611.316

.C 203e

± 1316

Carvalho, Yasmin Rodarte

Estudo imuno-histoquímico da co-expressão de citoqueratinas, vimentina e actina em neoplasias de glândula salivar. Yasmin Rodarte Carvalho. São José dos Campos, 1998.

Tese - Livre-Docência - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

1. Glândulas salivares - neoplasias - imuno-histoquímica

COD 611.316

Dedico este trabalho aos meus pais,
Edison e Vera, ao meu marido
Joaquim e aos nossos filhos, Julia e
Pedro.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Vera Cavalcanti de Araújo, pela amizade, ensinamentos e constante incentivo, não apenas na realização deste trabalho, mas também em minha carreira acadêmica.

Ao Professor Doutor Ney Soares de Araújo, pelo apoio e pela acolhida no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo.

A todos os colegas do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP e, em especial, às amigas Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, Elisabete Moraes e Rosilene Fernandes da Rocha, pela colaboração, apoio e incentivo.

Aos docentes e alunos de Pós-Graduação da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo, pela colaboração e, em especial, à Professora Dra. Suzana C.O.M. Sousa.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo e, em especial, à Edna Toddai e Elisa dos Santos, pelo inestimável auxílio na confecção da parte experimental deste e de outros trabalhos realizados.

À Terezinha de Fátima Arantes de Melo pela amizade, disponibilidade e presteza em colaborar, todas as vezes em que foi solicitada. Agradeço também pela paciência com minhas inúmeras dúvidas no manuseio do computador.

À Sílvia Scarpel pelo auxílio na impressão deste trabalho.

À Aydé Gonçalves Alves e Ana Lourdes da Silva Machado, pela amizade, incentivo e colaboração.

À FAPESP pelo Auxílio à Pesquisa referente ao Processo nº 94/0438-3.

À FUNDUNESP pelo Auxílio à Pesquisa referente ao Processo nº 470/94-DFP/F/CBS.

Ao CNPq pela Bolsa de Pesquisador referente ao Processo nº 300625/94-4 (NV).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

Resumo

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3 PROPOSIÇÃO	60
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
5 RESULTADOS.....	66
6 DISCUSSÃO.....	91
7 CONCLUSÕES.....	101
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

Abstract

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Adenoma pleomórfico. Citoqueratina 7 (CK 7) (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão da CK 7 nas células ductais luminais e CK 14 nas externas. 630x.
- Figura 2 - Adenoma pleomórfico. CK 8 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão da CK 8 nas células ductais luminais e CK 14 nas externas. 400x.
- Figura 3 - Adenoma pleomórfico. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). À direita, expressão da CK 14 nas células ductais luminais e de vimentina nas externas. À esquerda, células poligonais e plasmocitóides positivas para CK 14. 200x.
- Figura 4 - Adenoma pleomórfico. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Células ductais externas co-expressando CK 14 e vimentina e células luminais negativas. 630x.
- Figura 5 - Adenoma pleomórfico. Actina (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão da CK 14 nas células ductais externas e células luminais negativas. Algumas células não luminais e paredes vasculares positivas para actina. 200x.
- Figura 6 - Adenoma pleomórfico. Actina (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão da CK 14 em células ductais luminais e externas. Positividade para actina em paredes vasculares. 400x.

- Figura 7 - Adenoma pleomórfico. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de EMA nas células ductais lumenais e de CK 14 nas externas. 400x.
- Figura 8 - Adenoma pleomórfico. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Detalhe da figura anterior, mostrando co-expressão de EMA e CK 14 em alguns lúmens (setas). 630x.
- Figura 9 - Mioepitelioma. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de CK 7 em grupos de células plasmocitóides. Algumas células plasmocitóides positivas para a CK 14. 400x.
- Figura 10 - Mioepitelioma. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 7 e CK 14 em algumas células plasmocitóides (setas) e expressão de CK 14 em outras. 630x.
- Figura 11 - Mioepitelioma. CK 19 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 19 e CK 14 em algumas células (setas) e expressão isolada de CK 19 ou CK 14 em outras. 400x.
- Figura 12 - Mioepitelioma. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de CK 14 em células lumenais e de vimentina em células plasmocitóides. 400x.
- Figura 13 - Mioepitelioma. Actina (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de CK 14 em grupos de células plasmocitóides e de actina em paredes vasculares. 400x.
- Figura 14 - Adenoma de células basais, tipo túbulo-trabecular. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de CK 14 nas células tubulares lumenais e de vimentina nas externas. 630x.

- Figura 15 - Adenoma de células basais, tipo tubular. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Co-expressão de CK 14 e vimentina nas células tubulares externas. Células luminais negativas. 630x.
- Figura 16 - Adenoma de células basais, tipo tubular. Co-expressão de CK 7 e CK 14 nas células luminais e discreta expressão de CK 14 nas externas. 630x.
- Figura 17 - Adenoma de células basais, tipo tubular. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de EMA nas células tubulares luminais e discreta expressão de CK 14 nas externas. 630x.
- Figura 18 - Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (APBGM). CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de vimentina em massas celulares sólidas e expressão de CK 14 em grupos celulares menores e células luminais. 200x.
- Figura 19 - APBGM. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Co-expressão de CK 14 e vimentina em áreas trabeculares. 400x.
- Figura 20 - APBGM. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 7 e CK 14 em alguns grupos de células tumorais (setas) e expressão de CK 7 em outros. 630x.
- Figura 21 - APBGM. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 7 e CK 14 em células tumorais de áreas papilíferas. 400x.
- Figura 22 - APBGM. CK 8 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 8 e CK 14 em grupos de células tumorais de áreas sólidas. 630x.

Figura 23 - APBGM. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). À esquerda, expressão de EMA em células mucosas e à direita, expressão de CK 14 em algumas células tumorais. 400x.

Figura 24 - APBGM. EMA (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de EMA em células mucosas e discreta expressão de vimentina nas demais células tumorais. 400x.

Figura 25 - APBGM. Actina (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de CK 14 nas células tumorais e de actina em paredes vasculares. 630x.

Figura 26 - Carcinoma adenóide cístico (CAC), tipo tubular. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 7 e CK 14 nas células luminais e discreta expressão de CK 14 nas externas. 630x.

Figura 27 - CAC, tipo tubular. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de EMA e CK 14 em células luminais. 630x.

Figura 28 - CAC, tipo tubular. EMA (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de EMA nas células luminais e de vimentina nas externas. 630x.

Figura 29 - CAC, tipo tubular. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de CK 14 nas células luminais e de vimentina nas externas. 630x.

Figura 30 - CAC, tipo tubular. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de CK 14 nas células luminais e expressão de vimentina nas externas, com discreta co-expressão em algumas células externas. 630x.

Figura 31 - CAC, tipo cribriforme. Actina (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de CK 14 nas células ductais luminais e expressão de actina nas células que revestem os pseudo-cistos e periféricas dos cilindros. 400x.

Figura 32 - CAC, área sólida. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de vimentina na maioria das células tumorais e expressão de CK 14 em algumas células, principalmente luminais. 630x.

RESUMO

Os tumores de glândulas salivares humanas originados do ducto intercalar apresentam grande variação histológica e citológica, atribuída principalmente à presença da célula mioepitelial. Neste estudo, pesquisou-se a presença dos filamentos intermediários vimentina e citoqueratina, de microfilamentos de actina e do antígeno epitelial de membrana (EMA), em 30 neoplasias originadas do ducto intercalar: 5 adenomas pleomórficos, 3 adenomas de células basais, 5 mioepiteliomas, 7 carcinomas adenóide císticos (CAC) e 10 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade (APBGM), com o intuito de verificar o grau de diferenciação das células neoplásicas e uma possível relação da diferenciação mioepitelial com a presença de secreção intra-luminal. Foram realizadas reações imuno-histoquímicas para dupla evidenciação de antígenos. Nas neoplasias em que há diferenciação para ducto intercalar (adenoma pleomórfico, adenoma de células basais e CAC), as células luminais expressam as citoqueratinas 7, 8, 18, 19 e eventualmente co-expressam a citoqueratina 14. Alguns ductos apresentam células luminais positivas para EMA, especialmente quando há secreção em seu lúmen. As células externas das estruturas ductais e demais células com características mioepiteliais expressam vimentina e co-expressam eventualmente actina e/ou citoqueratina 14, sendo sempre negativas para as demais citoqueratinas e para EMA. A co-expressão de actina, vimentina e citoqueratina 14, nas células externas das estruturas ductais, é mais comum quando a célula luminal é positiva para EMA. As células plasmocitóides, presentes no mioepitelioma e no adenoma pleomórfico, expressam vimentina e raramente as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19, eventualmente co-expressando a citoqueratina 14, e são negativas para os outros antígenos

pesquisados. Nos tumores em que não há diferenciação para ducto intercalar (APBGM e adenoma de células basais sólido) as células expressam vimentina e as citoqueratinas 7, 8, 18 e 14, eventualmente co-expressando as citoqueratinas 8 e 18 com a 14. Concluindo, nos tumores com diferenciação para ducto intercalar, a célula mioepitelial expressa vimentina e, eventualmente, co-expressa actina e/ou citoqueratina 14, jamais co-expressando outras citoqueratinas com a vimentina. A expressão de citoqueratina 14 e actina pela célula mioepitelial neoplásica é independente, indicando que tal expressão deve ser induzida por estímulos diferentes. Entretanto, a função secretória das células luminais, evidenciada pelo antígeno epitelial de membrana, parece ter influência na expressão de actina e citoqueratina 14, pela célula mioepitelial. Nos tumores sem diferenciação para ducto intercalar, há co-expressão de vimentina com as citoqueratinas 7, 8, 18 e 14, indicando características transicionais no sentido de diferenciação acinar.

1 INTRODUÇÃO

As glândulas salivares podem dar origem a uma variada gama de neoplasias, seja a partir do segmento ducto intercalar/ácino, seja a partir do segmento do ducto excretor. A grande variação fenotípica observada nas neoplasias originadas do segmento intercalar é atribuída, principalmente, à presença de células mioepiteliais como componentes dessas neoplasias.

Numerosos métodos têm sido empregados para o estudo das neoplasias glandulares, desde os puramente morfológicos, utilizando microscopia de luz ou eletrônica, até aqueles que buscam demonstrar a presença de diferentes componentes celulares, os quais fornecem importantes informações quanto à histogênese e biologia tumoral. O método imuno-histoquímico é um dos mais utilizados, permitindo o emprego de um painel de marcadores que compreende especialmente filamentos intermediários de citoqueratina, vimentina e proteína glial fibrilar ácida, proteína S-100, microfilamentos de actina, filamento de miosina e marcadores de células de origem epitelial, como o antígeno epitelial de membrana.

Os filamentos intermediários constituem um grupo de proteínas que, juntamente com a tubulina e a actina, formam o citoesqueleto presente em praticamente todas as células dos vertebrados. Um determinado tipo celular apresenta, geralmente, apenas uma classe de filamentos intermediários, os quais são célula-específicos e frequentemente se mantêm nas células que sofrem transformação neoplásica (Erlandson³⁵, 1984; Osborn & Weber⁷⁶, 1983).

Nas neoplasias de glândulas salivares observa-se, no entanto, uma variação na expressão de filamentos intermediários e de microfilamentos de actina, especialmente na célula mioepitelial

neoplásica. Enquanto nas glândulas normais as células mioepiteliais expressam actina (Araújo et al.³, 1994; Takai et al.⁹⁰, 1995; Tsukada et al.⁹³, 1987) e citoqueratina 14 (Araújo & Sousa², 1996; Born et al.⁸, 1987; Burns et al.¹⁰, 1988; Dardick et al.²⁹, 1987; Dardick et al.³¹, 1991; Draeger et al.³⁴, 1991; Gustafsson et al.⁴⁶, 1988; Gustafsson et al.⁴⁸, 1988; Sousa⁸⁹, 1994; Takai et al.⁹⁰, 1995), nos tumores originados do segmento intercalar tais células em geral expressam vimentina (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Azumi & Battifora⁴, 1987; Bergman et al.⁷, 1991; Burns et al.¹⁰, 1988; Caselitz et al.¹⁴, 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982; Chomete et al.¹⁹, 1991; Dardick et al.²⁷, 1989; Dardick et al.³⁰, 1989; Erlandson et al.³⁶, 1984; Ferreira³⁸, 1994; Gustafsson et al.⁴⁷, 1989; Leoncini et al.⁶¹, 1988; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Regezi et al.⁸², 1991; Takai⁹⁰, 1995; Williams et al.⁹⁷, 1993), que não é observada em glândulas normais, e podem ou não expressar actina e citoqueratina 14 (Araújo & Sousa², 1996; Araújo et al.³, 1994; Dardick et al.³², 1992; Figueiredo³⁹, 1995; Regezi et al.⁸², 1991; Sousa⁸⁹, 1994; Zarbo et al.⁹⁹, 1991). Tais variações estão provavelmente relacionadas ao grau de diferenciação que a célula mioepitelial alcança nas diversas neoplasias, o que se reflete nos diferentes fenótipos celulares e variados arranjos arquiteturais observados entre os elementos neoplásicos.

Neste estudo analisamos um grupo de neoplasias de glândulas salivares, provavelmente originadas do segmento intercalar, por meio de método imuno-histoquímico, visando pesquisar a expressão de filamentos intermediários de citoqueratina e vimentina, de microfilamentos de actina e do antígeno epitelial de membrana. Tais marcadores são evidenciados dois a dois, com o intuito de verificar o grau de diferenciação dos elementos neoplásicos e uma possível relação da sua expressão com a presença de secreção nas células luminiais neoplásicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histogênese e características gerais das células glandulares

As glândulas salivares humanas, maiores e menores, começam seu desenvolvimento como brotamentos sólidos do epitélio oral. À medida que esses brotamentos proliferam, os cordões sólidos começam a apresentar luz, formando uma dupla camada de células cubóides progenitoras. As células progenitoras, aparentemente sob influência do mesênquima circundante, diferenciam-se nos vários ductos, ácinos e mioepitélio (Eversole³⁷, 1971; Regezi & Batsakis⁸¹, 1977). Esse processo começa em torno da sexta semana intra-útero para as glândulas salivares maiores, e em torno da nona semana para as glândulas salivares menores. A função salivar começa várias semanas após o desenvolvimento inicial das glândulas, com a morfologia glandular madura aparecendo muitas semanas mais tarde, por ocasião do nascimento (Regezi & Batsakis⁸¹, 1977).

A unidade glandular madura é constituída por ácinos serosos ou mucosos, ligados a um ducto intercalar, o qual por sua vez está conectado a um ducto estriado, que finalmente descarrega a secreção em um ducto excretor extralobular (Eversole³⁷, 1971; Regezi & Batsakis⁸¹, 1977). Células mioepiteliais estão localizadas em torno da periferia dos ácinos e ductos intercalares ou estriados (Dardick et al.²⁷, 1989; Eversole³⁷, 1971; Hubner et al.⁵⁵, 1971; Regezi & Batsakis⁸¹, 1977).

As células acinares são altamente diferenciadas e são responsáveis pela produção da secreção mucosa ou serosa. As células do ducto intercalar são células cubóides relativamente indiferenciadas que formam um conduto para as secreções acinares (Regezi & Batsakis⁸¹, 1977). Na junção entre ácinos e ductos intercalares foram

descritas células contendo grânulos secretórios, as quais teriam características intermediárias entre células próprias do ducto intercalar e células acinares (Tandler⁹¹, 1993). As células dos ductos estriados são bem diferenciadas e apresentam profundas invaginações na membrana basal e abundantes mitocôndrias. Tais células, como as células dos túbulos proximais dos rins, desempenham um papel no transporte de água e eletrólitos. As células epiteliais dos ductos excretores variam de colunares com células mucosas volumosas, na região proximal, a células escamosas estratificadas distalmente (Regezi & Batsakis⁸¹, 1977). As células mioepiteliais apresentam um corpo celular estrelado e agem como células contráteis, aparentemente forçando ativamente a eliminação da secreção dos ácinos e ductos intercalares (Hubner et al.⁵⁵, 1971; Regezi & Batsakis⁸¹, 1977).

À microscopia eletrônica, a célula mioepitelial de uma glândula salivar normal contém grande quantidade de feixes de microfilamentos de actina, juntamente com corpos densos de tropomiosina e miosina e vesículas endocitóticas (Batsakis et al.⁶, 1983; Hubner et al.⁵⁵, 1971). Tonofilamentos podem estar presentes em algumas células mioepiteliais, que apresentam ainda uma intrincada rede de filamentos de espessura intermediária (7-11 nm) (Batsakis et al.⁶, 1983; Dardick et al.²⁷, 1989). Além disso, na sua porção não filamentosa, a célula mioepitelial apresenta as organelas usuais, grânulos de glicogênio e poucos glóbulos de gordura neutra, porém, nenhum produto secretório (Batsakis et al.⁶, 1983). A célula mioepitelial é separada do estroma por membrana basal, e está unida às células epiteliais por meio de desmossomas (Hubner et al.⁵⁵, 1971).

Duas teorias procuram explicar a citodiferenciação nas glândulas salivares, nos estágios mais tardios do desenvolvimento e na glândula madura: a unicelular pluripotencial e a bicelular semipluripotencial. Segundo a teoria unicelular pluripotencial, a célula de

reserva do ducto excretor daria origem a todos os outros elementos glandulares. A outra teoria, bicelular semipluripotencial, propõe que a célula de reserva do ducto excretor 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 (Eversole³⁷, 1971).

Com relação à gênese de tumores, pela teoria unicelular pluripotencial, a transformação neoplásica da célula de reserva do ducto excretor daria origem às diversas neoplasias glandulares, sendo que o desenvolvimento de tumores específicos estaria relacionado à elaboração de fatores potenciais de diferenciação. Pela teoria bicelular semipluripotencial, tanto as células de reserva do ducto excretor, como a célula do ducto intercalar estariam implicadas na gênese de neoplasias. A célula do ducto intercalar daria origem ao adenoma canalicular, adenoma celular, cilindroma, oncocitoma, tumor de Warthin, adenoma papilar, adenocarcinoma papilar e carcinoma de células acinares. Por outro lado, a célula de reserva do ducto excretor daria origem ao papiloma intraductal, adenoma pleomórfico, carcinoma epidermóide e carcinoma mucoepidermóide (Eversole³⁷, 1971).

Acrescentando às observações anteriores achados ultra-estruturais, Regezi & Batsakis⁸¹ (1977) concordam com a teoria bicelular para a histogênese dos tumores de glândulas salivares, que teriam origem a partir de duas células de reserva indiferenciadas, a célula de reserva do ducto excretor e a célula de reserva do ducto intercalar. A aplicação do estímulo oncogênico/carcinogênico agindo sobre o processo de morfo e citodiferenciação resultaria no advento de diferentes tipos de neoplasia, dependendo do estágio de desenvolvimento no qual o

estímulo agisse. Sob essa hipótese, o ducto intercalar daria origem ao carcinoma adenóide cístico, carcinoma de células acinares, adenoma monomórfico e tumor misto. Alguns carcinomas ductais seriam também derivados de precursores do ducto intercalar. As células de reserva do ducto excretor dariam origem ao carcinoma de células escamosas, carcinoma mucoepidermóide e adenocarcinoma papilar mucinoso (Batsakis⁵, 1980).

Para Regezi & Batsakis⁸¹ (1977) o adenoma pleomórfico teria origem a partir da célula de reserva do ducto intercalar, pois a mesma seria progenitora tanto de células ductais como mioepiteliais, os dois tipos celulares componentes do tumor.

Por outro lado, Dardick et al.²⁸ (1983) propuseram a origem do adenoma pleomórfico a partir da transformação neoplásica da unidade ducto-acinar completa, ao invés de uma célula ductal de reserva em particular.

Para Erlandson et al.³⁶ (1984) os adenomas pleomórficos consistem de misturas variáveis de células epiteliais ductais e células mioepiteliais metaplásicas, além de focos ocasionais de grânulos secretórios apicais ou mucinas luminais, indicando diferenciação acinar. Segundo os autores, o adenoma pleomórfico derivaria da transformação neoplásica do ducto intercalar.

Lam⁶⁰ (1985) afirmou que a principal célula proliferante no adenoma pleomórfico é a célula mioepitelial modificada, entretanto, como não observou diferenciação acinar, o autor concluiu que o adenoma pleomórfico deriva da transformação neoplásica do ducto intercalar ou unidade ductal-mioepitelial, ao invés da unidade ducto-acinar sugerida por Dardick et al.²⁸ (1983).

Dardick et al.²⁶ (1990) enfatizaram posteriormente a teoria multicelular para a histogênese dos tumores de glândulas salivares. Esta teoria baseia-se em evidências de que todos os tipos celulares na

glândula salivar normal, desde a fase fetal até a idade adulta, são capazes de sofrer divisão celular, e que esta característica não seria restrita a uma população celular em particular, em determinada localização. Segundo a teoria multicelular de histogênese tumoral, todos os tipos celulares na glândula adulta seriam potencialmente capazes de originar uma neoplasia.

Com relação à histogênese, é importante considerar-se que, embora células aparentemente indiferenciadas possam estar presentes em glândulas salivares normais ou seus tumores, não se conseguiu demonstrar, científica ou experimentalmente, a presença de células ductais de reserva e seu papel central na gênese de neoplasias (Dardick & Van Nostrand²⁴, 1987; Norberg et al.⁷², 1996). A observação experimental da capacidade proliferativa dos diversos elementos do parênquima glandular, inclusive células acinares e mioepiteliais (Burgess et al.⁹, 1996; Norberg et al.⁷², 1996) e a observação de que tanto células luminais como não luminais se encontram no ciclo de proliferação celular (Norberg et al.⁷³, 1997), vêm embasar a teoria multicelular defendida por Dardick et al.²⁶ (1990).

Baseados no conceito de que a associação estrutural e funcional de ácino, ducto intercalar e mioepitélio forma a unidade ducto-acinar (Dardick et al.²⁸, 1983), Dardick & Van Nostrand²⁴ (1987) propuseram que esta, ao sofrer indução neoplásica e consequente proliferação, poderia originar três tipos principais de tumores. Estes tumores apresentariam: 1) diferenciação pura de células epiteliais acinares ou ductais luminais (certos adenomas e adenocarcinomas); 2) crescimento coordenado de células neoplásicas luminais e mioepiteliais (adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico); ou 3) proliferação exclusiva de células mioepiteliais neoplásicas (mioepiteliomas).

A considerável diversidade morfológica nos subgrupos de tumores das categorias 2 e 3 acima, seria devida fundamentalmente a fatores genéticos que controlariam a proliferação do mioepitélio neoplásico, ao tipo e grau de atividade sintética dessas células, seu grau de modificação estrutural e o tipo de metaplasia que elas apresentam (Dardick & Van Nostrand²⁴, 1987; Erlandson et al.³⁶, 1984). Ou seja, a participação da célula mioepitelial nesses tumores justificaria a sua grande diversidade morfológica, mesmo considerando-se um tipo tumoral específico (Batsakis et al.⁶, 1983; Dardick & Van Nostrand²³, 1985; Dardick & Van Nostrand²⁴, 1987; Erlandson et al.³⁶, 1984; Hubner et al.⁵⁵, 1971).

2.2. Aspectos histológicos e ultra-estruturais do adenoma pleomórfico, mioepitelioma, adenoma de células basais, carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

No presente estudo foram analisadas as seguintes neoplasias, presumidamente originadas do segmento do ducto intercalar e pertencentes às categorias 2 e 3 descritas por Dardick & Van Nostrand²⁴ (1987): adenoma pleomórfico, mioepitelioma, adenoma de células basais, carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.

O adenoma pleomórfico constitui um tipo de neoplasia glandular no qual se observa o crescimento combinado de células epiteliais lumbais e células mioepiteliais, juntamente com a elaboração de produtos celulares e alterações metaplásicas, levando à formação de regiões mixo-condróides (Dardick & Van Nostrand²⁴, 1987; Dardick et al.²⁸, 1983). A principal célula proliferante no adenoma pleomórfico seria

a célula mioepitelial (Dardick et al.²⁸, 1983), cujas características morfológicas observadas à microscopia de luz incluem: aspecto hialino ou plasmocitóide; aspecto mesenquimal (células estrelárias, fusiformes ou condróides) e aspecto epitelial (células escamosas ou claras) (Batsakis, Kramer & Sciubba⁶, 1983; Dardick & Van Nostrand²³, 1985). Às vezes as células mioepiteliais apresentam-se com contornos angulares, discretamente separadas, circundando ductos ou formando agrupamentos de tamanhos variados ou lençóis (Dardick & Van Nostrand²³, 1985). O aspecto da célula mioepitelial neoplásica à microscopia eletrônica frequentemente está modificado, com relação à célula mioepitelial normal. A célula mioepitelial tumoral pode apresentar-se distendida e conter grande quantidade de filamentos intermediários, correspondendo ao aspecto plasmocitóide à microscopia de luz; ter aspecto fusiforme e conter pequena quantidade de microfilamentos com corpos densos (diferenciação do tipo músculo liso); pode ser poligonal, assumindo um aspecto "epitelial" e exibir junções intercelulares do tipo desmossomas ou formar grupos com metaplasia escamosa (Dardick & Van Nostrand²³, 1985; Dardick et al.²⁸, 1983; Erlandson et al.³⁶, 1984; Sousa⁸⁸, 1990). A presença de tonofilamentos perinucleares e remanescentes de membrana basal também são aspectos ocasionalmente observados nas células mioepiteliais neoplásicas (Erlandson et al.³⁶, 1984). Além disso, as estruturas ductiformes presentes no adenoma pleomórfico por vezes contêm grânulos de secreção nas suas células luminiais (Sousa⁸⁸, 1990).

Baseado em observações ultraestruturais, Kierszenbaum⁵⁹ (1968) descreveu dois componentes celulares distintos na porção epitelial do adenoma pleomórfico, um com funções predominantemente secretórias, enquanto o outro participaria do processo de fibrilogênese. O autor considerou que os dois tipos poderiam representar distintos graus de diferenciação de um mesmo tipo celular, uma vez que observou,

ainda, uma variedade transicional entre os dois tipos celulares bem definidos.

Um aspecto importante, observado no adenoma pleomórfico, é a produção de glicosaminoglicanas e proteoglicanas pelas células mioepiteliais modificadas. Tais produtos da matriz intercelular provavelmente desempenham papel importante na modulação de expressões fenotípicas das células tumorais, influenciando o citoesqueleto e induzindo o aumento da elaboração de produtos da matriz extracelular, como fibronectina, hialuronato, proteoglicanas e procolágeno (Lam⁶⁰, 1985). Essa modulação foi observada por Jaegger⁵⁶ (1995), em células derivadas do adenoma pleomórfico, cultivadas e identificadas como mioepiteliais símile, as quais apresentaram fenótipos variados, em contato com diversos componentes da matriz extracelular. Quando crescidas dentro de um arranjo tridimensional de matrigel, uma combinação de proteínas da membrana basal, apresentaram morfodiferenciação e citodiferenciação, formando agrupamentos tridimensionais, com dupla camada de células epitelióides delimitando espaços luminais. Células crescidas sobre o matrigel desenvolveram fenótipo estrelário, lembrando as células mioepiteliais normais, enquanto laminina e colágenos tipos I e IV, quando aplicados individualmente, não causaram efeito no fenótipo das células (Jaegger⁵⁶, 1995).

As células mioepiteliais inicialmente estão relacionadas às ductais luminais, mas à medida que proliferam, elas são gradualmente separadas por quantidades crescentes de componentes da matriz extracelular, resultando no desenvolvimento de zonas mixóides e condróides (Dardick & Van Nostrand²³, 1985; Dardick et al.²⁸, 1983).

O mioepitelioma é composto basicamente por células mioepiteliais, podendo exibir um pequeno número de estruturas ductais e áreas mixóides (Dardick et al.²⁷, 1989; Dardick et al.³⁰, 1989). No mioepitelioma observa-se um arranjo e diferenciação celular semelhantes

aos observados no componente não luminal do adenoma pleomórfico (Dardick²², 1995; Takai et al.⁹⁰, 1995). Com relação à arquitetura, distinguem-se os seguintes tipos de mioepitelioma: sólido, mixóide (semelhante ao adenoma pleomórfico), reticular (semelhante ao adenoma canalicular) e misto (Dardick²², 1995; Dardick et al.²⁷, 1989; Dardick et al.³⁰, 1989). Os mioepiteliomas podem apresentar ainda uma variedade de fenótipos celulares: fusiforme, hialino, epitelial e claro. Alguns tumores apresentam mais de um tipo celular, sendo então designados mistos. No tipo fusiforme geralmente são observados alguns ou todos os seguintes aspectos: microfilamentos com corpos densos e inserção em densidades do plasmalema, filamentos intermediários e tonofilamentos, desmossomas, vesículas de micropinocitose e lâmina basal. No tipo hialino as células são ovais ou poligonais, com núcleo excêntrico e uma região hialina no citoplasma (Dardick et al.²⁷, 1989). À microscopia eletrônica observa-se que grande parte do citoplasma é ocupada por filamentos intermediários, distribuídos difusamente, exibindo características semelhantes às células plasmocitóides observadas no adenoma pleomórfico (Dardick et al.²⁷, 1989; Dardick et al.³⁰, 1989). As células mioepiteliais modificadas do tipo epitelial são poligonais, podendo apresentar-se isoladamente ou em grupos. Algumas são unidas por desmossomas, possuem poucas organelas e poucos ou nenhum filamento. As células mioepiteliais claras exibem, à coloração de rotina, citoplasma discretamente eosinófilo ou não corado (Dardick et al.²⁷, 1989).

O adenoma de células basais é composto histologicamente por células isomórficas, exibindo uma camada basal proeminente. À microscopia de luz distinguem-se quatro padrões celulares: sólido, trabecular, tubular e membranoso (Gardner & Daley⁴², 1983; Seifert et al.⁸⁴, 1990). Mais de um desses padrões é comumente observado em um mesmo tumor (Gardner & Daley⁴², 1983). À microscopia eletrônica, são

observadas não apenas células basais, mas também células ductais e mioepiteliais. O desenvolvimento de estruturas distintas semelhantes à membrana basal e a ausência de componente mixóide no estroma, são também característicos (Seifert et al.⁸⁴, 1990). Uma variante cribriforme foi descrita para os subtipos de adenoma de células basais, caracterizada pela presença de depósitos focais hialinos, contendo lâmina basal e glicosaminoglicanos, no interior dos agrupamentos celulares. Nestes, porém, não se nota a presença de ductos ou lumens, característicos do carcinoma adenóide cístico (Dardick et al.³³, 1992).

O carcinoma adenóide cístico apresenta, como o adenoma pleomórfico, a proliferação de dois tipos celulares básicos: mioepitelial e célula cubóide ductal, formando seus padrões de crescimento característicos: sólido, tubular e cribriforme (Caselitz et al.¹³, 1986; Dardick & Van Nostrand²⁴, 1987). No seu padrão cribriforme clássico, o acúmulo de material hialino no interior das massas celulares, formando espaços microcísticos ou pseudo-luminais, ocorre em associação com as células mioepiteliais de aspecto fusiforme (Caselitz et al.¹³, 1986; Dardick & Van Nostrand²⁴, 1987; Hubner et al.⁵⁵, 1971). Nas regiões celulares sólidas, entre os pseudo-cistos, podem-se detectar estruturas tubulares formadas por células cubóides semelhantes às do ducto intercalar (Caselitz et al.¹³, 1986; Dardick & Van Nostrand²⁴, 1987). No tipo tubular há uma predominância de estruturas tubulares, nas quais a proporção de células cubóides e células mioepiteliais fusiformes é equivalente, conferindo aspecto característico do sistema de ducto intercalar (Caselitz et al.¹³, 1986). No tipo sólido, as massas compactas de células tumorais mostram algumas estruturas ductais dispersas e espaços microcísticos de tamanho variado, geralmente pequeno. Em áreas adjacentes frequentemente observa-se o aspecto cribriforme típico (Dardick & Van Nostrand²⁴, 1987). Um padrão trabecular também é descrito, no qual as trabéculas celulares neoplásicas são separadas por estroma hialino

(Caselitz et al.¹³, 1986). Além das células dos tipos mioepitelial e ductal luminal, também são descritas células basalóides, com núcleos vesiculares grandes e nucléolos distintos. Essas células estão frequentemente reunidas em grupos sólidos contendo alguns espaços pseudo-císticos (Chomette et al.¹⁹, 1991).

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade caracteriza-se por apresentar um amplo espectro de padrões histológicos (Dardick & Van Nostrand²⁵, 1988; Norberg et al.⁷¹, 1991; Regezi et al.⁸², 1991). Nesta neoplasia as células dispõem-se em cordões, túbulos, papilas, colunas anastomosantes, estruturas glandulares ou adenóides e agregados sólidos, de tamanhos variados (Dardick & Van Nostrand²⁵, 1988). Outro aspecto observado também nesses tumores é o cribriforme, resultante da produção excessiva de lâmina basal e formação de espaços pseudo-císticos (Norberg et al.⁷¹, 1991). As células neoplásicas do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau são ovais ou fusiformes, apresentam tamanho uniforme (Regezi et al.⁸², 1991) e têm mais citoplasma e núcleos vesiculares maiores do que as células basalóides do carcinoma adenóide cístico (Dardick & Van Nostrand²⁵, 1988). Histologicamente as principais características do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau são o crescimento infiltrativo por meio de pequenos ductos de uma camada celular e o sincício de células uniformes (Regezi et al.⁸², 1991). À microscopia eletrônica, as células do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau exibem diferenciação ductal e mioepitelial (Norberg et al.⁷¹, 1991), além de células de transição, com características intermediárias entre mioepiteliais e epiteliais luminais, formando lumes ductais verdadeiros e apoiando-se em lâmina basal (Carvalho et al.¹¹, 1993; Dardick & Van Nostrand²⁵, 1988; Norberg et al.⁷¹, 1991).

2.3. Métodos de estudo

Com o objetivo de estudar as neoplasias de glândulas salivares em geral e, em particular, a participação da célula mioepitelial, visando não apenas esclarecer a histogênese dessas neoplasias, mas também analisar as diversas características de diferenciação celular apresentadas, vários métodos têm sido empregados.

Morfologicamente a célula mioepitelial é identificada à microscopia de luz e eletrônica com base em suas características histológicas e ultra-estruturais (Hubner et al.⁵⁵, 1971; Palmer⁷⁷, 1986; Shear⁸⁵, 1966). Diversos métodos de coloração histológica e histoquímica foram utilizados para a demonstração da célula mioepitelial, como as reações de fosfatase alcalina e adenosina trifosfatase (Shear⁸⁵, 1966), embora não fossem específicas para a célula mioepitelial e apresentassem variações inter-espécies (Batsakis et al.⁶, 1983; Palmer⁷⁷, 1986). Técnicas de coloração histológica também utilizadas para a demonstração da célula mioepitelial compreendem a do ácido tânico-ácido fosfomolibdico- Levanol "fast cyanine 5RN" (TPL) (Nikai et al.⁷⁰, 1986; Palmer⁷⁷, 1986), e as técnicas da hematoxilina-ácido fosfotúngstico e hematoxilina férrica (Palmer⁷⁷, 1986; Shear⁸⁵, 1966).

Outros métodos amplamente utilizados incluem histoquímica associada com microscopia eletrônica (Lam⁶⁰, 1985), imunofluorescência (Caselitz et al.¹⁴, 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982; Erlandson et al.³⁶, 1984); imuno-histoquímica (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo & Sousa², 1996; Araújo et al.³, 1994; Caselitz & Löning¹², 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982; Dardick et al.³¹, 1991; Gugliotta et al.⁴⁴, 1988; Hara et al.⁵¹, 1983; Kahn et al.⁵⁸, 1985; Mori et al.⁶⁵, 1987; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Sato et al.⁸³, 1984; Zarbo et al.⁹⁹, 1991;) e imuno-eletromicroscopia, além de métodos de biologia celular e molecular, associados ou não com métodos bioquímicos ou imunoquímicos.

2.4. Estudos imuno-histoquímicos

Nos estudos imuno-histoquímicos, os principais anticorpos utilizados para a identificação da célula mioepitelial incluem actina, miosina e actomiosina, usualmente detectados em células mioepiteliais normais (Araújo et al.³, 1994; Azumi & Battifora⁴, 1987; Chen et al.¹⁷, 1988; Gugliotta et al.⁴⁴, 1988; Hirano et al.⁵³, 1990; Mori et al.⁶⁵, 1987; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Palmer et al.⁷⁸, 1985; Takai et al.⁹⁰, 1995; Tsukada et al.⁹³, 1987; Zarbo et al.⁹⁹, 1991), proteína S-100 e filamentos intermediários de vimentina, citoqueratina, desmina e proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

A distribuição de proteína S-100 e queratina na célula mioepitelial normal tem sido objeto de controvérsia, porém, células mioepiteliais modificadas presentes em tumores são frequentemente positivas para a proteína S-100 (Hara et al.⁵¹, 1983; Huang et al.⁵⁴, 1996; Kahn et al.⁵⁷, 1983; Leoncini et al.⁶¹, 1988; Nakajima et al.⁶⁸, 1982; Nakazato et al.⁶⁹, 1982). A presença de subtipos de citoqueratinas tem sido demonstrada de maneira heterogênea em células mioepiteliais neoplásicas (Araújo & Sousa², 1996). A vimentina também tem sido demonstrada em células mioepiteliais neoplásicas (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Burns et al.¹⁰, 1988; Caselitz et al.¹³, 1986; Caselitz et al.¹⁴, 1981; Chomette et al.¹⁹, 1991; Erlandson et al.³⁶, 1984; Morinaga et al.⁶⁷, 1987), enquanto desmina (Gustafsson et al.⁴⁷, 1989) e GFAP (Burns et al.¹⁰, 1988; Gustafsson et al.⁴⁷, 1989) foram eventualmente observadas nessas células.

Recentemente diversos estudos imuno-histoquímicos têm utilizado também anticorpos anti-antígenos de proliferação celular, visando a identificação da população celular proliferante nos tumores de glândulas salivares (Norberg et al.⁷³, 1997; Queiroz⁸⁰, 1997; Yang et al.⁹⁸, 1993).

2.4.1. Proteína S-100

Um dos primeiros marcadores utilizados para identificação da célula mioepitelial, por meio de método imuno-histoquímico, foi a proteína S-100. Esta foi descrita inicialmente como uma proteína específica do tecido nervoso, assim designada devido à sua solubilidade em solução de sulfato de amônio a 100%, em pH neutro. Posteriormente a proteína S-100 foi detectada em outras células normais, incluindo melanócitos, células de Langerhans da pele, células reticulares interdigitantes do linfonodo, condrócitos e células mioepiteliais de glândulas sudoríparas, mamárias e salivares, além de tumores originados dessas células (Kahn et al.⁵⁷, 1983; Nakajima et al.⁶⁸, 1982).

A proteína S-100 é uma proteína ácida, ligadora de cálcio, composta por no mínimo três formas, S-100ao, S-100a e S-100b, que são dímeros das subunidades alfa-alfa, alfa-beta e beta-beta, respectivamente. Diferentes marcações teciduais ou celulares são observadas, conforme se utiliza anticorpo policlonal ou monoclonal para a proteína S-100 ou suas várias subunidades (Haimoto et al.⁵⁰, 1987).

Nas glândulas salivares normais a proteína S-100 foi descrita em células ductais (Azumi & Battifora⁴, 1987; Chen et al.¹⁷, 1988; Kahn et al.⁵⁷, 1983; Okura et al.⁷⁵, 1996), além das células mioepiteliais (Azumi & Battifora⁴, 1987; Chen et al.¹⁷, 1988; Crocker et al.²¹, 1985; Kahn et al.⁵⁷, 1983; Nakajima et al.⁶⁸, 1982). Sua fração beta (S-100beta) se localizaria preferencialmente em células mioepiteliais e ductais, enquanto S-100alfa se localizaria nas células glandulares secretoras e, raramente, em células ductais ou mioepiteliais (Haimoto et al.⁵⁰, 1987). Por outro lado, vários autores não detectaram a presença de proteína S-100 em glândulas salivares normais (Dardick et al.³¹, 1991; Huang et al.⁵⁴, 1996; Mori et al.⁶⁵, 1987).

Dardick et al.³¹ (1991) pesquisaram a presença de proteína S-100 em glândula parótida humana normal, utilizando técnica de imunoperoxidase e os seguintes anticorpos: S-100, anti-enolase neurônio específica e anti-neurofilamentos, comparados com anticorpos anti-actina músculo específica e anti-citoqueratina 14. Os autores realizaram também a técnica de dupla marcação por imunofluorescência, empregando anticorpos tanto para proteína S-100, como para enolase neurônio específica, combinada com actina músculo específica. Observaram marcação da célula mioepitelial apenas com os anticorpos anti-actina e anti-citoqueratina 14, e a presença da proteína S-100 na rede de nervos não mielinizados do interstício, evidenciada também pela microscopia eletrônica de transmissão. Segundo os autores, tal marcação da proteína S-100 estaria sendo interpretada erroneamente por outros pesquisadores como sendo marcação de células mioepiteliais. Entretanto, a presença da proteína S-100 em células mioepiteliais neoplásicas, como no adenoma pleomórfico e no mioepitelioma, realmente ocorreria, indicando a expressão de proteínas ectópicas pela célula tumoral (Dardick et al.³¹, 1991).

Diversos autores relataram a presença da proteína S-100 em tumores originados de glândulas salivares, como adenoma pleomórfico (Crocker et al.²¹, 1985; Dardick & Van Nostrand²⁴, 1987; Günhan et al.⁴⁵, 1992; Hara et al.⁵¹, 1983; Kahn et al.⁵⁷, 1983; Nakajima et al.⁶⁸, 1982; Nakazato et al.⁶⁹, 1982), adenoma de células claras (Hara et al.⁵¹, 1983), carcinoma adenóide cístico (Azumi & Battifora⁴, 1987; Bergman et al.⁷, 1991; Chen et al.¹⁷, 1988; Günhan et al.⁴⁵, 1992; Kahn et al.⁵⁸, 1985), adenoma monomórfico (Crocker et al.²¹, 1985; Kahn et al.⁵⁸, 1985), adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (Dardick & Van Nostrand²⁵, 1988; Norberg et al.⁷¹, 1991; Regezi et al.⁸², 1991), adenoma de células basais (Günhan et al.⁴⁵, 1992; Williams et al.⁹⁷, 1993) e adenocarcinoma de células basais (Williams et al.⁹⁷, 1993).

Recentemente, mais de dez proteínas diferentes foram identificadas na família da proteína S-100 e foram produzidos anticorpos específicos contra cada uma delas (Huang et al.⁵⁴, 1996).

Utilizando anticorpos contra proteínas S-100 diferentes (S-100 A1; S-100 A2; S-100 A4; S-100 A6 e S-100B), Huang et al.⁵⁴ (1996) estudaram, por meio de técnica imuno-histoquímica, glândulas salivares normais e os seguintes tumores glandulares: adenoma pleomórfico, adenoma de células basais, adenoma canalicular, mioepitelioma, carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma NOS. Os autores verificaram que nenhum dos anticorpos utilizados reagiu com a célula mioepitelial normal, e que as fibras nervosas periféricas reagiram com o anticorpo anti-S-100B, confirmando os achados de Dardick et al.³¹ (1991). As proteínas S-100 A1; S-100 A2; S-100 A4 e S-100 A6 foram evidenciadas em células ductais normais e células lumbais neoplásicas. Células mioepiteliais neoplásicas expressaram os diversos tipos de proteína S-100 utilizados, o que parece estar relacionado com a produção de substâncias da matriz extracelular. Os autores concluíram que as proteínas S-100 poderiam dessa forma modular o micro-ambiente extracelular (Huang et al.⁵⁴, 1996).

2.4.2. Filamentos intermediários

Os filamentos intermediários são proteínas que, juntamente com os polímeros de tubulina (22-25 nm de diâmetro) e microfilamentos de actina (5-7 nm de diâmetro) formam o cito-esqueleto presente em praticamente todas as células de vertebrados (Erlandson³⁵, 1984; Osborn & Weber⁷⁶, 1983). Esses filamentos são chamados intermediários devido a seu diâmetro (7-11 nm), intermediário entre a actina e a tubulina ou, se presentes, os filamentos espessos de miosina (Caselitz et al.¹⁴, 1981;

Caseltz et al.¹⁵, 1982; Erlandson³⁵, 1984; Moll et al.⁶⁴, 1982; Osborn & Weber⁷⁶, 1983).

Evidências bioquímicas, imunológicas e químicas sugeriram a existência de cinco subgrupos distintos de filamentos intermediários: 1) citoqueratinas (40-68 Kd), encontradas em epitélios queratinizados ou não; 2) vimentina (57Kd), restrita principalmente a células mesenquimais; 3) desmina (53Kd), característica da maioria dos miócitos; 4) proteína glial fibrilar ácida (55Kd);, localizada primariamente em células gliais; e 5) neurofilamentos (68-, 160-, 200 Kd), encontrados na maioria dos neurônios (Erlandson³⁵, 1984; Osborn & Weber⁷⁶, 1983).

Mais recentemente, os filamentos intermediários foram classificados em seis subtipos. As citoqueratinas (Cks) ácidas (CK 9-CK20) constituem o tipo I e as citoqueratinas básicas (CK1-CK8) formam o tipo II, dos filamentos intermediários. O tipo III compreende a vimentina, encontrada geralmente em células mesenquimais; desmina, presente no músculo; proteína glial fibrilar ácida, identificada em células gliais e astrócitos; e periferina, encontrada em células neuronais. O tipo IV consiste de neurofilamentos L, M & H e alfa internexina, identificados em neurônios. Os filamentos intermediários do tipo V compreendem lâminas nucleares; e nestina, específica para células precursoras do sistema nervoso central, é classificada como filamento intermediário do tipo VI (Heatley⁵², 1996).

Quanto à função, os filamentos intermediários seriam fundamentais para a citoarquitetura e integridade estrutural do citoplasma, conferindo resistência aos impactos mecânicos (Fuchs & Cleveland⁴¹, 1998).

Algumas células exibem "in situ" duas proteínas de filamentos intermediários simultaneamente, como algumas células musculares lisas da parede vascular, que apresentam desmina e vimentina e algumas células da glândula parótida humana, que

apresentam citoqueratina e vimentina. Em cultura de células pode-se observar também a co-expressão de filamentos intermediários. Tanto "in vivo" como "in vitro", quando dois filamentos intermediários coexistem, um dos membros é sempre a vimentina (Osborn & Weber⁷⁶, 1983).

No desenvolvimento de tumores, o tipo de filamento intermediário característico da célula de origem parece ser mantido, com poucas exceções, não apenas no tumor primário, como também nas metástases sólidas. Assim, seria possível classificar os tumores por sua expressão específica de filamentos intermediários (Moll et al.⁶⁴, 1982; Osborn & Weber⁷⁶, 1983; Upton et al.⁹⁴, 1986).

Existe, no entanto, uma variação embriológica e taxonômica na expressão de filamentos intermediários, o que poderia explicar sua presença por vezes variada nos tumores, possivelmente indicando a elaboração de uma proteína expressa normalmente durante o desenvolvimento embrionário (Gustafsson et al.⁴⁸, 1988; Heatley⁵², 1996).

Procedimentos imuno-histoquímicos para a identificação de proteínas de filamentos intermediários como a queratina, vimentina, desmina, proteína de neurofilamento e proteína glial fibrilar ácida, foram estabelecidos na década de 1980 (Erlandson³⁵, 1984; Osborn & Weber⁷⁶, 1983; Van Muijen et al.⁹⁵, 1984). Esses procedimentos contribuíram muito para o diagnóstico diferencial dos tumores e para o estudo da diferenciação celular (Morinaga et al.⁶⁷, 1987).

Glândulas salivares e seus tumores têm sido estudados por meio de técnicas imuno-histoquímicas, utilizando anticorpos contra proteínas de filamentos intermediários (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo & Sousa², 1996; Araújo et al.³, 1994; Caselitz & Loning¹², 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982; Caselitz et al.¹⁶, 1984; Erlandson et al.³⁶, 1984; Gustafsson et al.⁴⁷, 1989; Morinaga et al.⁶⁷, 1987).

x/3/6

2.4.2.1. Citoqueratinas

As citoqueratinas formam uma família multigênica de polipeptídeos diferentes, cujos valores de pH isoelétrico variam de 5 a 8, e cujo peso molecular varia de 40.000 a 68.000 (Moll et al.⁶⁴, 1982). Constituem a família mais diversificada de filamentos intermediários, sendo que as células epiteliais podem conter proporções variáveis de diversas citoqueratinas (Geiger et al.⁴³, 1987; Van Muijen et al.⁹⁵, 1984). Moll et al.⁶⁴ (1982) distinguiram pelo menos dezenove polipeptídeos diferentes de citoqueratina humana, numerados sequencialmente de 1 a 19.

Os polipeptídeos de citoqueratina ligeiramente básicos e relativamente grandes são típicos de muitos epitélios estratificados e compreendem os componentes 1 a 6. Peptídeos de citoqueratina de tamanho e carga elétrica intermediários, os componentes 7 e 8, são encontrados em diversos epitélios simples, traquéia, epitélio transicional de bexiga, várias glândulas complexas e células HeLa. A citoqueratina 8 é detectada também em epitélio embrionário precoce. Os componentes 9 a 11 são polipeptídeos ácidos relativamente grandes ou de tamanho intermediário, encontrados apenas na epiderme. O polipeptídeo 9 é proeminente na epiderme da sola dos pés, enquanto o 10 e 11 parecem ser expressos na epiderme da maior parte do corpo. O polipeptídeo ácido 12 foi observado apenas na córnea humana. O polipeptídeo 13 é o componente principal característico de vários epitélios escamosos estratificados não queratinizados, como mucosa lingual e epitélio do canal anal, e epitélio traqueal. Os componentes 14 a 17 são queratinas pequenas e ácidas que ocorrem em diferentes combinações na epiderme e queratinócitos em cultura, folículos pilosos e muitos epitélios escamosos não queratinizados, bem como na traquéia e algumas glândulas. A citoqueratina 18 mostra uma distribuição tecidual similar à

do polipeptídeo 8. A citoqueratina 19 é encontrada em uma ampla gama de tecidos epiteliais, como componente predominante em muitos epitélios simples e usualmente como componente menor em diversos epitélios estratificados, bem como em certos queratinócitos em cultura e células do carcinoma de células escamosas (Moll et al.⁶⁴, 1982).

Os padrões de expressão de citoqueratina podem variar nos diversos estágios da "ontogenia" e diferenciação de um determinado tipo celular, e podem inclusive não ser estáveis durante a transformação neoplásica (Erlandson³⁵, 1984). Além disso, podem ocorrer em neoplasias de origem diversa, como leiomiossarcomas, melanomas, fibrohistiocitomas malignos e fibrossarcomas (Heatley⁵², 1996).

Apesar dessas observações, os filamentos intermediários de citoqueratina têm uma aplicação prática na patologia diagnóstica de rotina. As diferenças na expressão de citoqueratinas em diferentes células de uma mesma neoplasia podem ser úteis no diagnóstico diferencial e até mesmo na avaliação prognóstica (Heatley⁵², 1996).

Os primeiros estudos visando caracterizar a expressão de filamentos intermediários em glândulas salivares normais e em tumores de origem glandular, empregavam anticorpos policlonais contra citoqueratinas que reconheciam vários polipeptídeos (Caselitz & Loning¹², 1981; Caselitz et al.¹⁴, 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982) ou anticorpos monoclonais que também reconheciam grupos de citoqueratinas (Gustafsson et al.⁴⁶, 1988; Gustafsson et al.⁴⁶, 1988).

Utilizando técnica de imunofluorescência, Caselitz et al.¹⁴ (1981); Caselitz et al.¹⁵, (1982) usaram anticorpo contra prequeratina bovina, para identificar células de origem epitelial, e anticorpos anti-vimentina e anti-desmina, em glândulas salivares normais e em diversos tumores glandulares. Na glândula parótida humana normal os filamentos de prequeratina foram observados em células ductais e mioepiteliais. O anticorpo anti-vimentina marcou células mesenquimais no tecido, assim

como células endoteliais e células musculares lisas em vasos sangüíneos. Além disso, uma camada de células menos intensamente positivas para vimentina foi observada por vezes na periferia dos ductos e, em alguns casos, células triangulares positivas foram observadas entre as células ductais de ductos estriados. A desmina foi detectada em algumas células da parede vascular sangüínea. No adenoma pleomórfico, tanto os grupos celulares sólidos, como as células fusiformes mais dispersas, foram positivos para a prequeratina (Caselitz et al.¹⁴, 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982). Ambos os tipos celulares do adenoma pleomórfico foram positivos para vimentina (Caselitz et al.¹⁴, 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982), sendo que a reação de imuno-fluorescência dupla de vimentina e queratina, no mesmo espécime, sugere a co-expressão de ambos filamentos em algumas células (Caselitz et al.¹⁵, 1982). Não houve positividade das células tumorais com o uso de anticorpo anti-desmina. A observação da presença simultânea de prequeratina e vimentina em algumas células, levou à conclusão de que os adenomas pleomórficos não seriam tumores mistos, compostos de elementos epiteliais e mesenquimais distintos, mas, provavelmente teriam origem a partir de células caracterizadas "in vitro" por filamentos de prequeratina e vimentina, possivelmente as células triangulares observadas próximo aos ductos no tecido normal (Caselitz et al.¹⁵, 1982).

Erlandson et al.³⁶ (1984) analisaram a expressão de filamentos intermediários de citoqueratina e vimentina, além do microfilamento de actina e da proteína S-100, em adenomas pleomórficos e glândula parótida humana normal, através de reação imuno-histoquímica. Observaram positividade para os anticorpos monoclonais AE1 e AE3, que reconhecem polipeptídeos de 40, 48, 50 e 56,5 Kd e de 46, 52, 56, 58, 65 e 67 Kd, respectivamente, nas células epiteliais dos ductos intercalares, estriados e excretorios, em intensidade crescente, enquanto as células mioepiteliais não marcaram. Nos tumores houve forte

marcação de AE1 nas células epiteliais ductais neoplásicas e em raras células no estroma em torno dos ductos. A reação imuno-histoquímica aos anticorpos anti-vimentina foi negativa em glândulas salivares normais, embora à imunofluorescência um pequeno número de células mioepiteliais mostrasse fraca fluorescência. Em dois tumores, raras células mioepiteliais adjacentes aos ductos reagiram com anticorpos anti-vimentina, enquanto as células das áreas mixóides e condróides foram fortemente positivas. A proteína S-100 foi detectada em células epiteliais acinares esparsas, células mioepiteliais, células adiposas e nervos (intensamente), nas glândulas parótidas normais. Nos tumores, as células condróides, estrelárias e fusiformes das áreas mixóides, e as células mioepiteliais periductais foram fortemente positivas para a proteína S-100.

Utilizando o anticorpo monoclonal 16a, anti-citoqueratinas de 45K/46K, Palmer & Lucas⁷⁸ (1985) observaram marcação de células basais situadas em ductos estriados e excretores de glândulas salivares normais. Não houve marcação das células mioepiteliais acinares ou ductais, as quais foram positivas ao anticorpo policlonal anti-miosina empregado. No adenoma pleomórfico, a maioria das células consideradas mioepiteliais foi negativa para miosina, enquanto muitas células da camada externa dos ductos de duas camadas foram positivas para o anticorpo anti-citoqueratina, assim como algumas células das áreas sólidas. Os autores sugeriram que a célula positiva para o anticorpo 16a, anti-citoqueratina, poderia ser uma célula de reserva, e que a positividade das células ductais externas nos tumores ao anticorpo 16a, seria indicativa de diferenciação mais compatível com um fenótipo de célula ductal de reserva do que um fenótipo mioepitelial. Afirmaram que células com fenótipo mioepitelial foram raras nos tumores, com base na reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-miosina.

Técnica imuno-histoquímica de avidina-biotina e anticorpo monoclonal anti-queratina que reage com citoqueratinas de 55 a 57Kd, foram utilizados no estudo de Morinaga et al.⁶⁷ (1987), além de anticorpos anti-vimentina, anti-actina e anti-miosina. Os autores analisaram os seguintes tumores: adenoma pleomórfico, adenoma de células basais, carcinoma adenóide cístico e carcinoma epitelial-mioepitelial, além de glândulas salivares normais. Identificaram quatro tipos celulares: tipo 1- positivas para actina e miosina, negativas para vimentina e queratina, correspondem às células mioepiteliais de glândulas salivares normais e do carcinoma epitelial-mioepitelial; tipo 2- positivas para actina, miosina e vimentina, negativas ou fracamente positivas para queratina, encontradas na camada externa de estruturas tubulares organóides de duas camadas, no adenoma pleomórfico, adenoma tubular e carcinoma adenóide cístico, e nas células externas e do revestimento de "cistos" no padrão cribriforme do carcinoma adenóide cístico. Essas células foram consideradas células mioepiteliais neoplásicas. O tipo 3 - compreende células negativas para actina e miosina, positivas para vimentina e ocasionalmente queratina, correspondem às células "mesenquimais" do adenoma pleomórfico, consideradas células mioepiteliais modificadas. Também pertencem ao tipo 3, células indiferenciadas do carcinoma adenóide cístico, consideradas células precursoras, e células da camada basal do adenoma de células basais, que seriam capazes de diferenciar-se tanto em células mioepiteliais, como em células epiteliais ductais. O tipo 4 é constituído por células negativas para actina, miosina e vimentina e positivas para citoqueratina, correspondem às células tubulares internas e células escamosas. São idênticas às células ductais epiteliais das glândulas salivares normais (Morinaga et al.⁶⁷, 1987).

Em um estudo imuno-histoquímico envolvendo glândulas salivares humanas normais e oito casos de carcinoma adenóide cístico, provenientes de glândulas salivares maiores e menores, brônquios, pele,

mama e metástase em linfonodo, Azumi & Battifora⁴ (1987) utilizaram oito anticorpos monoclonais contra grupos de citoqueratinas, e anticorpos anti-proteína S-100, vimentina e actina músculo específica. Observaram forte positividade das células basais de ductos intercalares e células mioepiteliais para o anticorpo KA1, que reconhece a citoqueratina 5 do catálogo de Moll et al.⁶⁴ (1982). As demais citoqueratinas marcaram as células ductais luminais, acinares, e apenas fracamente as células mioepiteliais. As células mioepiteliais também foram positivas para a proteína S-100, actina músculo específica e eventualmente vimentina. Nos carcinomas adenóide císticos, as células luminais foram positivas para citoqueratinas, inclusive as detectadas pelo anticorpo KA1. As células nas camadas em torno dos pseudo-cistos expressaram combinações variadas de actina, vimentina, proteína S-100 e queratina detectada pelo anticorpo KA1.

Gustafsson et al.⁴⁸ (1988), em um estudo envolvendo glândulas salivares humanas adultas e em desenvolvimento, utilizaram os seguintes anticorpos: PKK1, que reage com as citoqueratinas 8, 18 e 19; PKK2, que reage com as citoqueratinas 7, 17 e 19; anticorpo PKK3, que reage com a citoqueratina 18; e dois anticorpos monoclonais anti-vimentina: Vim 9, contra vimentina bovina e Vim 24, contra vimentina de fibroblastos humanos. Observaram que as citoqueratinas 7, 17 e 19 (PKK2) estavam presentes em células ductais e mioepiteliais, e ausentes nas acinares. A presença de vimentina foi detectada em células mioepiteliais e células triangulares basais de ductos estriados e excretores de glândulas salivares adultas, por meio do anticorpo Vim 24, porém, não pelo anticorpo Vim 9. O anticorpo Vim 9 mostrou, no entanto, reação positiva em células triangulares basais dos ductos periféricos de glândulas de fetos de 22 semanas. Por outro lado, em trabalho anterior, os autores observaram células positivas para o anticorpo Vim 9 em carcinoma adenóide cístico, na periferia dos cordões tumorais, junto à

membrana basal e no revestimento de pseudo-cistos. A marcação com o anticorpo Vim 24 nos tumores foi menos evidente (Gustafsson et al.⁴⁶, 1988). Os autores sugeriram que a presença de reatividade ao anticorpo Vim 9 corresponderia a uma desdiferenciação das células neoplásicas, levando à expressão de filamentos intermediários típica de um período precoce do desenvolvimento glandular. Concluíram que a expressão de filamentos intermediários seria um marcador de diferenciação, e não de linhagem celular (Gustafsson et al.⁴⁸, 1988).

Posteriormente, os autores acima fizeram um estudo em que utilizaram, além de anticorpos anti-citoqueratinas PKK1, PKK2, PKK3 e RPN 1162, e anti-vimentina Vim 9, também anticorpos anti-proteína glial fibrilar ácida e anti-desmina, para o estudo de glândulas salivares normais e diversas neoplasias glandulares. Citoqueratinas foram observadas em quase todas as células mioepiteliais normais. Co-expressão de citoqueratina e GFAP foi verificada em algumas células mioepiteliais, nas glândulas parótida e menores do palato, mas não na glândula submandibular. Não houve marcação para o anticorpo anti-vimentina nas células mioepiteliais normais. Verificaram expressão de três classes diferentes de filamentos intermediários (citoqueratinas, vimentina, GFAP) em determinadas células de alguns tumores que apresentavam células mioepiteliais (adenoma pleomórfico, carcinoma em adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico). Tais células estavam frequentemente situadas perifericamente nos cordões tumorais ou ductos e apresentavam um perfil de citoqueratinas semelhante ao da célula mioepitelial normal. Em alguns desses tumores foi demonstrada também imuno-reatividade para desmina. Em vista da variada expressão de GFAP, tanto em células mioepiteliais normais como neoplásicas, os autores concluíram que esta não constitui um marcador aceitável para identificar células mioepiteliais tumorais (Gustafsson et al.⁴⁷, 1989). Em estudo anterior, Nakazato et al.⁶⁹ (1982) haviam observado também a

positividade de um pequeno grupo de células em áreas mixomatosas, condróides e epiteliais sólidas do adenoma pleomórfico à reação imuno-histoquímica para detecção da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Diferentemente de Gustafsson et al.⁴⁷ (1989), no entanto, Nakazato et al.⁶⁹ (1982) não observaram a presença de GFAP em glândulas salivares submandibulares e parótidas normais, concluindo que o antígeno relacionado à GFAP seria sintetizado pelas células neoplásicas.

Takai et al.⁹⁰ (1995) também não detectaram GFAP em células mioepiteliais na maioria das glândulas normais analisadas por meio de reação imuno-histoquímica, porém, esta proteína estava presente em 21% dos espécimes, em lóbulos atróficos da glândula parótida, marcando células mioepiteliais e células basais associadas com ductos interlobulares. Em 14 adenomas pleomórficos e 5 mioepiteliomas observaram positividade para a GFAP em todos os casos, embora com intensidade variada.

Leoncini et al.⁶¹ (1988) utilizaram técnica imuno-histoquímica de avidina-biotina e os seguintes anticorpos monoclonais contra grupos de citoqueratinas: PKK1, que reage com as citoqueratinas 8, 18 e 19; SK56-23, de amplo espectro; SK2-27, que reage com as citoqueratinas 14, 16 e 17; e SK60-61, que reage com as citoqueratinas 8 e 18; para estudar casos de adenoma pleomórfico, carcinoma em adenoma pleomórfico e espécimes de glândulas salivares normais. Empregaram ainda anticorpos anti-actina de músculo liso, anti-proteína S-100 e anti-vimentina. Observaram que na glândula salivar normal, células acinares, células ductais luminais e células mioepiteliais foram positivas para o anticorpo SK56-23 (amplo espectro). As células ductais luminais mostraram reação intensa com os anticorpos SK60-61 (citoqueratinas 8 e 18) e PKK1 (citoqueratinas 8, 18 e 19). As células da camada externa dos ductos mostraram uma forte positividade ao anticorpo SK2-27 (citoqueratinas 14, 16 e 17), com intensidade crescente

dos ductos maiores para os menores. Muitas células mioepiteliais em torno dos ácinos também foram positivas para o anticorpo SK2-27. Algumas células ductais externas foram fracamente marcadas para a proteína S-100 e vimentina, mas, totalmente negativas para SK60-61 (citoqueratinas 8 e 18) e PKK1 (citoqueratinas 8, 18 e 19). As células mioepiteliais dos ácinos foram fortemente positivas para o anticorpo anti-actina de músculo liso. Nos adenomas pleomórficos observaram marcação para o anticorpo SK2-27 principalmente nas áreas sólidas e trabeculares, nas quais havia poucas células positivas para o anticorpo SK60-61, mas várias células positivas para vimentina e proteína S-100. Nestas áreas observaram co-localização de marcação para SK2-27 e vimentina. Os anticorpos SK60-61 e PKK1 tiveram reação positiva principalmente em tumores com áreas ductais e pseudo-ductais. O anticorpo anti-actina de músculo liso foi evidenciado nas células neoplásicas próximas às áreas mixóides dos adenomas. Estas células foram positivas também para as citoqueratinas reconhecidas pelo anticorpo SK2-27. Os autores concluíram que há pelo menos dois tipos de células mioepiteliais tumorais: um contendo actina de músculo liso e citoqueratina (células mioepiteliais típicas) e o outro contendo vimentina e citoqueratina (células mioepiteliais modificadas). A proporção relativa desses tipos celulares mais células epiteliais seria responsável pela variação morfológica dos tumores (Leoncini et al.⁶¹, 1988).

Em um estudo de oito casos de adenoma de células basais de glândulas salivares maiores (2 membranosos, 3 trabeculares-tubulares e 3 sólidos), Ferreira³⁸ (1994) observou positividade das células luminais e não luminais para as citoqueratinas detectadas pelos anticorpos AE1/AE3. A marcação observada foi intensa nas células luminais e nas células centrais das trabéculas e blocos neoplásicos, e fraca nas células externas.

Resultados semelhantes aos citados acima foram obtidos por Williams et al.⁹⁷ (1993), tanto em adenomas de células basais (11 casos) como em adenocarcinomas de células basais (23 casos).

Mais recentemente, uma série de anticorpos monoclonais que reagem com subclasses de citoqueratinas tem sido utilizada no estudo desses filamentos intermediários em glândulas salivares e neoplasias glandulares. Em glândulas salivares normais, a presença de citoqueratina 14 foi observada em células mioepiteliais e nas células basais de ductos excretores (Araújo & Sousa², 1996; Burns et al.¹⁰, 1988; Dardick et al.²⁹, 1987; Dardick et al.³¹, 1991; Draeger et al.³⁴, 1991; Sousa⁸⁹, 1994; Takai et al.⁹⁰, 1995); citoqueratinas 13 e 16 em células basais de ductos excretores (Born et al.⁸, 1987; Burns et al.¹⁰, 1988; Draeger et al.³⁴, 1991; Geiger et al.⁴³, 1987; Mori et al.⁶⁶, 1990); citoqueratina 13 isolada, no ducto excretor (Araújo & Sousa², 1996; Draeger et al.³⁴, 1991); citoqueratina 19 em células ductais luminais e mioepiteliais (Born et al.⁸, 1987; Burns et al.¹⁰, 1988); citoqueratina 19 em células ductais luminais e basais (Geiger et al.⁴³, 1987); citoqueratinas 7 e 19 em células ductais luminais (Draeger et al.³⁴, 1991); citoqueratina 18 em células acinares e ductais luminais (Born et al.⁸, 1987; Draeger et al.³⁴, 1991; Gustafsson et al.⁴⁸, 1988); citoqueratina 8 em células acinares e ductais luminais (Draeger et al.³⁴, 1991).

A presença de diversos tipos individuais de citoqueratinas foi observada também em tumores de glândulas salivares. No grupo de tumores em que se acredita não haver participação ativa da célula mioepitelial, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 foram evidenciadas no componente epitelial de cistadenolinfomas (Born et al.⁸, 1987) e a citoqueratina 18 em carcinoma de células acinares (Gustafsson et al.⁴⁶, 1988).

Loyola et al.⁶² (1998) observaram a presença das citoqueratinas 7, 8, 13, 14, 18, 19, no carcinoma mucoepidermóide, na

seguinte distribuição: citoqueratinas 7, 8 e 18 nas células intermediárias, luminais colunares e mucosas, sendo mais fracas e heterogeneamente expressas nas células epidermóides. A citoqueratina 19 apresentou distribuição semelhante, porém, foi negativa nas células mucosas. A citoqueratina 14 mostrou marcação associada predominantemente às células intermediárias basais e parabasais, próximas ao estroma neoplásico, e às epidermóides. A citoqueratina 13 marcou células intermediárias, epidermóides e células colunares luminais. No epitélio estratificado, a citoqueratina 13 foi expressa nas células intermediárias e negativa nas basais. Os autores pesquisaram também a presença de actina músculo específica e vimentina. A primeira foi observada apenas no estroma e somente dois casos de carcinoma mucoepidermóide foram heterogeneamente positivos para vimentina. Segundo os autores, o perfil imunohistoquímico do carcinoma mucoepidermóide, para os antígenos estudados, é semelhante àquele do ducto excretor da glândula salivar normal.

Crivelini et al.²⁰ (1997) estudaram oito casos de carcinoma de células acinares de glândulas salivares menores, nos quais realizaram reações imuno-histoquímicas empregando anticorpos anti-citoqueratinas 7, 8, 13, 14, 18 e 19, anti-vimentina e anti-actina. Observaram que o anticorpo anti-citoqueratina 8 foi o mais específico para as células neoplásicas, enquanto a citoqueratina 14 estava presente apenas em algumas células dispersas, na periferia dos lóbulos tumorais. Segundo os autores, estas não pareceram ser de origem mioepitelial, pois, foram negativas tanto para actina como para vimentina. Por outro lado, a ausência de citoqueratina 14 nas células ductais presentes nos tumores indicaria que as células de aspecto ductal, vistas no carcinoma de células acinares, teriam recebido um estímulo prévio para a diferenciação acinar, ou seriam resultado de um processo de desdiferenciação das células acinares.

Entre os tumores com presença de células mioepiteliais, uma expressão variada de polipeptídeos de citoqueratina foi observada na célula mioepitelial modificada do adenoma pleomórfico por Burns et al.¹⁰ (1988). Neste tumor, as células localizadas na periferia dos ductos, em áreas sólidas e na periferia das regiões mixóides, apresentaram perfil de citoqueratina similar à célula mioepitelial/basal da glândula normal, apresentando reação imuno-histoquímica positiva para as citoqueratinas 13 e 16 (anticorpo 8.12); 14 (anticorpo 312C8-1); 3 e 6 (anticorpo ECK); e 7, 8, 17 e 18 (anticorpo PKK1), em diferentes intensidades. A exceção é a citoqueratina 19 (anticorpo 4.62), que foi negativa no tumor e positiva nas células mioepiteliais normais. A vimentina e a proteína glial fibrilar ácida foram negativas nas glândulas parótidas normais e positivas, de maneira não uniforme, em células condróides, mixóides e áreas sólidas do adenoma pleomórfico. Os autores sugeriram que a diversidade de diferenciação evidenciada nas células tumorais, seria responsável pela morfologia do adenoma pleomórfico.

Dardick et al.³⁰ (1989) observaram reação imuno-histoquímica positiva em mioepiteliomas a anticorpos monoclonais que reagem com as citoqueratinas 13 e 16 (anticorpo 8.12); 7, 8, 17 e 18 (anticorpo PKK1); 14 (anticorpo 312C8-1); e 7 (anticorpo RPN.1162) e reação negativa ao anticorpo anti-citoqueratina 19 (4.62). Reação positiva ao anticorpo anti-actina (HHF35) foi observada em apenas um caso.

Draeger et al.³⁴ (1991) analisaram a expressão de diversos peptídeos de citoqueratina, actina e vimentina em cortes por congelamento de adenoma pleomórfico. Nas estruturas tubulares com duas camadas celulares, verificaram positividade das células lumbais para as citoqueratinas 7, 8, 18, 19 e, ocasionalmente, para citoqueratina 14, enquanto as células externas expressaram intensamente a citoqueratina 14. O anticorpo 8.12 (anti-citoqueratinas 13,16) marcou irregularmente as

células tubulares luminais e, de maneira mais consistente, as células periféricas. Ocasionalmente as células periféricas foram positivas para vimentina. As áreas trabeculares e sólidas mostraram marcação para a citoqueratina 14 e marcação irregular para as citoqueratinas 13 e 16, 7, 8, 18 e 19. Nas áreas de metaplasia escamosa e queratinização parcial houve positividade para as citoqueratinas 13 e 16, 14, 13, e, em áreas tubulares com transformação epidermóide, para a citoqueratina 19. As células das áreas mixóides expressaram de maneira mais consistente vimentina, citoqueratinas 13 e 16 e citoqueratina 14, além de apresentarem reatividade fraca e irregular com as outras citoqueratinas estudadas. Os autores interpretaram o padrão de marcação observado no adenoma pleomórfico como sendo mais compatível com o segmento de ducto excretor, do que com o segmento ductal intercalar da glândula normal, principalmente devido à ampla distribuição das citoqueratinas 13 e 16 e da citoqueratina 14 no tumor.

Regezi et al.⁸² (1991) observaram positividade imuno-histoquímica em quinze adenocarcinomas polimorfos de baixo grau para anticorpo anti-citoqueratina de baixo peso molecular (reage com a citoqueratina 8 do catálogo de Moll et al.⁶⁴ (1982) e anticorpo anti-citoqueratina de alto peso molecular (reage com as citoqueratinas 1, 5, 10 e 14). Quinze casos de carcinoma adenóide cístico e sete casos de adenoma monomórfico (4 canaliculares, 2 tubulares-trabeculares e 1 membranoso) examinados, também apresentaram reação positiva aos anticorpos anti-citoqueratinas de baixo e alto peso molecular.

Takai et al.⁹⁰ (1995) verificaram marcação variada para a citoqueratina 14 em adenomas pleomórficos e mioepiteliomas. Em alguns casos a marcação era observada nas células não luminais do adenoma pleomórfico, imediatamente vizinhas das células luminais. Em outros, ambas células, luminais e não luminais eram positivas.

No carcinoma adenóide cístico, Figueiredo³⁹ (1995) , estudando a expressão de citoqueratinas, actina e vimentina , observou positividade das células lumbais das estruturas ductais, tanto no subtipo cribriforme como no tubular, para as citoqueratinas 7, 8, 14, 18 e 19. Células externas das estruturas ductais foram ocasionalmente positivas para a citoqueratina 14, apenas no subtipo tubular. No subtipo sólido, as células mostraram-se ocasionalmente positivas para as citoqueratinas 7, 8, 14, 18 e 19, com padrão não uniforme de marcação.

A expressão das citoqueratinas 7, 8, 10, 13, 14, 18 e 19 foi estudada em um grupo de tumores de glândulas salivares, incluindo: adenomas pleomórficos, mioepiteliomas, adenomas de células basais, carcinomas adenóide císticos e adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade (Araújo & Sousa², 1996; Sousa⁸⁹, 1994). As autoras fizeram observações importantes quanto à diferenciação celular e histogênese dessas neoplasias. Verificaram que células lumbais de estruturas ductais foram positivas para as citoqueratinas 7, 8, 14, 18 e 19, um padrão semelhante ao do segmento intercalar de glândulas salivares normais. As células externas não se coraram pelas citoqueratinas, exceto a célula externa de ductos bem formados, no adenoma pleomórfico e adenoma de células basais do tipo tubular, a qual foi positiva apenas para a citoqueratina 14. As células mioepiteliais modificadas (plasmocitóides ou hialinas), observadas no adenoma pleomórfico e mioepitelioma, foram positivas, embora não uniformemente, para as citoqueratinas 7, 8, 13, 14, 18 e 19, evidenciando a variedade de diferenciação celular das mesmas. As células dos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade e dos adenomas de células basais foram positivas para as citoqueratinas 8 e 18, nas áreas em que não havia formação de ductos de duas camadas celulares. Tais células, positivas para as citoqueratinas 8 e 18, corresponderiam às células transicionais, capazes de diferenciar-se em células mioepiteliais e

epiteliais. A diferenciação para células luminais seria atingida apenas quando houvesse formação de estruturas ductais de duas camadas, sugerindo que esses tumores não seriam compostos exclusivamente de células luminais ou epiteliais (Araújo & Souza², 1996; Souza⁸⁹, 1994).

Recentemente foram elucidados os mecanismos envolvidos em diversas doenças humanas, cuja alteração fundamental reside em alterações genéticas de filamentos intermediários e das proteínas que fazem a ligação entre os filamentos intermediários e outros componentes do citoesqueleto. Dessa forma pôde-se compreender melhor o papel funcional dos filamentos intermediários. Verificou-se, por exemplo, que a ausência da citoqueratina 14, por uma mutação genética, leva a alterações das células epidérmicas basais, tornando-as frágeis e susceptíveis a rupturas quando submetidas a forças mecânicas, culminando na formação de bolhas. Este parece ser um dos principais mecanismos envolvidos na epidermólise bolhosa simples, que pode estar relacionada também a alterações genéticas da citoqueratina 5 ou das proteínas associadas que interagem com a rede basal de queratina (Fuchs & Cleveland⁴¹, 1998).

2.4.2.2. Vimentina

A vimentina, um filamento intermediário constituído por polipeptídeo com peso molecular de 57.000 daltons, é caracteristicamente encontrada em células de origem mesenquimal, como fibroblastos, macrófagos e condrócitos (Caselitz et al.¹⁵, 1982). Além disso, muitas células de origem não mesenquimal, malignas ou não, adquirem a expressão de vimentina, quando perdem sua orientação tridimensional normal, incluindo células em cultura e em efusões malignas (Upton et al.⁹⁴, 1986). A presença de vimentina tem sido

descrita, também, em alguns tipos de carcinoma (Miettinen et al.⁶³, 1984; Upton et al.⁹⁴, 1986).

Além disso, Ward et al.⁹⁶ (1992) demonstraram a expressão de vimentina em células corticais renais hiperplásicas e neoplásicas, embora estas células não apresentem normalmente tal filamento. Segundo os autores, a expressão de vimentina nesses casos estaria associada à perda de diferenciação das células. Presumivelmente, células adjacentes a uma lesão necrótica focal devem mover-se para o local lesado, e esse fenômeno de remodelação local tornaria necessária a reversão das células a um fenótipo mais embrionário.

Para Morinaga et al.⁶⁷ (1987), as células epiteliais contendo vimentina seriam menos diferenciadas ou mostrariam perda ou redução da coesividade.

No parênquima de glândulas salivares normais, existe controvérsia quanto à presença da vimentina. Enquanto diversos autores não detectaram este filamento (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Burns et al.¹⁰, 1988; Geiger et al.⁴³, 1987; Gustafsson et al.⁴⁶, 1988; Gustafsson et al.⁴⁸, 1988; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Takai et al.⁹⁰, 1995), outros evidenciaram sua presença em células situadas na periferia dos ductos e em células triangulares localizadas entre as células dos ductos estriados (Caselitz et al.¹⁴, 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982) e em células mioepiteliais e células basais de ductos estriados e excretores (Gustafsson et al.⁴⁸, 1988).

Nas neoplasias de glândulas salivares nas quais se postula a participação da célula mioepitelial como componente tumoral, diversos estudos mostraram a presença de vimentina em células mioepiteliais, seja naquelas localizadas externamente às estruturas ductais, seja nas células mioepiteliais modificadas, no adenoma pleomórfico (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Burns et al.¹⁰, 1988; Caselitz et al.¹⁴, 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982; Erlandson et al.³⁶, 1984; Gustafsson et al.⁴⁷,

1989; Leoncini et al.⁶¹, 1988; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Takai et al.⁹⁰, 1995), mioepitelioma (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Dardick et al.²⁷, 1989; Dardick et al.³⁰, 1989; Franquemont et al.⁴⁰, 1993; Takai et al.⁹⁰, 1995), adenoma de células basais (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Ferreiro³⁸, 1994; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Williams et al.⁹⁷, 1993), carcinoma adenóide cístico (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Azumi & Battifora⁴, 1987; Bergman et al.⁷, 1991; Caselitz et al.¹³, 1986; Chomette et al.¹⁹, 1991; Gustafsson et al.⁴⁷, 1989; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Regezi et al.⁸², 1991), adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Norberg et al.⁷¹, 1991; Regezi et al.⁸², 1991), carcinoma epitelial-mioepitelial (Araújo & Araújo¹, 1990), carcinoma em adenoma pleomórfico (Gustafsson et al.⁴⁷, 1989), e adenocarcinoma de células basais (Williams et al.⁹⁷, 1993).

Araújo & Araújo¹ (1990) consideraram o filamento de vimentina como um dos indicadores mais precoces da diferenciação mioepitelial neoplásica, baseados na observação de sua presença em todos os tumores com participação presumida da célula mioepitelial. Reforçando tais achados, Araújo et al.³ (1994) não encontraram vimentina em tumores presumidamente originados de ductos excretores ou naqueles em que não há evidência da presença de células mioepiteliais, tais como cistadenoma, cistadenoma papilar linfomatoso, papiloma ductal invertido, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma de ducto salivar e carcinoma de células acinares.

A co-expressão de vimentina e de filamentos de citoqueratina tem sido verificada em células mioepiteliais do adenoma pleomórfico, seja por meio de técnica de imunofluorescência (Caselitz et al.¹⁵, 1982; Erlandson et al.³⁶, 1984), seja por imuno-histoquímica (Mori et al.⁶⁶, 1990; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Shinohara et al.⁸⁶, 1989). A presença simultânea dos filamentos intermediários de vimentina e citoqueratina foi

demonstrada também em carcinomas adenóide císticos (Caselitz et al.¹⁶, 1984; Chomette et al.¹⁸, 1991; Chomette et al.¹⁹, 1991).

Usando reações imuno-histoquímicas simples em cortes seriados do tumor, Morinaga et al.⁶⁷ (1987) observaram a co-expressão de vimentina e queratina (anticorpo KL1, que reage com peptídeos de 55 a 57 Kd), em células "mesenquimais" e hialinas do adenoma pleomórfico. A co-expressão de queratina (anticorpo KL1) e vimentina foi sugerida também nas células que revestem espaços císticos, células tubulares externas e células indiferenciadas do carcinoma adenóide cístico.

Utilizando técnica semelhante, Shinohara et al.⁸⁶ (1989) verificaram a co-expressão de vimentina e queratina (anticorpo K8.12, que reage com as citoqueratinas 13 e 16) nas células externas de estruturas túbulo-ductais, células periféricas de focos sólidos e em células mioepiteliais modificadas de adenomas pleomórficos.

A co-expressão de filamentos intermediários de citoqueratina e vimentina foi demonstrada por Mori et al.⁶⁶ (1990), por meio de técnica de dupla marcação de anticorpos, em adenomas pleomórficos e mioepiteliomas. Os autores observaram que as células externas das estruturas ductais apresentaram co-expressão de citoqueratina (anticorpo 8.12, contra citoqueratinas 13 e 16), vimentina e ainda de proteína S-100, enquanto as células lumbais apresentaram positividade com os diversos anticorpos anti-citoqueratinas testados (KL1, anti-citoqueratina de 56 Kd; PKK1, anti-citoqueratinas 19, 18, 8; e K8.12, anti-citoqueratinas 13, 16), demonstrando um perfil puramente epitelial. As células mioepiteliais modificadas ou neoplásicas mostraram um padrão mais heterogêneo de marcação, porém, também apresentaram co-expressão de filamentos de citoqueratina (anticorpo 8.12) e vimentina, além de proteína S-100. As células do mioepitelioma expressaram o maior número de proteínas, ou seja, citoqueratinas

detectadas pelos anticorpos KL1, PKK1 e K8.12, vimentina e proteína S-100.

Em carcinomas adenóide císticos de glândulas salivares, Chomette et al.¹⁹ (1991) realizaram reações imuno-histoquímicas empregando os seguintes anticorpos monoclonais: PKK1 (citoqueratinas 8, 18, 19), KL1 (citoqueratinas de 55-57Kd), K8.12 (citoqueratinas 13, 16), K8.B e K4.62 (citoqueratina 19) e anti-vimentina. Observaram co-expressão de diversas citoqueratinas e vimentina em células basalóides e derivadas de células mioepiteliais. A co-expressão de queratina e vimentina não foi observada em células lumbais.

Chomette et al.¹⁸ (1991), utilizando os mesmos anticorpos do trabalho anterior (Chomette et al.¹⁹, 1991) observaram também co-expressão de vimentina e de diversas citoqueratinas, especialmente nos carcinomas basalóide sólido e basalóide parcialmente diferenciado. Na variante anaplásica, apenas algumas poucas células foram fracamente positivas com antisoro para citoqueratina e vimentina.

2.4.3. Actina

A actina, um microfilamento do citoesqueleto, está presente em grande quantidade, tanto em células musculares como não musculares (Tsukada et al.⁹², 1987; Tsukada⁹³, 1987). A presença de microfilamentos de actina, bem como de filamentos intermediários de citoqueratina foi demonstrada em populações celulares de adenomas pleomórficos, tanto por método imuno-citoquímico, como através de método de imuno-eletromicroscopia, utilizando anticorpo anti-actina humana (Caselitz & Löning¹², 1981).

Com base em diferenças no ponto isoelétrico e na sequência de amino-ácidos, a actina foi dividida em seis isotipos

diferentes. As isoformas de actina apresentam, como os filamentos intermediários, uma restrição tecidual. Duas das actinas são inespecíficas (isotipos beta e gama não musculares), ou seja, são comuns a muitos tipos celulares. As actinas de músculo liso (alfa e gama) e as actinas sarcoméricas (alfa de músculo esquelético e alfa de músculo cardíaco), entretanto, apresentam especificidade para músculo do tipo liso e sarcomérico, respectivamente (Tsukada et al.⁹², 1987; Zarbo et al.⁹⁹ 1991).

O anticorpo monoclonal HHF35 detecta um epítopo comum aos isotipos de actina alfa das células musculares esqueléticas, cardíacas e lisas, mais actina gama de células musculares lisas, mas não os isotipos de actina de células não musculares (Tsukada et al.⁹², 1987; Tsukada et al.⁹³, 1987).

Tsukada et al.⁹² (1987) demonstraram que a positividade da reação imuno-histoquímica ao anticorpo HHF35 mantém-se, independente do fixador utilizado, sendo encontrada nas seguintes células contráteis: células musculares miocárdicas, células mioepiteliais da glândula mamária e células musculares lisas. Posteriormente os autores observaram também a positividade da reação imuno-histoquímica ao anticorpo HHF35 em diversas condições patológicas, como nos miofibroblastos presentes em certas reações fibrosas e em células de tumores com diferenciação muscular (Tsukada et al.⁹³, 1987).

A presença de actina foi detectada por meio de reação imuno-histoquímica, em células mioepiteliais de glândulas salivares normais, com a utilização do anticorpo HHF35, empregando fixação em solução de formalina (Araújo et al.³, 1994) e solução de "methacarn" modificada (Takai et al.⁹⁰, 1995).

Tsukada et al.⁹³ (1987) observaram positividade ao anticorpo HHF35 em células mioepiteliais normais, e em dois casos de carcinoma adenóide cístico e três de adenoma pleomórfico. A reação foi

observada nas células tumorais localizadas na periferia de alguns blocos celulares, simulando a diferenciação mioepitelial normal na periferia dos ácinos. Entretanto, a maioria dos adenomas pleomórficos estudados (6 em 9 casos) foi negativa para o anticorpo HHF35.

Chen et al.¹⁷ (1988) verificaram reação imuno-histoquímica positiva ao anticorpo HHF35 em 10 dos 13 casos de carcinoma adenóide cístico com padrão cribriforme, em células que revestiam espaços pseudo-císticos e outras células não lumbinais. Nos tumores com padrão tubular, houve positividade nas células não lumbinais e reação negativa nas lumbinais. Os autores consideraram as células que revestiam espaços pseudo-císticos e outras células não lumbinais, observadas nos tumores cribriformes e sólidos, similares às células não lumbinais do padrão tubular, sendo ambas de natureza mioepitelial. Essas células também expressaram, além de actina, queratina de baixo peso molecular (54Kd) e, ocasionalmente, queratina detectada por anticorpo policlonal (contra citoqueratinas de 40-65 Kd) e proteína S-100. Por outro lado, as células lumbinais verdadeiras, observadas nos tumores cribriformes, tubulares e sólidos, expressaram antígeno carcino-embriônico (CEA), antígeno epitelial de membrana (EMA), queratina detectada pelo anticorpo policlonal, queratina de 54Kd e proteína S-100.

Utilizando um anticorpo monoclonal anti-alfa actina de músculo liso (SM-1), Gugliotta et al.⁴⁴ (1988) observaram reação imuno-histoquímica positiva em células mioepiteliais localizadas em torno de ácinos de glândulas salivares normais, porém, não em células basais de ductos excretores.

Hirano et al.⁵³ (1990) realizaram estudo imuno-histoquímico utilizando dois anticorpos anti-actina: HUC1-1, que reconhece as quatro isoformas de alfa actina (músculo cardíaco, esquelético, vascular e entérico) e 1A4, que reconhece apenas uma isoforma de alfa actina de músculo liso vascular, em glândulas salivares normais, adenomas

pleomórficos e carcinomas adenóide císticos. Os autores compararam a expressão de actina com a expressão de vimentina (anticorpo V9), e de citoqueratinas (anticorpos 34BE12 e AE-1). Em glândulas salivares normais observaram reação positiva aos anticorpos anti-actina em células mioepiteliais e células musculares lisas, reação positiva para as citoqueratinas em células epiteliais ductais e ocasionalmente reação positiva para vimentina nas células mioepiteliais. Nos tumores, células histologicamente semelhantes a mioepiteliais foram positivas para ambos os anticorpos anti-actina, na maioria dos casos estudados. Os dois anticorpos anti-citoqueratinas estavam distribuídos difusamente nos tumores, particularmente nas células epiteliais escamosas e no revestimento ductal. A expressão de vimentina foi alta em ambos os tumores. Os autores concluíram que a actina muscular seria um bom marcador para a diferenciação mioepitelial, tanto em glândulas salivares normais como em tumores destas originados.

Reação positiva ao anticorpo anti-actina de músculo liso 1A4 foi observada também por Draeger et al.³⁴ (1991), em células mioepiteliais de glândulas salivares normais.

A expressão de proteínas musculares (desmina e actinas) em glândulas salivares normais e adenomas pleomórficos foi estudada por Zarbo et al.⁹⁹ (1991), por meio de método imuno-histoquímico. Os autores utilizaram anticorpos monoclonais contra pan-actina muscular (HHF35), actinas de músculo liso (CGA-7) e actina sarcomérica (WILLY). Observaram a presença de actina músculo-específica, mas, não de actina sarcomérica e desmina, na célula mioepitelial, em todas as glândulas normais e nas células mioepiteliais periductais do adenoma pleomórfico. Filamentos de desmina e actina músculo-específica foram evidenciados em casos não sobrepostos de adenoma pleomórfico, em células fusiformes e estrelárias. A desmina foi observada em dois dos 11 casos que sofreram congelação, enquanto a actina foi evidenciada em 50% dos

casos de adenoma pleomórfico, demonstrando que a célula mioepitelial neoplásica no adenoma pleomórfico nem sempre apresenta actina muscular. Tal observação poderia estar relacionada à perda de função contrátil e de filamentos de diferenciação com a transformação neoplásica, apesar da manutenção da morfologia semelhante à mioepitelial.

Regezi et al.⁸² (1991), observaram fraca positividade à reação imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-actina músculo específica, em apenas 2 de 15 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau examinados, sendo os restantes negativos. Nos casos de carcinoma adenóide cístico, observaram marcação para actina em 14 de 15 casos examinados.

Utilizando dois anticorpos monoclonais anti-actina, HHF35 e MSA (actina músculo específica), ambos reconhecendo isoformas de actina de músculo liso, esquelético e cardíaco, Dardick et al.³² (1992) estudaram casos de adenoma pleomórfico e mioepitelioma, além de glândulas salivares normais. Utilizaram ainda dois tipos de fixador, formalina e Carnoy modificado (90% metanol, 10% ácido acético glacial). Com o fixador alcoólico, observaram que todos os espécimes de glândula salivar normal mostraram forte marcação das células mioepiteliais com ambos os anticorpos. A marcação variou nos tumores, com maior positividade ao anticorpo MSA (57% dos casos) do que ao anticorpo HHF35 (14%), em material fixado em formalina, porém, houve um certo grau de falsa positividade. Com o fixador alcoólico, houve positividade aos dois anticorpos em 31% dos casos. Os autores concluíram que a fixação em metanol seria mais apropriada para o estudo imuno-histoquímico de actina e que a expressão de actina observada nesse material refletiria a heterogeneidade morfológica e funcional das células tumorais.

Franquemont et al.⁴⁰ (1993) procuraram verificar a diferenciação miogênica em 5 casos de mioepitelioma, sendo 3 fusiformes e 2 plasmocitóides, por meio de reação imuno-histoquímica com os anticorpos HHF35, 1A4 (anti-alfa actina de músculo liso) e 33 (anti-desmina). Utilizaram também anticorpos anti-vimentina, citoqueratina, antígeno epitelial de membrana, proteína S-100, e proteína glial fibrilar ácida. Observaram que as células plasmocitóides não reagem contra antígenos musculares (HHF35, 1A4 e desmina) e eram positivas aos anticorpos anti-citoqueratinas, vimentina, proteína glial fibrilar ácida e proteína S-100. Ao exame ultra-estrutural, observaram que as células plasmocitóides não apresentavam corpos densos ou vesículas pinocitóticas. Diante das observações, consideraram que as células plasmocitóides não exibiam evidências ultra-estruturais ou imuno-histoquímicas miogênicas, dessa forma o termo mioepitelial foi considerado não apropriado pelos autores, que sugeriram a denominação adenoma plasmocitóide, em lugar de mioepitelioma plasmocitóide.

Comparando a expressão de actina e vimentina em 24 tumores de glândulas salivares, sendo 2 adenomas de células basais, 7 adenomas pleomórficos, 2 mioepiteliomas, 7 carcinomas adenóide císticos e 6 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade, Araújo et al.³ (1994) verificaram positividade consistente para actina apenas nas células tumorais do carcinoma adenóide cístico dos padrões cribriforme e tubular. Por outro lado, a vimentina foi observada em todos os tumores estudados, às vezes apenas focalmente. Os autores sugeriram que a actina seria pelo menos parcialmente substituída por vimentina, nas células mioepiteliais neoplásicas.

2.4.4. Antígeno epitelial de membrana (EMA)

Nos estudos imuno-histoquímicos das neoplasias de glândulas salivares, um anticorpo bastante utilizado é o que reage com o antígeno epitelial de membrana (EMA), para evidenciação de células epiteliais lumbais, tendo em vista a controvérsia quanto ao grau de diferenciação epitelial e mioepitelial em alguns desses tumores (Caselitz et al.¹³, 1986; Gusterson et al.⁴⁸, 1982; Kahn et al.⁵⁸, 1985).

O antígeno epitelial de membrana faz parte de um grupo de mucinas epiteliais polimórficas, as quais são sílomucinas de alto peso molecular, consistindo de uma proteína central, com uma repetição linear de 20 amino-ácidos e glicosilações de alto peso molecular. Sua detecção imuno-histoquímica, juntamente com anticorpos contra outras mucinas epiteliais polimórficas, ajuda a discriminar componentes glandulares e secretórios de tumores epiteliais (Williams et al.⁹⁷, 1993).

O antígeno epitelial de membrana foi isolado a partir de membranas que revestem glóbulos gordurosos do leite humano, secretados por um processo de pinocitose reversa pelas células mamárias. Tais membranas, isoladas do leite após a extração de lipídeos, mostraram-se imunógenos efetivos para a produção de anticorpos policlonais e monoclonais. Além do epitélio mamário, os anticorpos anti-EMA apresentam imunoreatividade com epitélio normal glandular, ductal e transicional, com túbulos distais e coletores do parênquima renal e apêndices cutâneos. Epitélio escamoso normal, hepatócitos, tecido mole, sinóvia, células linfóides e elementos hematopoiéticos são negativos para o anticorpo anti-EMA (Pinkus & Kurtin⁷⁹, 1985).

Em adenocarcinomas, o antígeno epitelial de membrana foi detectado em tumores originados em mama, estômago, pâncreas, cólon, bexiga, pulmão, próstata, endométrio, ovário e tireóide, sendo os padrões de reatividade imuno-histoquímica mais comuns a marcação

citoplasmática e da membrana luminal apical. Outras neoplasias epiteliais de células escamosas ou de células transicionais foram também positivas para EMA, bem como carcinoma anaplásico de pequenas células e mesoteliomas (Pinkus & Kurtin⁷⁹, 1985).

Em glândulas salivares normais, o antígeno epitelial de membrana foi evidenciado na borda luminal de células ductais de ducto intercalar e estriado (Azumi & Battifora⁴, 1987; Bergman et al.⁷, 1991; Caselitz et al.¹³, 1986; Chen et al.¹⁷, 1988; Gusterson et al.⁴⁹, 1982; Kahn et al.⁵⁸, 1985), em células acinares serosas de glândulas parótida e submandibular (Chen et al.¹⁷, 1988), em células acinares (Caselitz et al.¹³, 1986) e ocasionalmente em células acinares mucosas de glândulas salivares menores (Gusterson et al.⁴⁹, 1982).

O antígeno epitelial de membrana foi demonstrado na borda apical de células epiteliais ductais luminais e na secreção luminal, em diversos tumores glandulares, como adenoma pleomórfico (Günhan et al.⁴⁵, 1992; Gusterson et al.⁴⁹, 1982; Kahn et al.⁵⁸, 1985), adenoma de células basais (Ferreiro³⁸, 1994; Gusterson et al.⁴⁹, 1982; Kahn et al.⁵⁸, 1985), carcinoma adenóide cístico (Bergman et al.⁷, 1991; Caselitz et al.¹³, 1986; Chen et al.¹⁷, 1988; Günhan et al.⁴⁵, 1992; Gusterson et al.⁴⁹, 1982; Kahn et al.⁵⁸, 1985), adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (Norberg et al.⁷¹, 1991) e adenocarcinoma de células basais (Williams et al.⁹⁷, 1993).

No adenoma pleomórfico foi descrita, ainda, fraca marcação para EMA em células com metaplasia escamosa (Gusterson et al.⁴⁹, 1982), além de marcação variável em áreas mixóides e condróides. A marcação para EMA nas células das áreas mixóides refletiria derivação epitelial, enquanto a marcação do material mixóide sugeriria capacidade secretória (Günhan et al.⁴⁵, 1992; Gusterson et al.⁴⁹, 1982).

3 PROPOSIÇÃO

É nosso objetivo neste trabalho estudar a expressão de filamentos intermediários de citoqueratina e vimentina, do microfilamento de actina e do antígeno epitelial de membrana, em neoplasias de glândulas salivares originadas do segmento intercalar. Esses marcadores serão analisados dois a dois, buscando-se verificar a diferenciação dos diversos elementos celulares dos tumores e relacionar a diferenciação da célula mioepitelial neoplásica com a presença de secreção nas células luminais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As neoplasias de glândulas salivares estudadas foram obtidas dos arquivos dos Laboratórios de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP e da Faculdade de Odontologia de São Paulo - USP. Foram estudadas as seguintes neoplasias: 03 adenomas de células basais, 05 mioepiteliomas, 05 adenomas pleomórficos, 10 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade e 07 carcinomas adenóide císticos. Dois casos de mucocelo contendo lóbulos de glândulas salivares menores foram utilizados como controle.

Foram realizadas reações imuno-histoquímicas para dupla evidencição de antígenos, utilizando-se a técnica da Streptoavidina-peroxidase, para o primeiro antígeno e Streptoavidina-fosfatase alcalina, para o segundo antígeno.

Os seguintes antígenos foram demonstrados por estas técnicas:

- HHF 35 x EMA
- HHF 35 x CK 14
- HHF 35 x VIMENTINA
- EMA x VIM
- EMA x CK 14
- CK 14 x VIM
- CK 7 x CK 14
- CK 8 x CK 14
- CK 18 x CK 14
- CK 19 x CK 14

O painel de anticorpos empregado baseou-se em estudos anteriores, realizados no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo & Sousa², 1996; Araújo et al.³, 1994).

Os blocos de parafina contendo fragmentos das neoplasias previamente fixados em solução de formol a 10% foram cortados em fatias de 3 micra de espessura, em lâminas previamente tratadas com organosilano. Os cortes seguiram os seguintes passos:

- desparafinação em xilol e reidratação em série descendente de etanol,
- eliminação de pigmentos formólicos pelo tratamento em hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°,
- lavagem em água corrente e água destilada,
- incubação com peróxido de hidrogênio a 6% mais metanol 1:1, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena tecidual,
- lavagem em água corrente e água destilada e imersão por 2 vezes em tampão Tris, pH 7,4, durante cinco minutos cada,
- incubação com o anticorpo primário diluído em tampão Tris acrescido de soroalbumina bovina (BSA) a 1%, à temperatura ambiente.

Os anticorpos primários utilizados, bem como suas diluições e tempo de incubação, estão na tabela I.

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em Tris pH 7,4, durante 5 minutos cada.

- incubação com o anticorpo secundário biotinilado, na diluição de 1:300, por 30 minutos, à temperatura ambiente (Kit K0492 - Dako)
- lavagem,
- exposição ao complexo streptoavidina-biotina-peroxidase, por 30 minutos, à temperatura ambiente, numa diluição de 1:300,

- lavagem,
- visualização da atividade da peroxidase pela imersão em solução de diaminobenzidina, 20 mg, dissolvida em 100ml de tampão Tris pH 7,4, com adição de 600 microlitros de H₂O₂ a 20 volumes por 3 minutos,
- lavagem em água corrente e água destilada.

A seguir foi realizada eluição com ácido oxálico a 0,5%, pH 2,8 a 4°C, durante 15 horas, para se proceder à segunda parte da reação:

- lavagem em água corrente e água destilada e duas passagens em Tampão Tris, durante 5 minutos cada,
- incubação com o anticorpo primário à temperatura ambiente,
- lavagem,
- incubação com o anticorpo secundário biotinilado, por 20 minutos, à temperatura ambiente (Kit AAOO-5M - Biogenex),
- lavagem,
- exposição do complexo da streptoavidina-biotina mais fosfatase alcalina, por 20 minutos, à temperatura ambiente (Kit AAOO-5M - Biogenex),
- lavagem,
- exposição ao substrato cromogênico, preparado com 1 comprimido de Fast-Red em 5ml de tampão naphtol-fosfato, por cerca de 10 minutos, acompanhada ao microscópio, à temperatura ambiente,
- lavagem em água corrente, água destilada,
- contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer e montagem em glicergel.

Quando se utilizou anticorpo anti-citoqueratina, foi feito tratamento em forno de microondas, antes do bloqueio da peroxidase endógena. Nos casos em que o anticorpo anti-citoqueratina era utilizado apenas na segunda fase da reação, testou-se esse tratamento antes e

depois da eluição, tendo-se obtido melhores resultados com o último. O procedimento consta de: colocação das lâminas em cuba de vidro contendo ácido cítrico a 10 mM (pH 6,0), levada ao forno de microondas por 3 vezes, durante 5 minutos cada, a 700w.

Cinco dos tumores estudados foram fixados em solução de Carnoy modificada (metacarn), sendo: 90% de metanol e 10% de ácido acético glacial; para servir de controle ao material submetido ao tratamento em forno de microondas.

Controles positivos para cada anticorpo, conforme indicados pelo fabricante, foram utilizados. Controles negativos foram incubados com solução tampão no lugar do anticorpo primário. Os cortes foram visualizados em microscópio de luz.

TABELA I - Anticorpos utilizados, concentração e tempo de incubação.

Anticorpo	Concentração	Tempo de incubação (min.)
CK 14*	1:50	30
VIMENTINA** (clone V9)	1:50	120
EMA* (clone E29)	1:80	120
ACTINA* (clone HHF35)	1:50	60
CK 7*	1:50	30
CK 8*	1:60	60
CK 18*	1:600	60
CK 19* (clone RCK 108)	1:50	60

* Biogenex Lab., San Ramon, Ca.

**Dako Corporation, Santa Barbara, Ca.

5 RESULTADOS

Foram analisadas 30 neoplasias de glândulas salivares menores, sendo: 05 adenomas pleomórficos, 05 mioepiteliomas, 03 adenomas de células basais, 10 adenocarcinomas de baixo grau de malignidade e 07 carcinomas adenóide císticos. Dois casos de mucocelo contendo lóbulos de glândulas salivares menores foram utilizados como controle.

Glândulas salivares normais estavam presentes também em fragmentos de biópsias de diversos tumores, servindo como controles internos das reações. Nelas pôde-se observar que as células acinares expressam as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. As células ductais intercalares luminais expressam as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 e, eventualmente co-expressam a citoqueratina 14 (CK 14). Em alguns ductos as células luminais são positivas para EMA em seu polo apical. As células ductais externas expressam CK 14. Células mioepiteliais achatadas, na periferia dos ácinos e de alguns ductos são positivas para CK 14 e para actina. Não se observa marcação das estruturas glandulares para vimentina, presente apenas no estroma.

Adenoma Pleomórfico (cinco casos): todos os tumores estudados apresentam estruturas ductais, formadas por duas camadas celulares ou mais, muitas vezes com proliferação de células poligonais ou escamosas na sua porção externa. Os tumores são predominantemente celulares, com massas de células poligonais, plasmocitóides e fusiformes, por vezes com metaplasia escamosa. Áreas mixóides ou hialinas, contendo células estrelárias ou plasmocitóides, estão presentes nos tumores em geral. Aspecto condróide foi raramente observado.

As células ductais luminais são positivas para as citoqueratinas 7, 8, 18, 19 e muitas vezes co-expressam a citoqueratina 14. Em diversos ductos, as células externas são positivas para CK 14, co-expressando também vimentina (Figuras 1-4). Em alguns ductos formados por duas camadas de células, a célula externa co-expressa vimentina e actina (Figuras 5,6). Nos ductos com conteúdo secretório, cujas células luminais são grandes e colunares, estas são positivas para o antígeno epitelial de membrana (EMA) e as células externas são positivas para vimentina, eventualmente co-expressando actina e CK 14. Por vezes um mesmo ducto mostra células luminais positivas para EMA ao lado de outras positivas para CK 14. Em outros ductos observa-se co-expressão destes dois antígenos na mesma célula luminal (Figuras 7,8).

As células hialinas ou plasmocitóides apresentam marcação variada, mostrando-se positivas para CK 14, algumas vezes co-expressando a CK 14 com a CK 7, a CK 8 e a CK 18. As células hialinas ou plasmocitóides em geral são positivas para vimentina e negativas para actina. As células poligonais são positivas para vimentina e CK 14. Nas regiões com metaplasia escamosa as células mais periféricas são positivas para CK 14. As células fusiformes são positivas para vimentina e muitas vezes co-expressam também actina. Nas áreas condróides as células são positivas apenas para vimentina.

Mioepitelioma (cinco casos): os tumores apresentam blocos de células plasmocitóides ou hialinas e por vezes fusiformes. Raros ductos são observados na periferia dos tumores. As células hialinas ou plasmocitóides mostram marcação variada para as citoqueratinas, sendo que nos tumores, em geral notam-se grupos de células positivas para CK 14 ou CK 7 e, menos comumente, grupos de células positivas para as CKs 8, 18 e 19 (Figura 9). Observam-se ainda focos de células plasmocitóides apresentando co-expressão das citoqueratinas 14 e 7, 14

e 8, e 14 e 19 (Figuras 10,11). As células hialinas ou plasmocitóides em geral e as células fusiformes são positivas para vimentina e as fusiformes algumas vezes co-expressam actina (Figuras 12,13).

Adenoma de células basais (três casos): um dos tumores é do tipo túbulo-trabecular, apresentando túbulos com duas camadas celulares e células cúbicas com arranjo trabecular, com células colunares baixas na periferia, outro tumor é predominantemente tubular, com ductos bem diferenciados, formados por duas camadas de células e grande quantidade de secreção nos lumens e o terceiro tumor é predominantemente sólido (tipo monomórfico) com poucas estruturas tubulares e trabeculares.

No tumor do tipo túbulo-trabecular as células luminiais das estruturas tubulares são positivas para a CK 14 e co-expressam as citoqueratinas 14 e 7, 14 e 8 ou 14 e 18, enquanto as externas são positivas para vimentina, e algumas vezes co-expressam a vimentina com CK 14 ou com actina (Figura 14).

No tumor tubular, o conteúdo secretório e a célula luminal são uniformemente positivos para EMA. Esta célula expressa ainda CK 7, CK 8, CK 18 e CK 19 e eventualmente a CK 14. A célula externa é positiva para vimentina, co-expressando vimentina e actina, vimentina e CK 14 e também actina e citoqueratina 14 (Figuras 15-17).

No tumor sólido algumas células são positivas para as citoqueratinas 8, 18, 14 e 19. Nas estruturas ductiformes com apenas uma camada de células, a marcação é semelhante. Nas estruturas ductiformes com duas camadas de células o padrão de marcação é semelhante ao observado no tipo túbulo-trabecular. As células em geral são positivas para vimentina e negativas para actina e EMA.

As células ductais luminais são positivas para as citoqueratinas 7, 8, 18, 19 e muitas vezes co-expressam a citoqueratina 14. Em diversos ductos, as células externas são positivas para CK 14, co-expressando também vimentina (Figuras 1-4). Em alguns ductos formados por duas camadas de células, a célula externa co-expressa vimentina e actina (Figuras 5,6). Nos ductos com conteúdo secretório, cujas células luminais são grandes e colunares, estas são positivas para o antígeno epitelial de membrana (EMA) e as células externas são positivas para vimentina, eventualmente co-expressando actina e CK 14. Por vezes um mesmo ducto mostra células luminais positivas para EMA ao lado de outras positivas para CK 14. Em outros ductos observa-se co-expressão destes dois antígenos na mesma célula luminal (Figuras 7,8).

As células hialinas ou plasmocitóides apresentam marcação variada, mostrando-se positivas para CK 14, algumas vezes co-expressando a CK 14 com a CK 7, a CK 8 e a CK 18. As células hialinas ou plasmocitóides em geral são positivas para vimentina e negativas para actina. As células poligonais são positivas para vimentina e CK 14. Nas regiões com metaplasia escamosa as células mais periféricas são positivas para CK 14. As células fusiformes são positivas para vimentina e muitas vezes co-expressam também actina. Nas áreas condróides as células são positivas apenas para vimentina.

Mioepitelioma (cinco casos): os tumores apresentam blocos de células plasmocitóides ou hialinas e por vezes fusiformes. Raros ductos são observados na periferia dos tumores. As células hialinas ou plasmocitóides mostram marcação variada para as citoqueratinas, sendo que nos tumores, em geral notam-se grupos de células positivas para CK 14 ou CK 7 e, menos comumente, grupos de células positivas para as CKs 8, 18 e 19 (Figura 9). Observam-se ainda focos de células plasmocitóides apresentando co-expressão das citoqueratinas 14 e 7, 14

Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (dez casos): os tumores são formados por lóbulos, constituídos por células isomórficas, com núcleos grandes e ovais, áreas papilíferas e ductos formados por uma ou raramente 2 camadas de células. Em alguns tumores notam-se grupos de células maiores, caracterizadas por citoplasma amplo, bem delimitado e núcleo arredondado central, e células com aspecto mucoso ou oncocítico.

Nas massas sólidas, as células expressam vimentina e de maneira não uniforme CK 7, CK 8, CK 18 e CK 14, eventualmente co-expressando as citoqueratinas 7, 8 e 18 com a CK 14 e a vimentina com a CK 14 (Figuras 18-22). Nesses tumores, as células com citoplasma amplo e as células com aspecto mucoso ou oncocítico deixam de expressar a vimentina e Ck 14 expressam CK 7, CK8 e CK 18. As células com aspecto mucoso são positivas também para o antígeno epitelial de membrana (Figuras 23,24).

Nos ductos formados por uma camada, as células expressam vimentina, CK 7, CK 8 e CK 18 e, raramente, co-expressam CK 14. Nos raros ductos formados por duas camadas, as células luminais expressam as citoqueratinas 7, 8 e 18, por vezes co-expressando a CK 14. As células externas desses ductos são positivas para vimentina e eventualmente co-expressam a citoqueratina 14. As células neoplásicas em geral são negativas para actina (Figura 25).

Carcinoma adenóide cístico (sete casos): dois casos são formados predominantemente por estruturas ductiformes, constituídas por duas camadas de células. Outros quatro tumores são formados predominantemente por cilindros constituídos por cordões de células que se anastomosam, delimitando porções de estroma, conferindo o aspecto cribriforme. Pequenas estruturas ductiformes são vistas em meio a essas células. Algumas estruturas tubulares são ocasionalmente observadas. O

outro tumor é formado principalmente por estruturas sólidas, por vezes com pequenos ductos em seu interior e escassas estruturas ductais e cribriformes.

Nos tumores predominantemente tubulares, as células luminais expressam as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 e co-expressam CK 14. Também se nota co-expressão de EMA e CK 14, especialmente quando há presença de conteúdo secretório luminal. As células externas são positivas para vimentina, co-expressando algumas vezes actina e CK 14 (Figura 26-30).

Nos tumores predominantemente cribriformes, as células luminais apresentam um padrão semelhante ao das células luminais dos tumores tubulares. As células que revestem os espaços pseudo-císticos e as periféricas dos cilindros são positivas para vimentina e por vezes co-expressam actina e CK 14 (Figura 31).

No tumor predominantemente sólido as células são positivas para vimentina e eventualmente co-expressam a actina. Muitas células expressam as citoqueratinas 7, 8 e 18 e co-expressam CK 14. Quando há presença de pequenos lumens no interior dos lóbulos sólidos, estes são delimitados por células que expressam as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 e co-expressam CK 14 e EMA (Figura 32).

De maneira geral, nos diversos tumores examinados, os principais tipos celulares observados foram:

- Células ductais luminais negativas para EMA, expressando as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19, muitas vezes co-expressando a CK 14. Observadas no adenoma de células basais túbulo-trabecular, adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico.

- Células ductais lumbais positivas para EMA, expressando as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 e raramente co-expressando a citoqueratina 14, observadas no adenoma de células basais do tipo tubular, no adenoma pleomórfico e em alguns lumens do carcinoma adenóide cístico.

- Células externas de estruturas ductais, positivas para vimentina e co-expressando eventualmente actina e CK 14. Estas células são negativas para as citoqueratinas 7, 8, 18, 19 e para EMA. Observadas no adenoma de células basais do tipo tubular, no qual a co-expressão de vimentina, actina e citoqueratina 14 foi mais comum, e no adenoma de células basais túbulo-trabecular, adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico, nos quais a co-expressão de vimentina, actina e citoqueratina 14 foi mais rara.

- Células plasmocitóides geralmente expressando vimentina e raramente as citoqueratinas 7, 8 e 18, eventualmente co-expressando CK 14. Tais células são em geral negativas para a CK 19, assim como para actina e EMA. Observadas no adenoma pleomórfico e mioepitelioma.

- Células fusiformes em geral positivas para vimentina, às vezes co-expressando actina e negativas para todas as citoqueratinas e para EMA. Observadas no adenoma pleomórfico e mioepitelioma.

- Células com metaplasia escamosa formando ninhos, sendo as mais periféricas positivas para CK 14. Observadas no adenoma pleomórfico.

- Células poligonais co-expressando vimentina e citoqueratina 14. Observadas no adenoma pleomórfico.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisados tumores de glândulas salivares que embora apresentem comportamento biológico variado, têm em comum a provável histogênese a partir da célula de reserva do ducto intercalar (Batsakis⁵, 1980; Eversole³⁷, 1971).

Neste estudo optou-se pela técnica imuno-histoquímica da dupla marcação, para se verificar se a expressão dos diversos filamentos nas células neoplásicas ocorre independentemente ou não, buscando dessa forma contribuir para o entendimento da célula tumoral.

Com relação à metodologia empregada, a técnica de recuperação de antígenos descrita por Shi et al.⁸⁷ em 1991, utilizando irradiação por microondas, produz resultados comparáveis à digestão proteolítica e em muitos casos até superiores a esta, mesmo para anticorpos para os quais não é requerida a digestão enzimática (Norton⁷⁴, 1993). No presente estudo foram utilizados cinco tumores fixados em metacarn, fixador que impede a perda de sensibilidade da reação imuno-histoquímica, provocada pelos fixadores aldeídicos (Zarbo et al.⁸⁹, 1991). Nesses tumores fixados em metacarn não foi feita a irradiação por microondas, com o objetivo de comparar os resultados com aqueles obtidos com os tumores tratados em forno de microondas. Observou-se que, embora a marcação tenha sido ligeiramente mais intensa no material fixado em metacarn, conforme havia observado anteriormente Sousa⁸⁹ (1994), não houve diferença expressiva com relação aos cortes tratados em microondas.

Alguns dos tumores estudados exibem muitas vezes um padrão glandular, com presença de estruturas ductais formadas por duas camadas de células, sendo uma interna ou luminal e outra externa. Esse padrão morfológico mimetiza o ducto intercalar, confirmando a origem

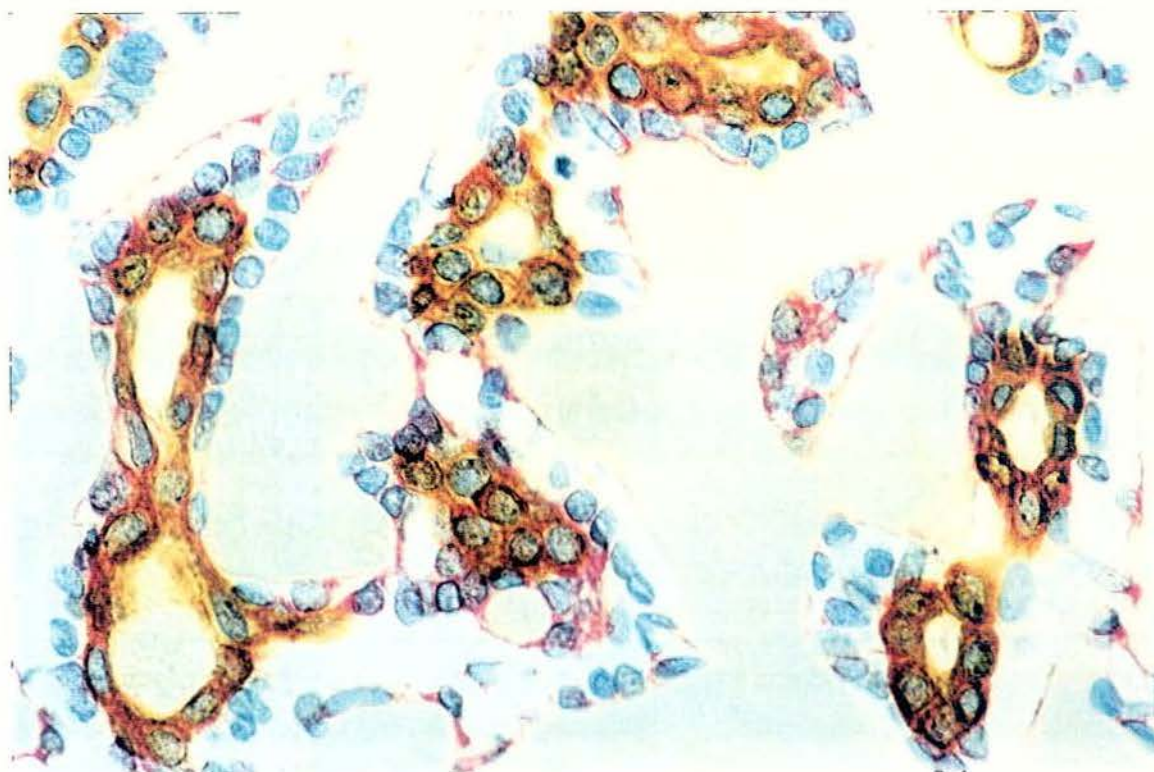


Figura 1 - Adenoma pleomórfico. citoqueratina 7 (CK 7) (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão da CK 7 nas células ductais luminais e CK 14 nas externas. 630x.



Figura 2 - Adenoma pleomórfico. CK 8 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão da CK 8 nas células ductais luminais e CK 14 nas externas. 400x.

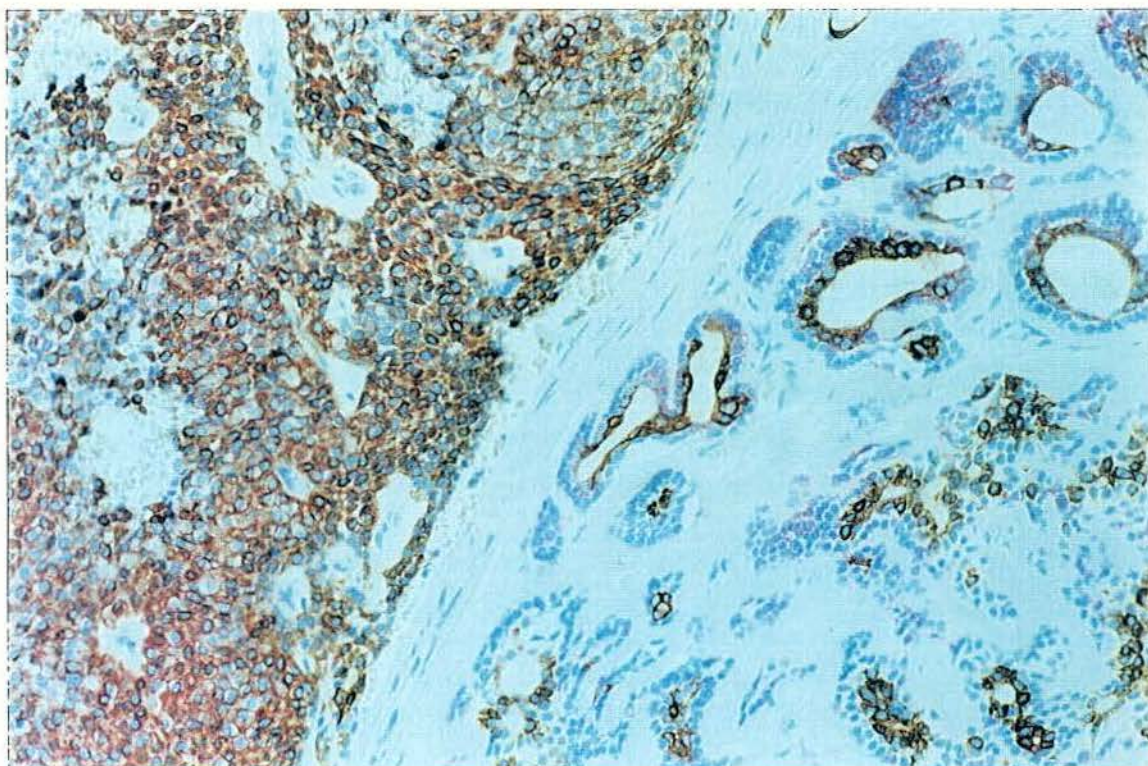


Figura 3 - Adenoma pleomórfico. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). À direita, expressão da CK 14 nas células ductais luminais e de vimentina nas externas. À esquerda células poligonais e plasmocitóides positivas para CK 14. 200x.

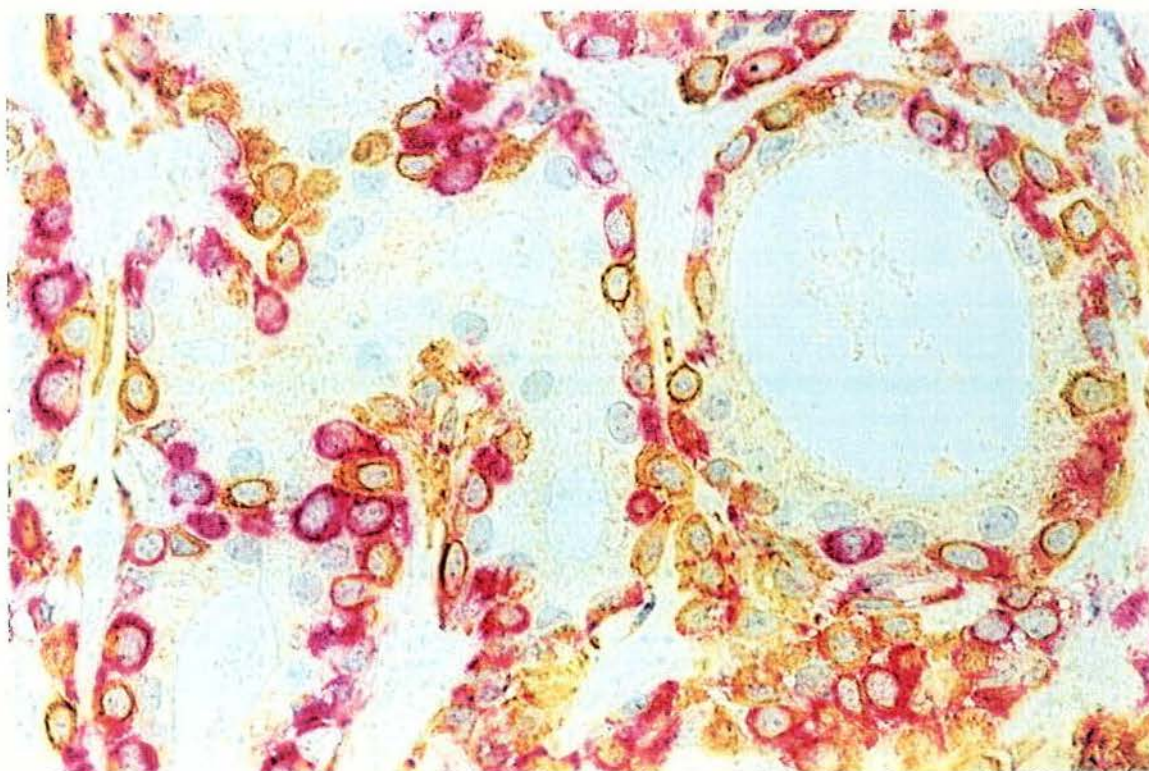


Figura 4 - Adenoma pleomórfico. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Células ductais externas co-expressando CK 14 e vimentina e células luminais negativas. 630x.

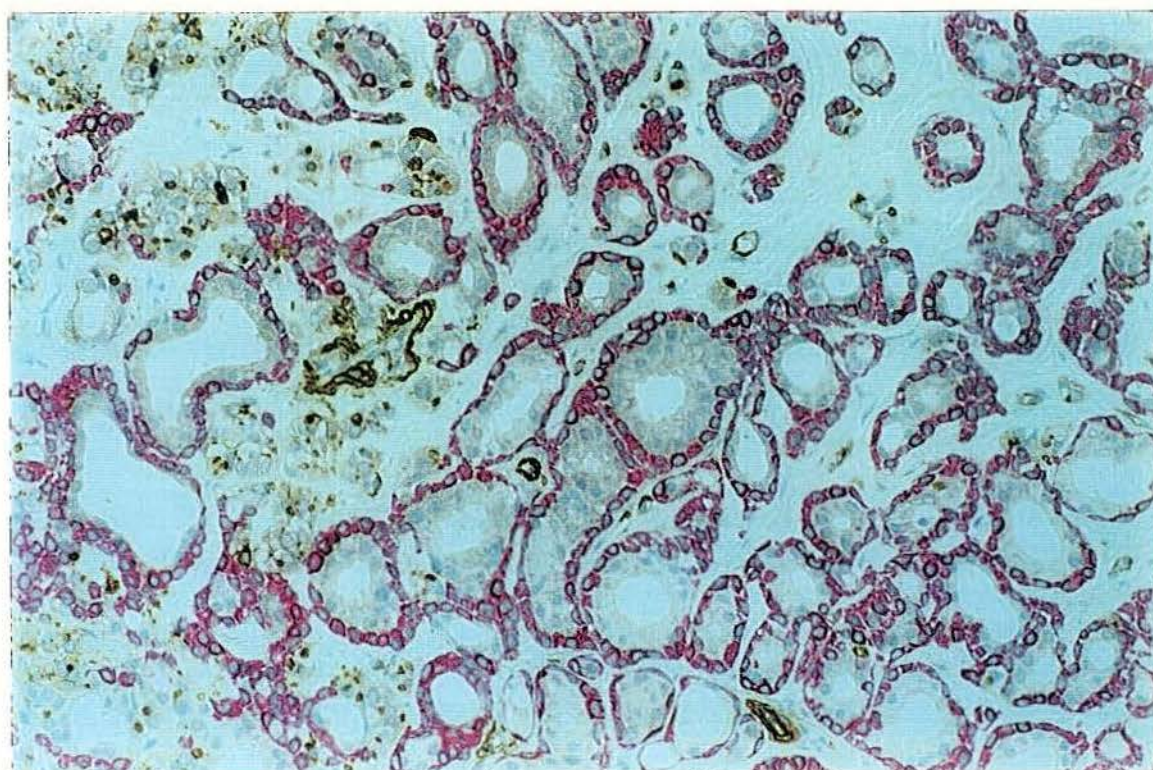


Figura 5 - Adenoma pleomórfico. Actina (diaminobenzidina) x CK14 (fast red). Expressão de CK 14 nas células ductais externas e células luminais negativas. Algumas células não luminais e paredes vasculares positivas para actina. 200x.



Figura 6 - Adenoma pleomórfico. Actina (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de CK 14 em células ductais luminais e externas. Positividade para actina em paredes vasculares. 400x.

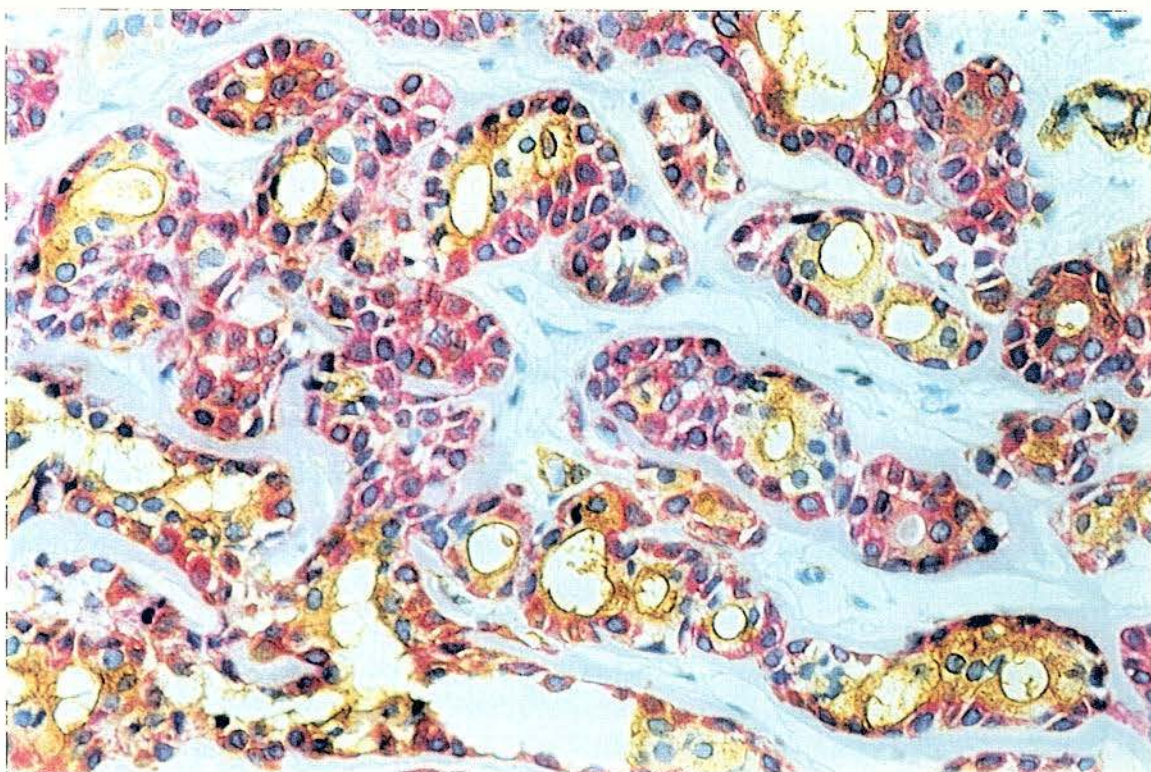


Figura 7 - Adenoma pleomórfico. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de EMA nas células ductais luminais e de CK 14 nas externas. 400x.

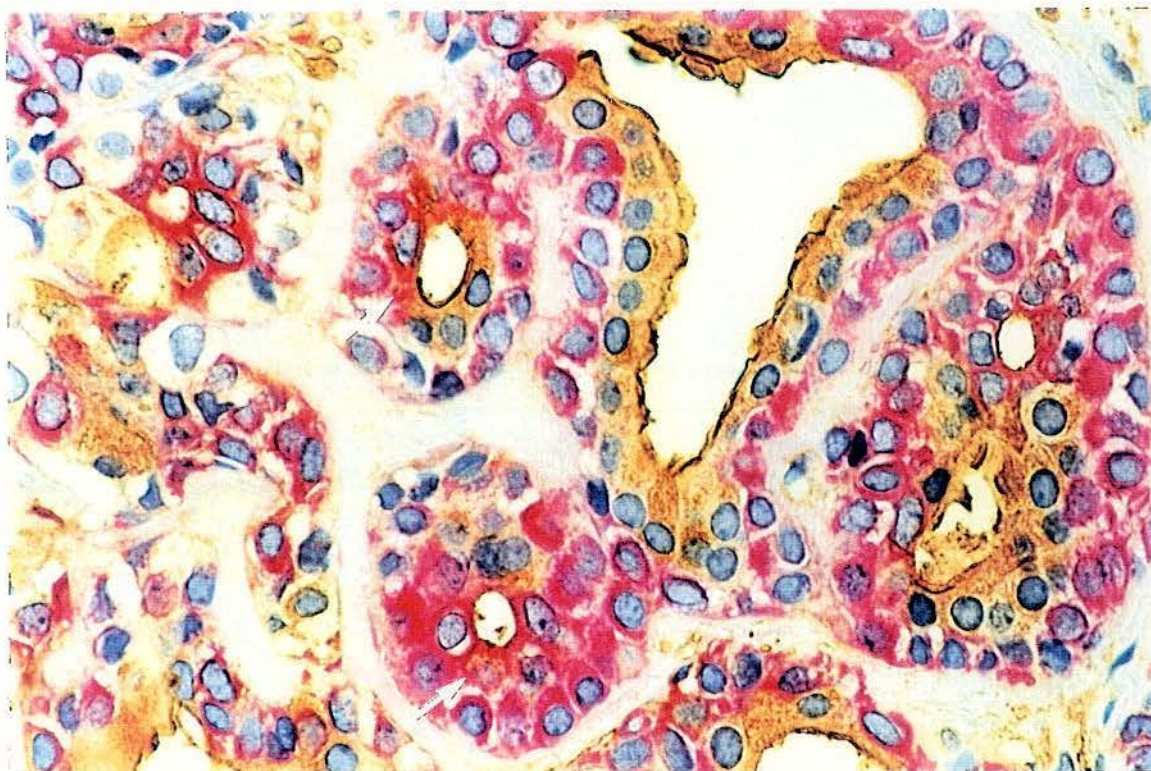


Figura 8 - Adenoma pleomórfico. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Detalhe da figura anterior, mostrando co-expressão de EMA e CK 14 em alguns lúmens (setas). 630x.

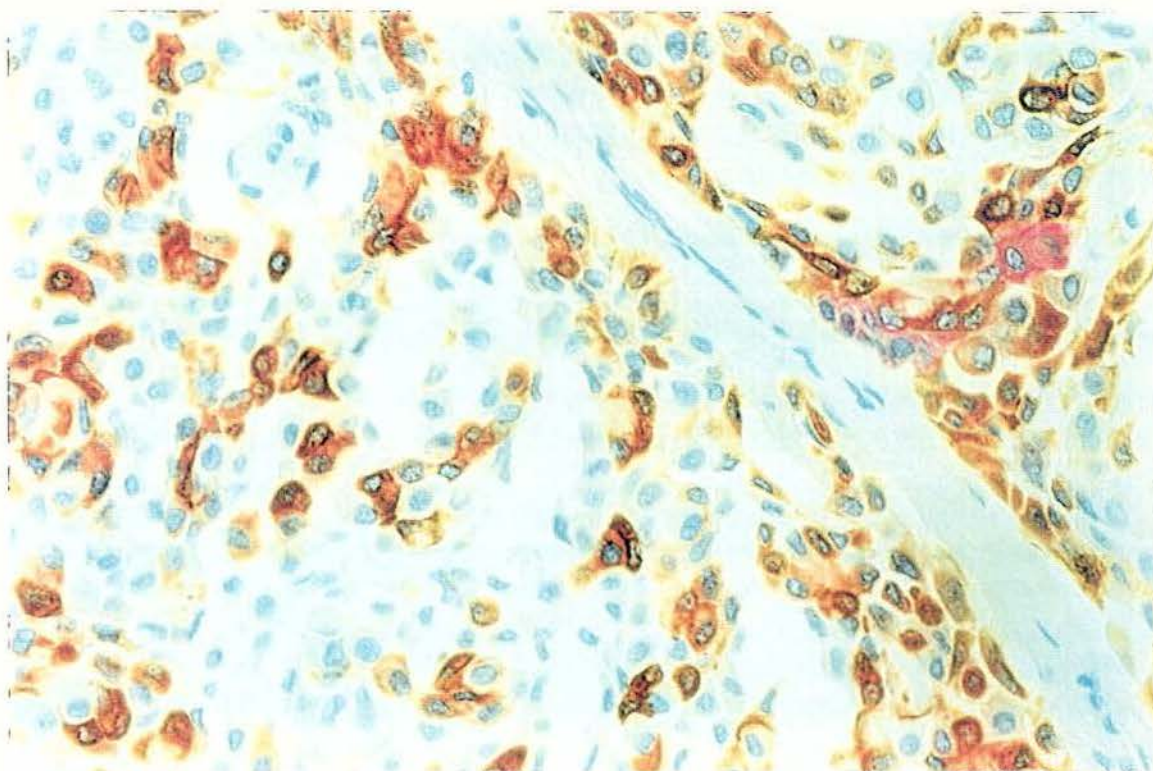


Figura 9 - Mioepitelioma. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de CK 7 em grupos de células plasmocitóides. Algumas células plasmocitóides positivas para a CK 14. 400x.

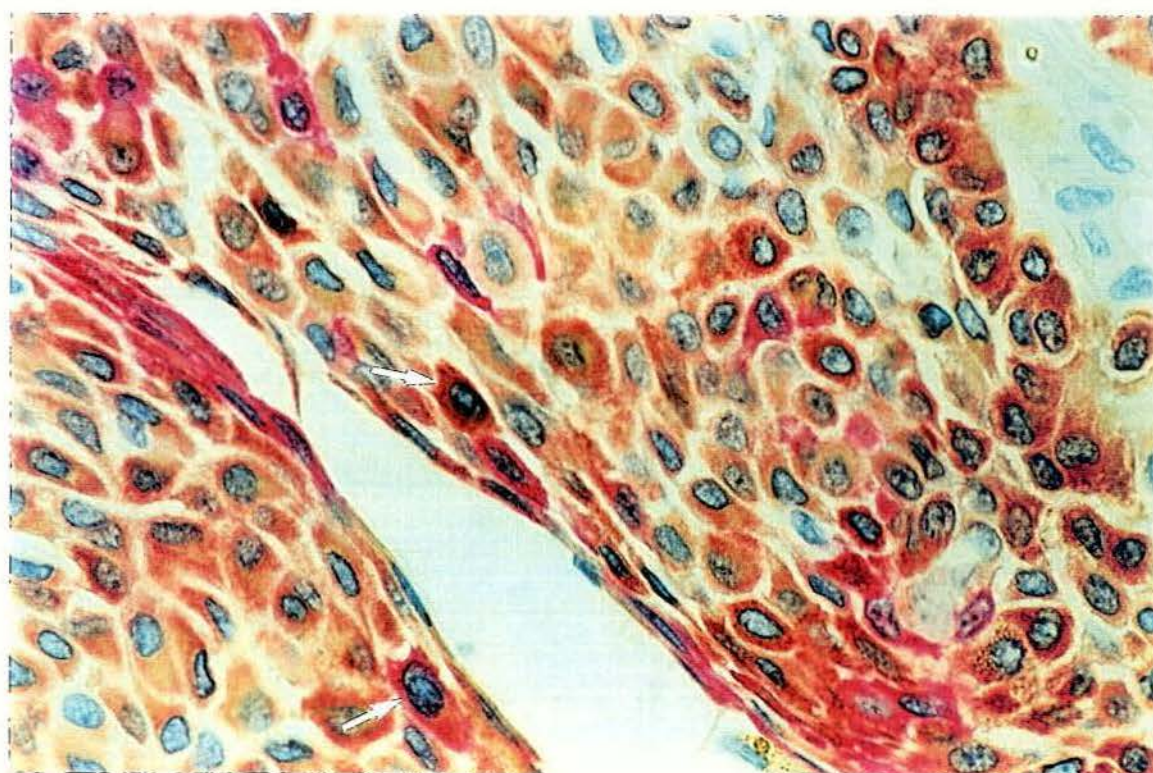


Figura 10 - Mioepitelioma. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 7 e CK 14 em algumas células plasmocitóides (setas) e expressão de CK 14 em outras. 630x.

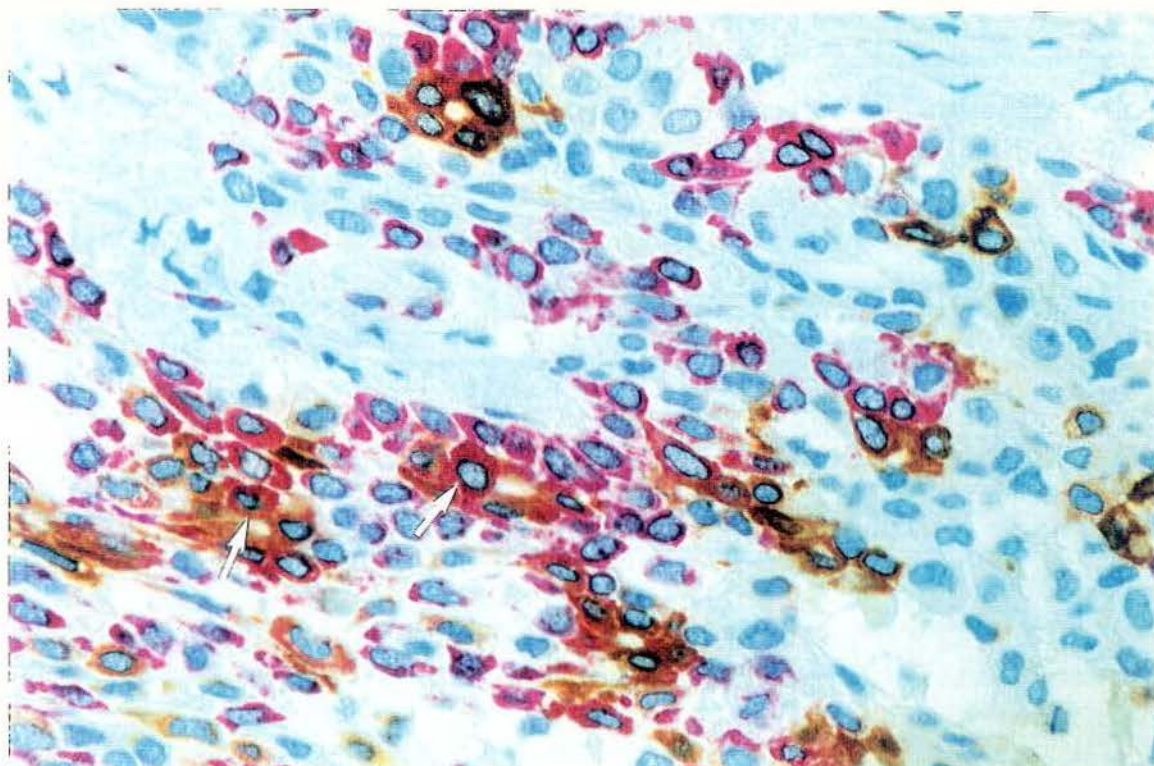


Figura 11 - Mioepitelioma. CK 19 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 19 e CK 14 em algumas células (setas) e expressão isolada de CK 19 ou CK 14 em outras. 400x.

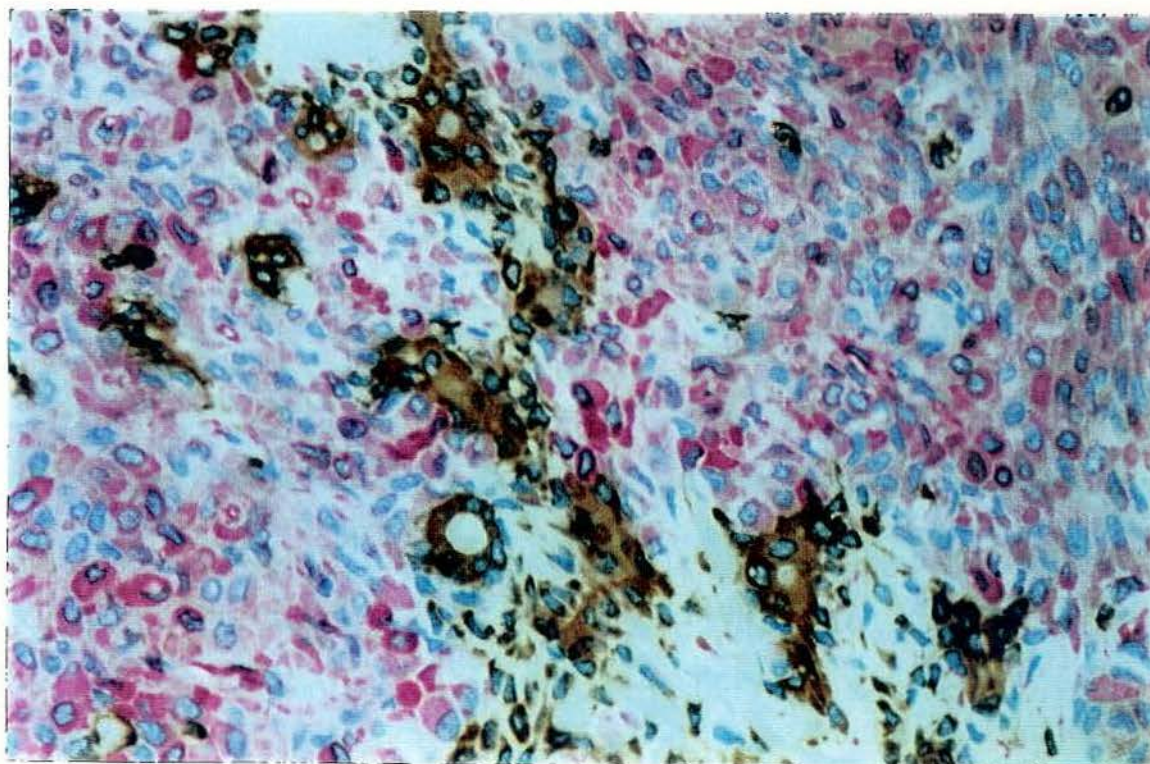


Figura 12 - Mioepitelioma. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de CK 14 em células luminiais e de vimentina em células plasmocitóides. 400x.

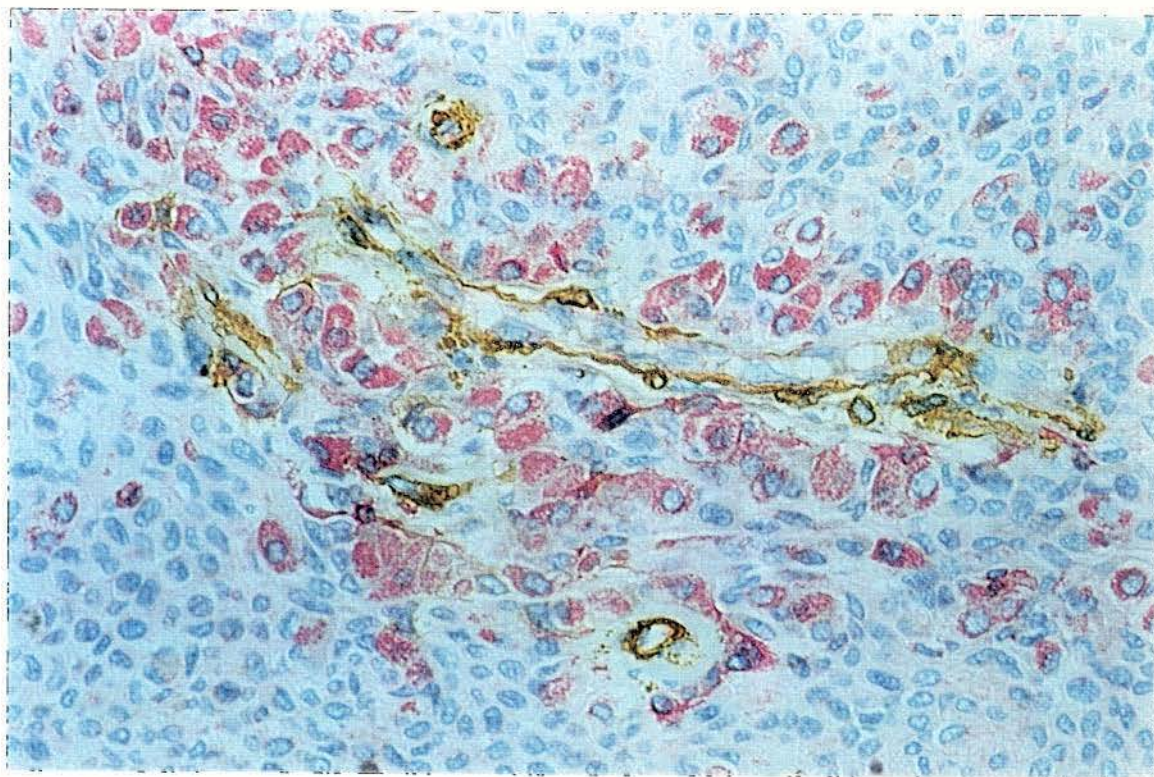


Figura 13 - Mioepitelioma. Actina (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de CK 14 em grupos de células plasmocitóides e de actina em paredes vasculares. 400x.

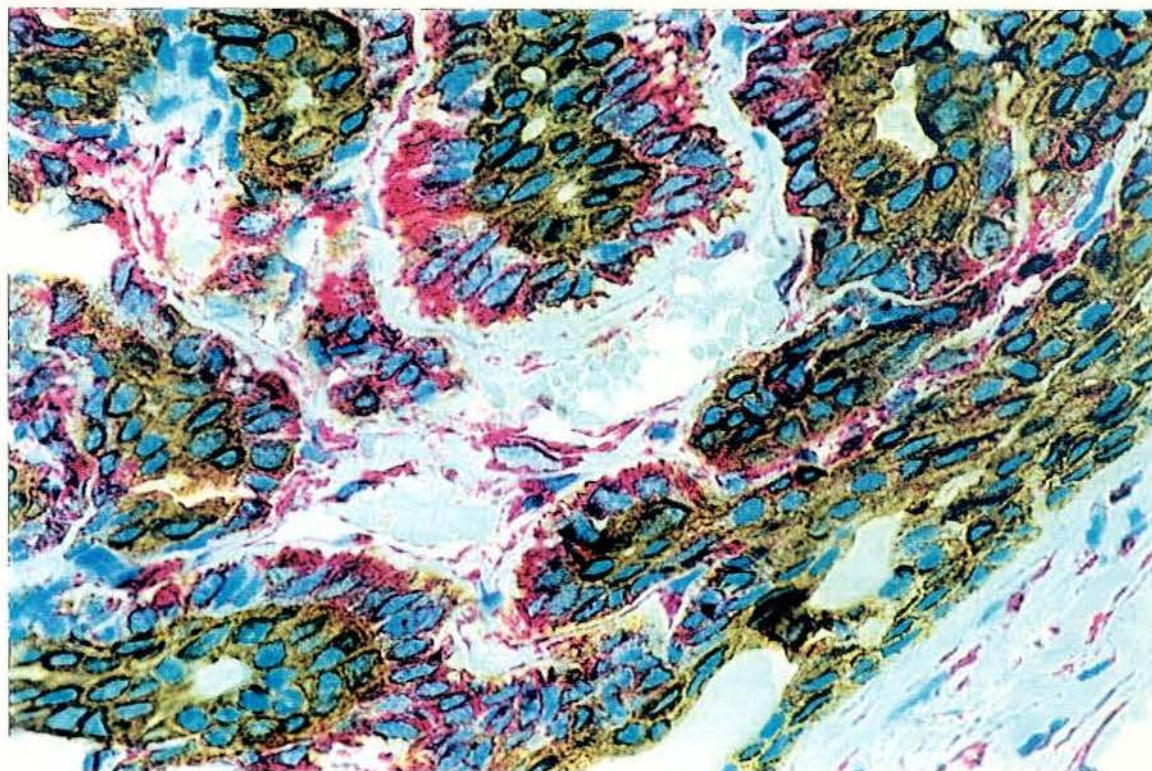


Figura 14 - Adenoma de células basais, tipo túbulo-trabecular. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de CK 14 nas células tubulares luminais e de vimentina nas externas. 630x.

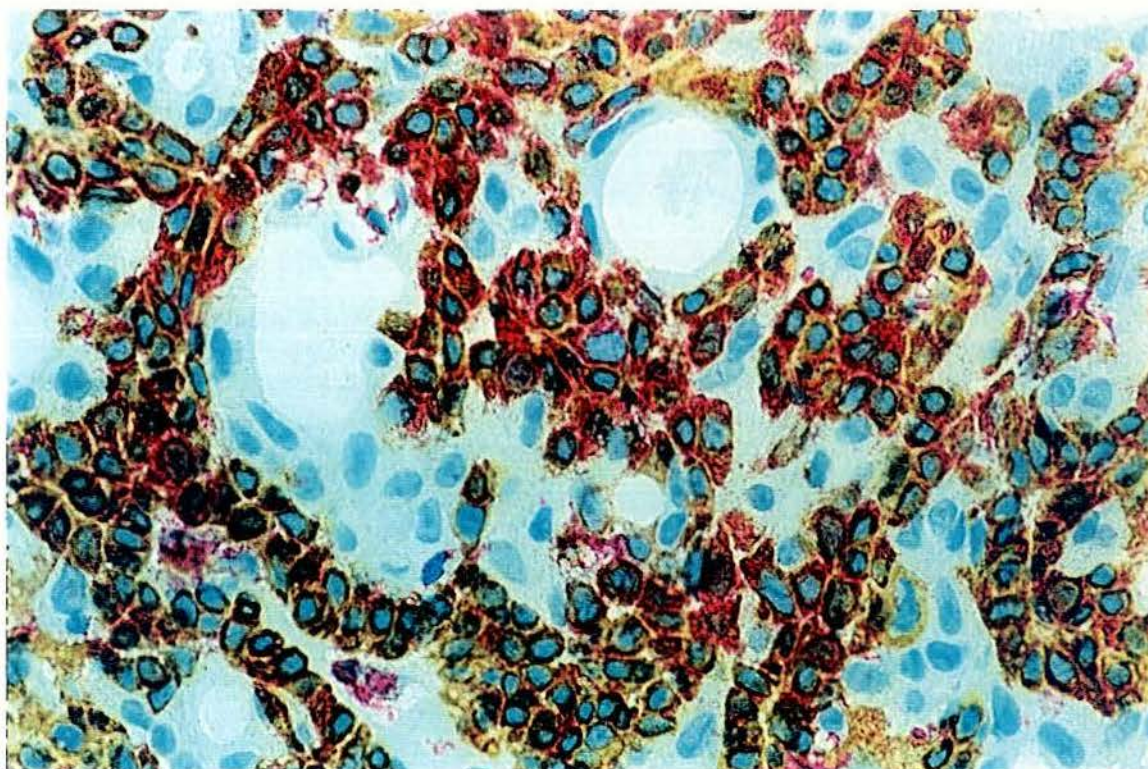


Figura 15 - Adenoma de células basais, tipo tubular. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Co-expressão de CK 14 e vimentina nas células tubulares externas. Células luminais negativas. 630x.

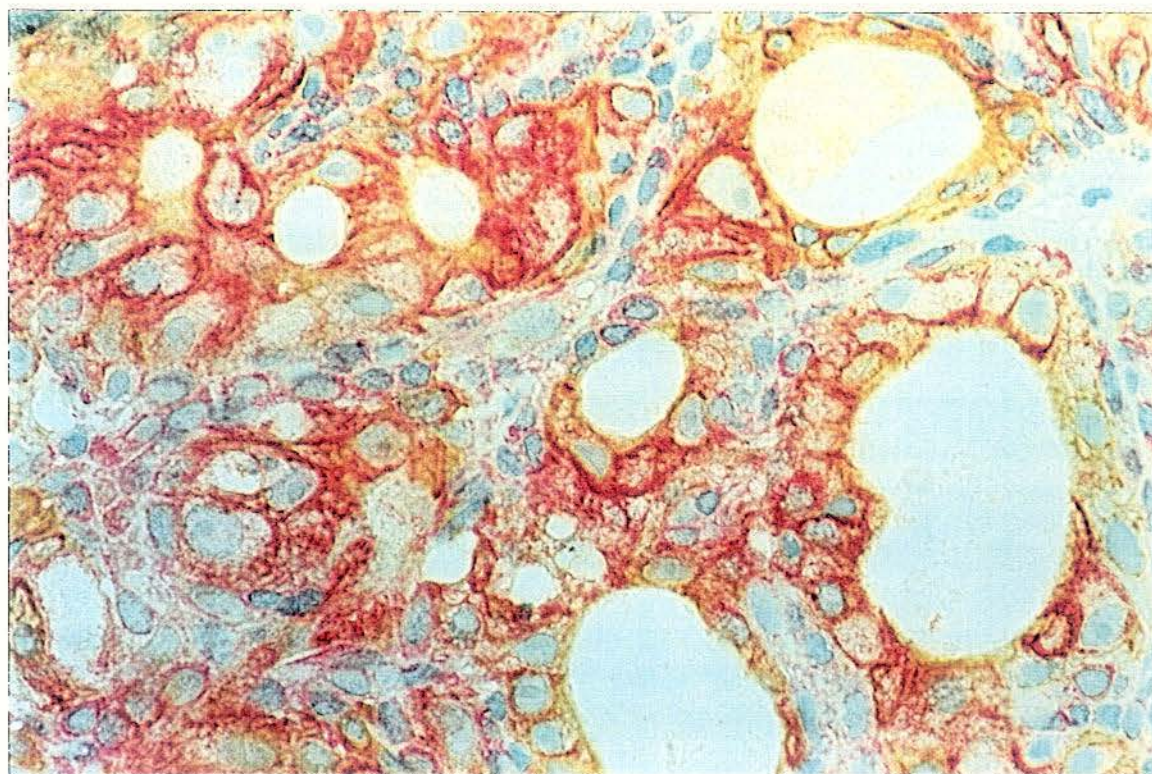


Figura 16 - Adenoma de células basais, tipo tubular. Co-expressão de CK 7 e CK 14 nas células luminais e discreta expressão de CK 14 nas externas. 630x.

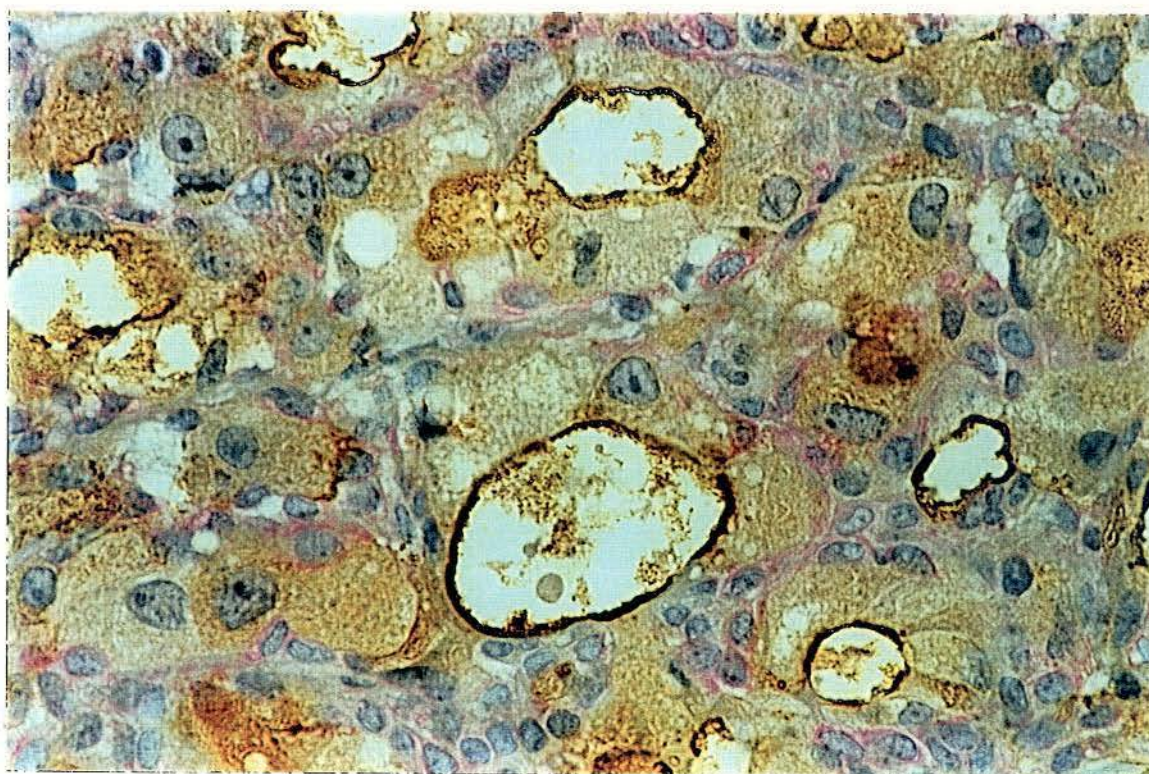


Figura 17 - Adenoma de células basais, tipo tubular. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de EMA nas células tubulares luminais e discreta expressão de CK 14 nas externas. 630x.

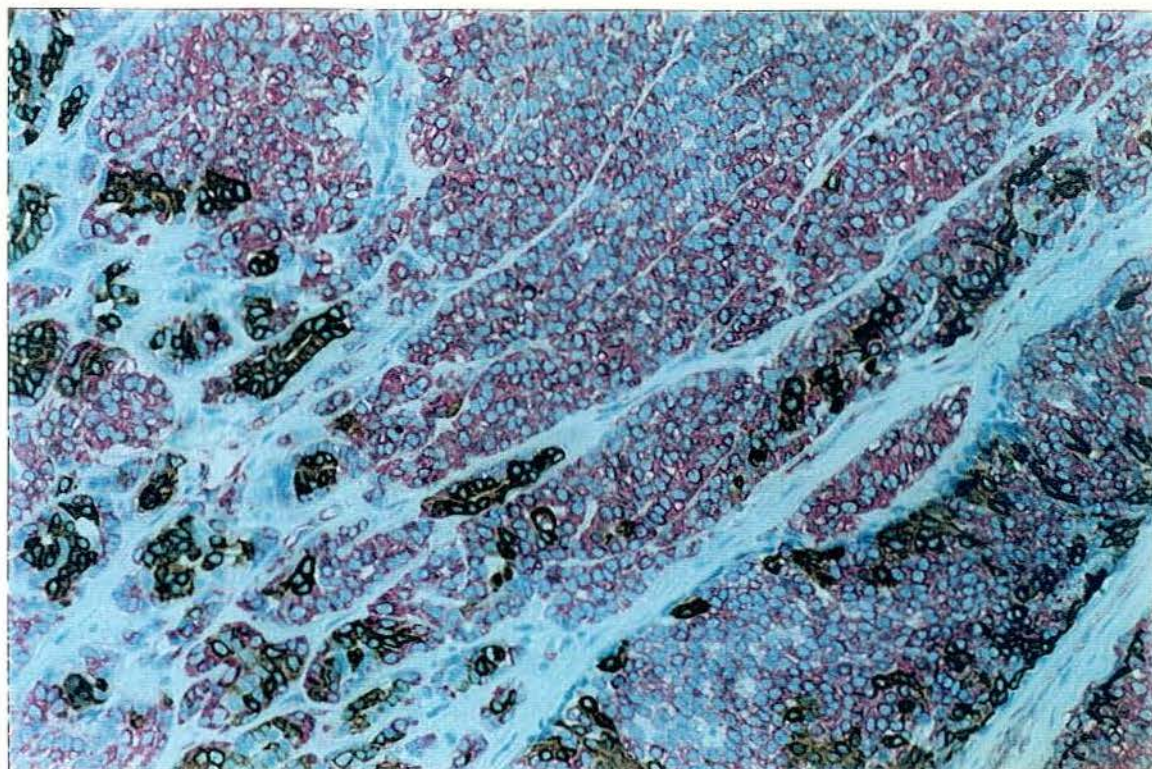


Figura 18 - Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (APBGM). CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de vimentina em massas celulares sólidas e expressão de CK 14 em grupos celulares menores e células luminiais. 200x.

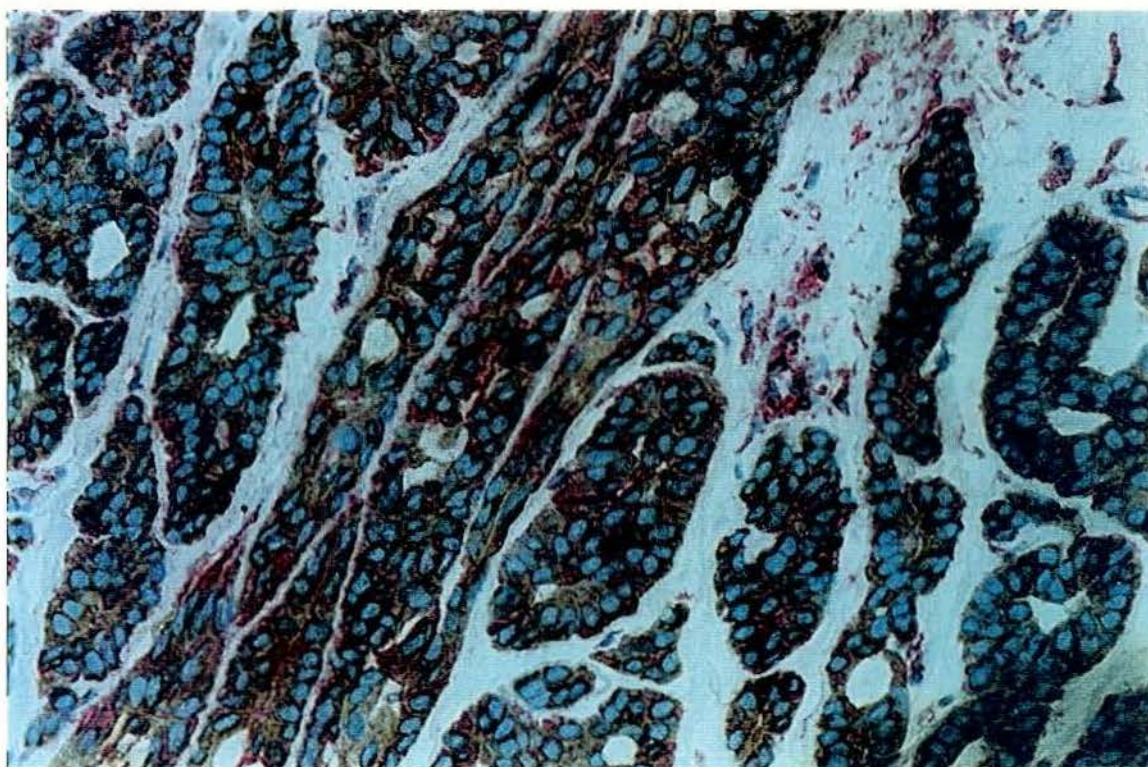


Figura 19 - APBGM. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Co-expressão de CK 14 e vimentina em áreas trabeculares. 400x.

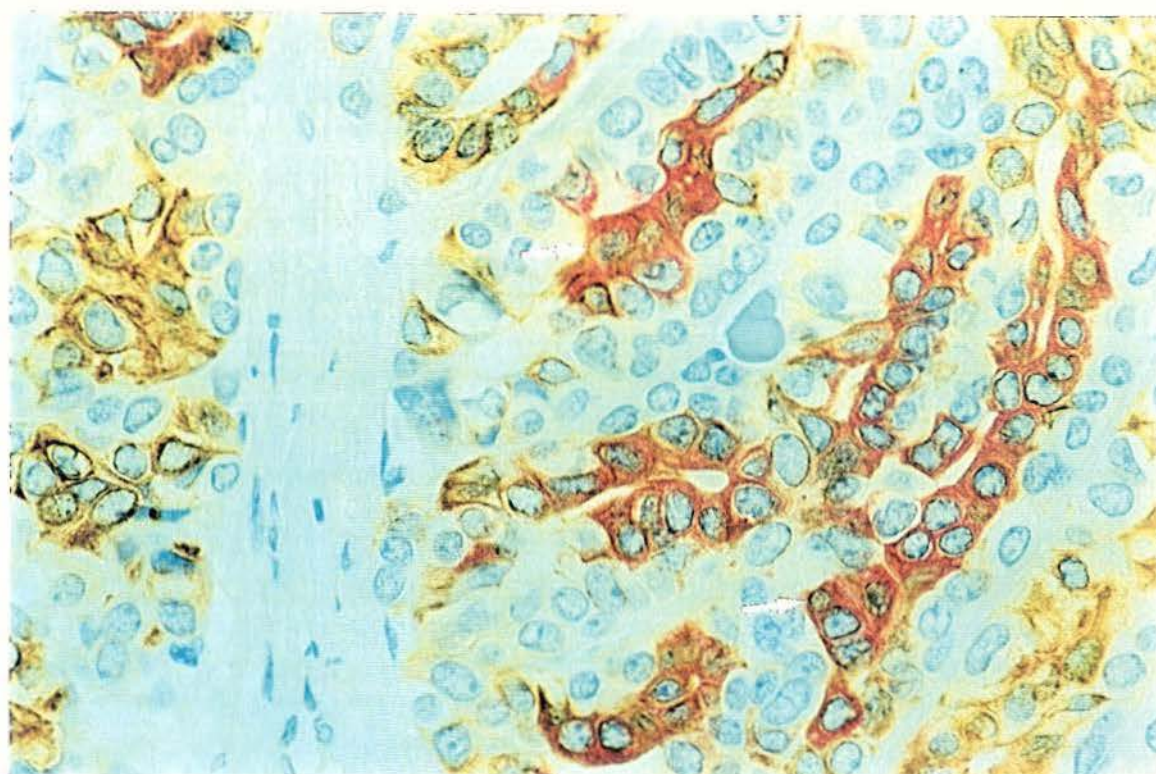


Figura 20 - APBGM. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 7 e CK 14 em alguns grupos de células tumorais (setas) e expressão de CK 7 em outros. 630x.

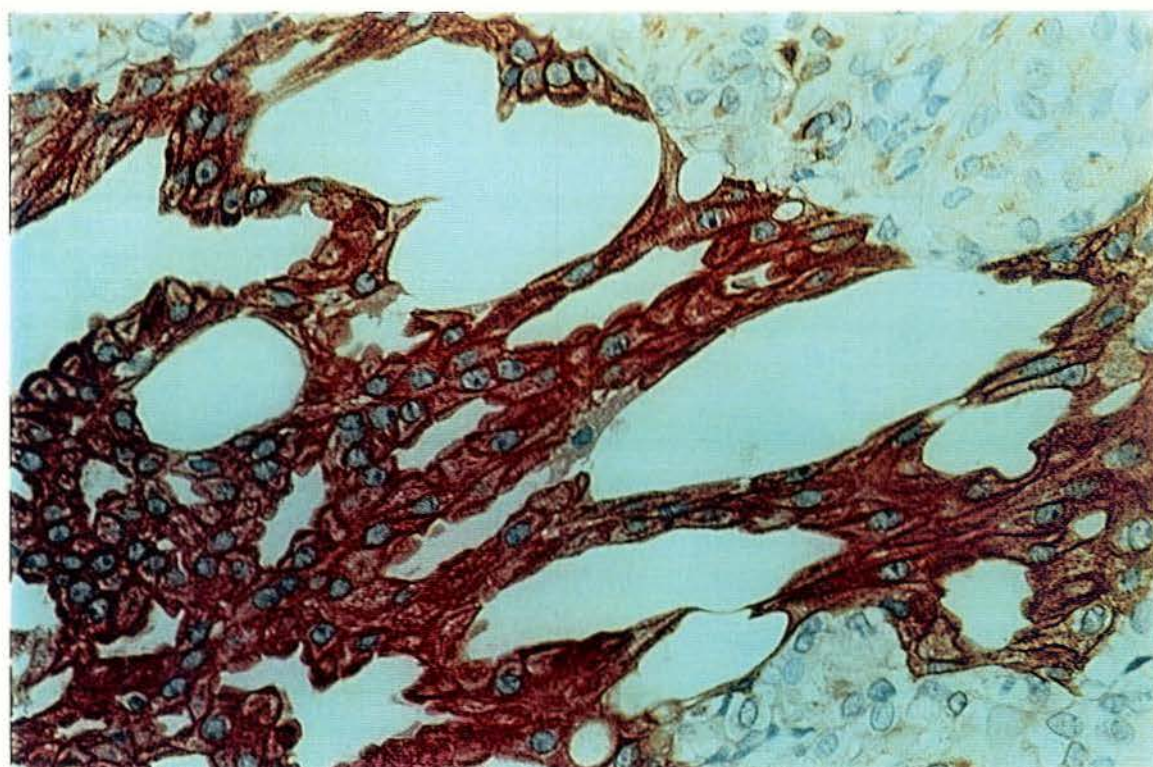


Figura 21 - APBGM. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 7 e CK 14 em células tumorais de áreas papilíferas. 400x.

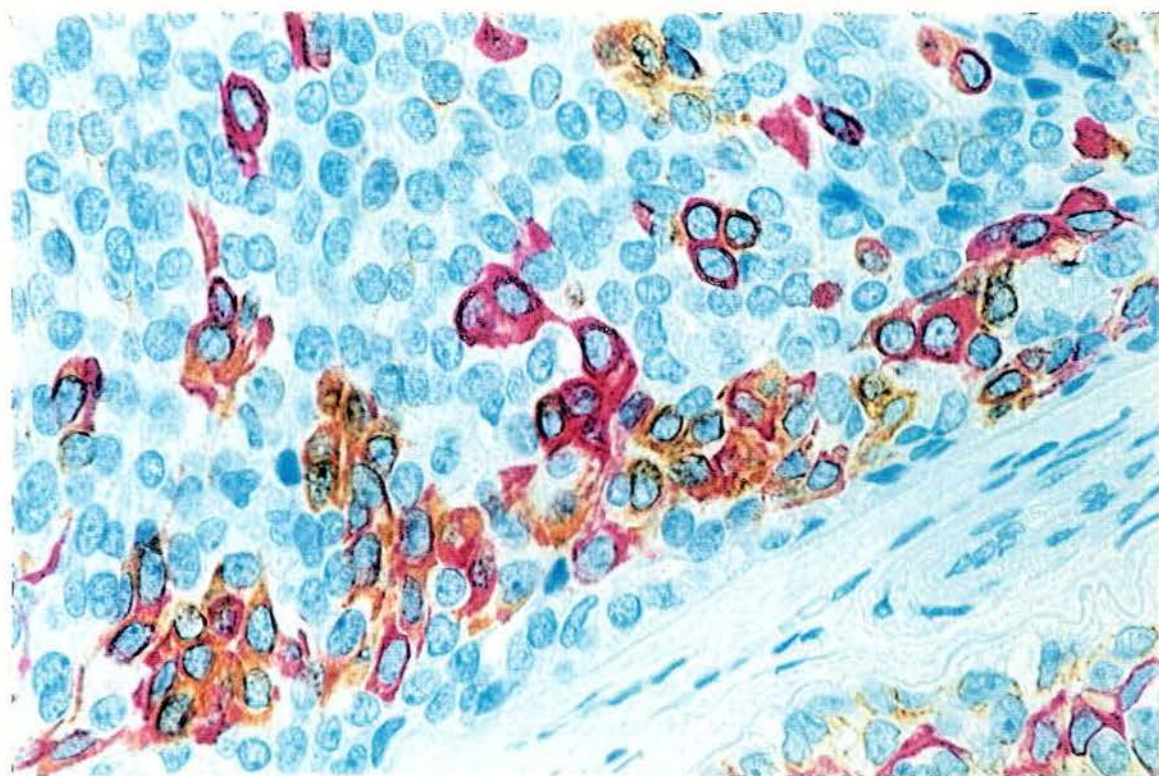


Figura 22 - APBGM. CK 8 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 8 e CK 14 em grupos de células tumorais de áreas sólidas. 630x.

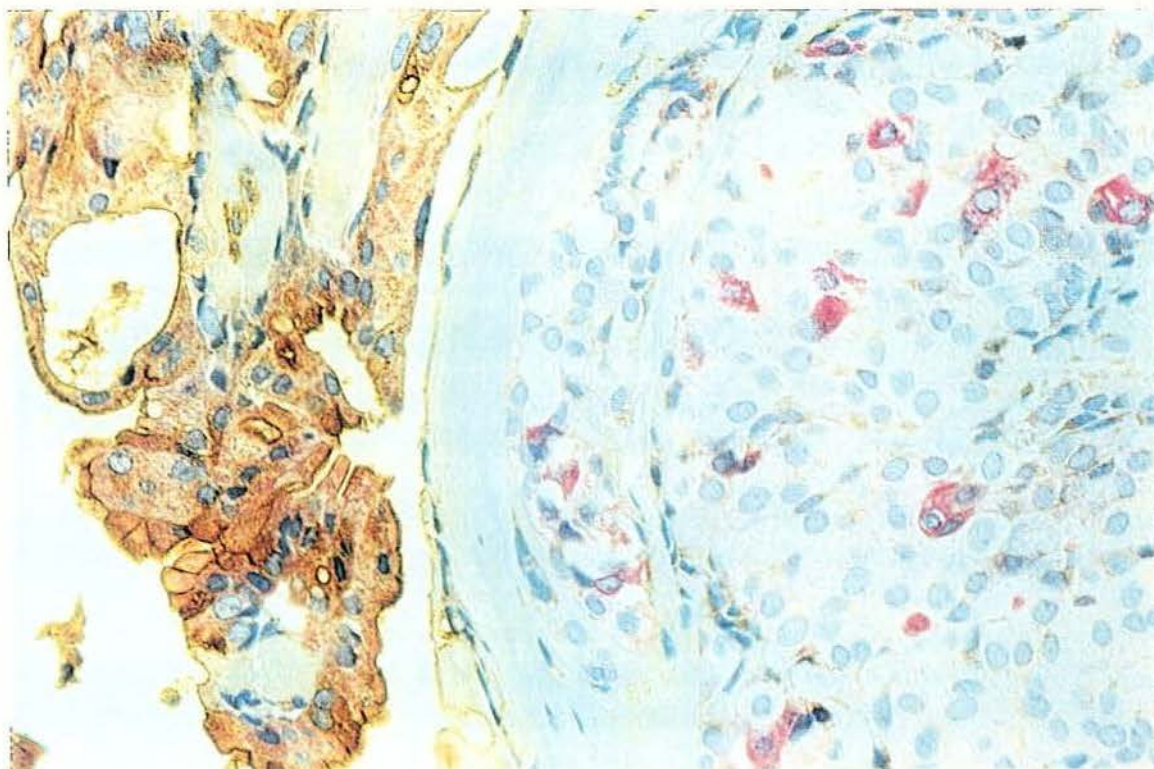


Figura 23 - APBGM. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). À esquerda expressão de EMA em células mucosas e à direita expressão de CK 14 em algumas células tumorais. 400x.

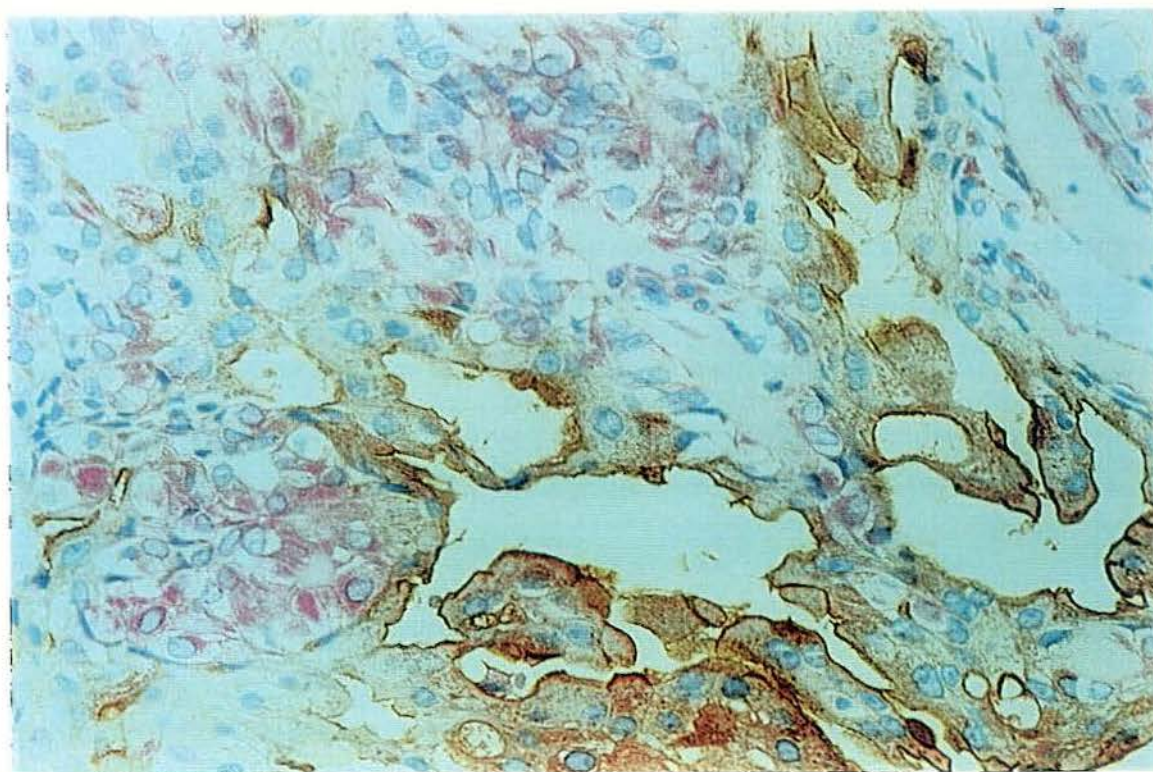


Figura 24 - APBGM. EMA (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de EMA em células mucosas e discreta expressão de vimentina nas demais células tumorais. 400x.

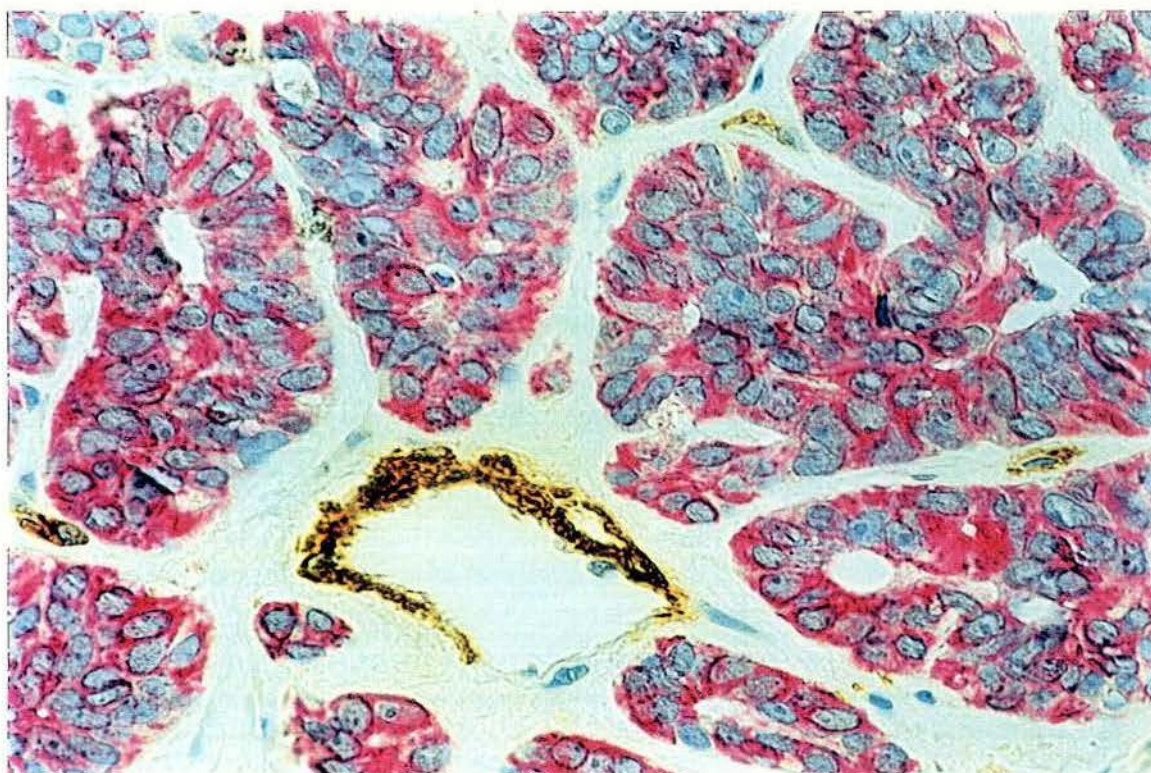


Figura 25 - APBGM. Actina (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de CK14 nas células tumorais e de actina em paredes vasculares. 630x.

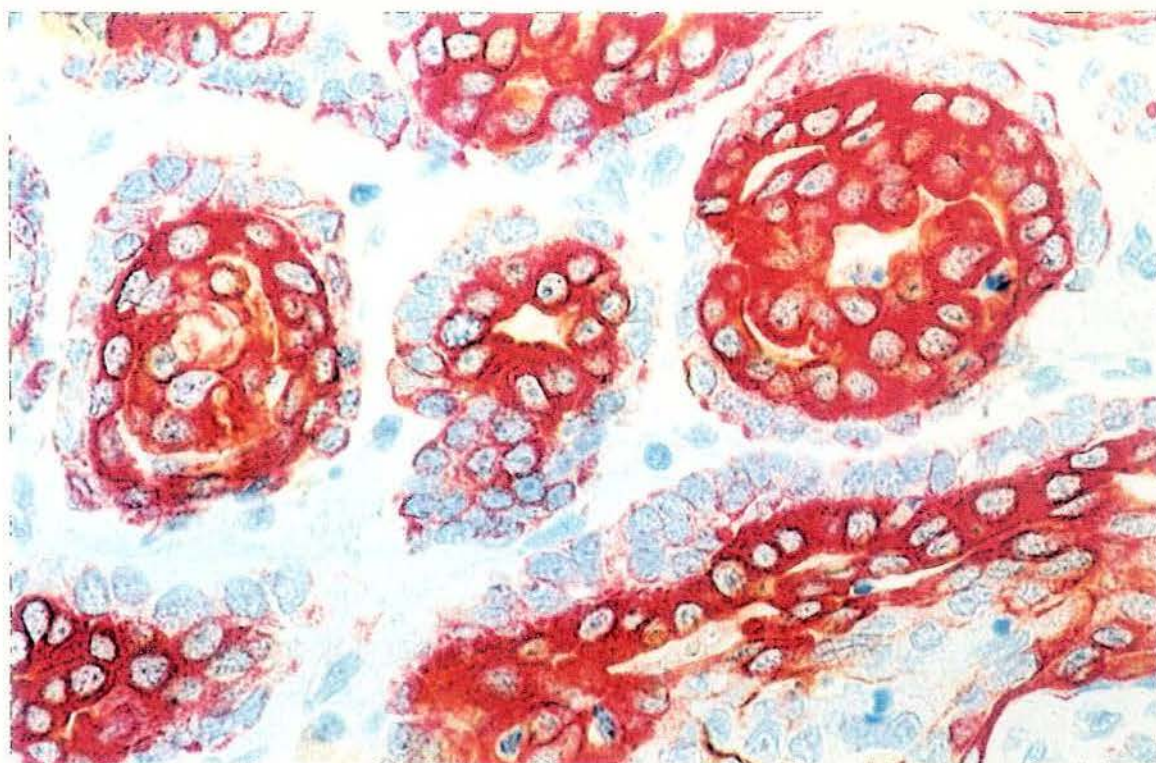


Figura 26 - Carcinoma adenóide cístico (CAC), tipo tubular. CK 7 (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de CK 7 e CK 14 nas células luminais e discreta expressão de CK 14 nas externas. 630x.

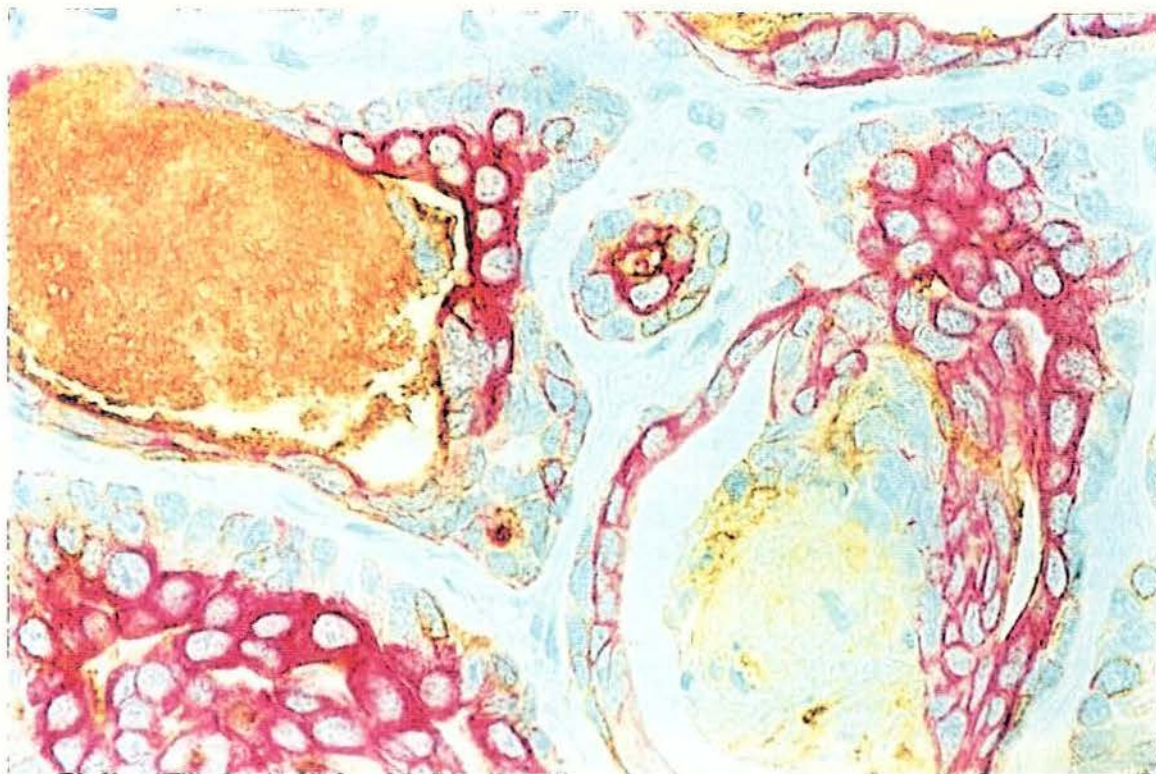


Figura 27 - CAC, tipo tubular. EMA (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Co-expressão de EMA e CK 14 em células luminais. 630x.

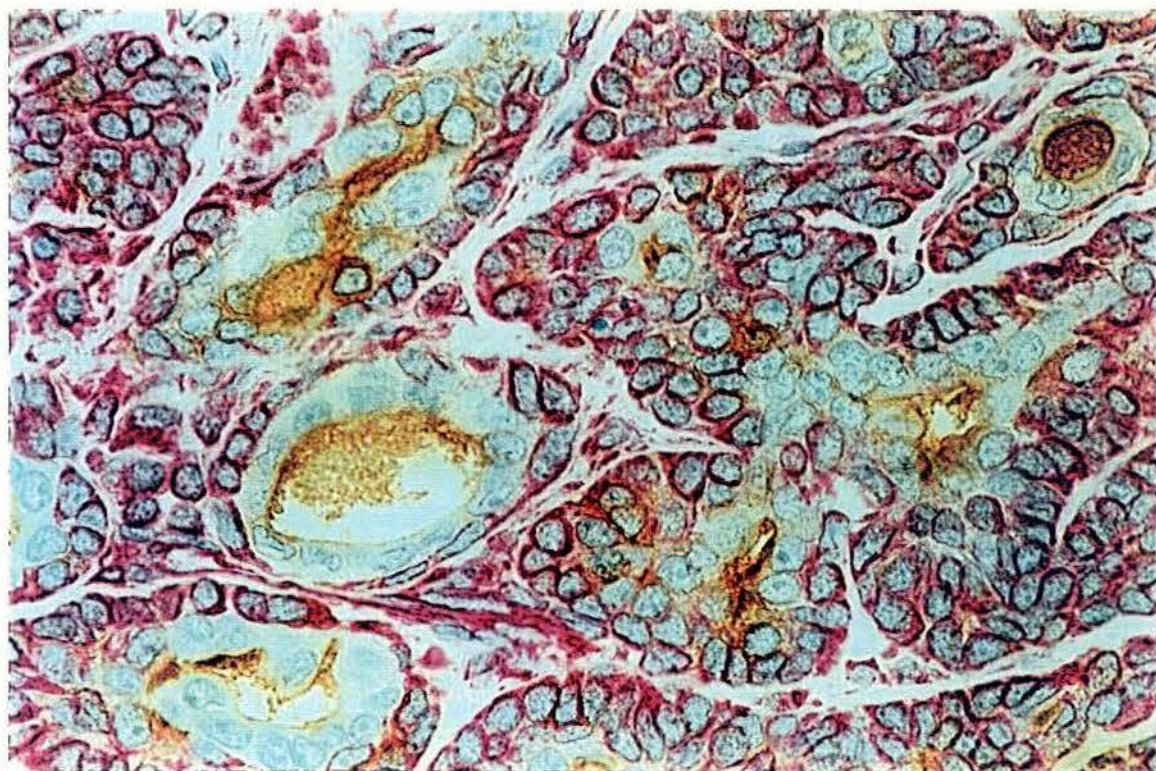


Figura 28 - CAC, tipo tubular. EMA (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de EMA nas células luminais e de vimentina nas externas. 630x.

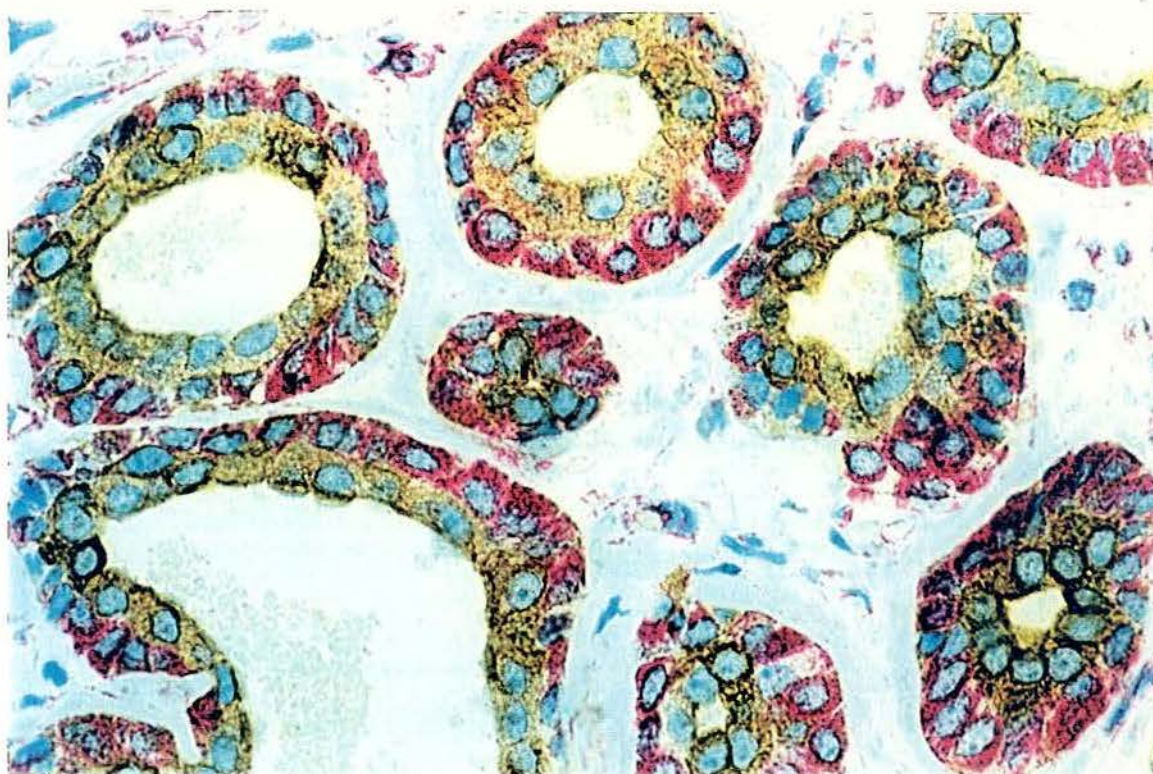


Figura 29 - CAC, tipo tubular. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de CK 14 nas células luminais e de vimentina nas externas. 630x.

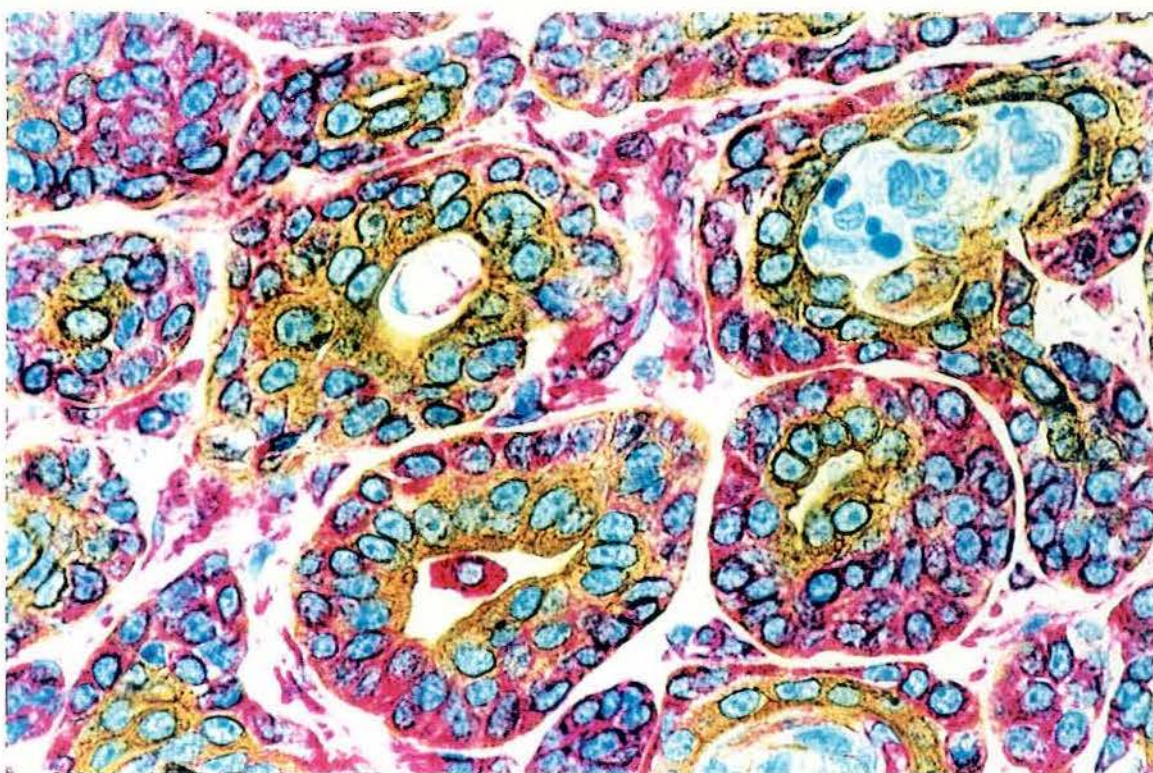


Figura 30 - CAC, tipo tubular. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de CK 14 nas células luminais e expressão de vimentina nas externas, com discreta co-expressão em algumas células externas. 630x.

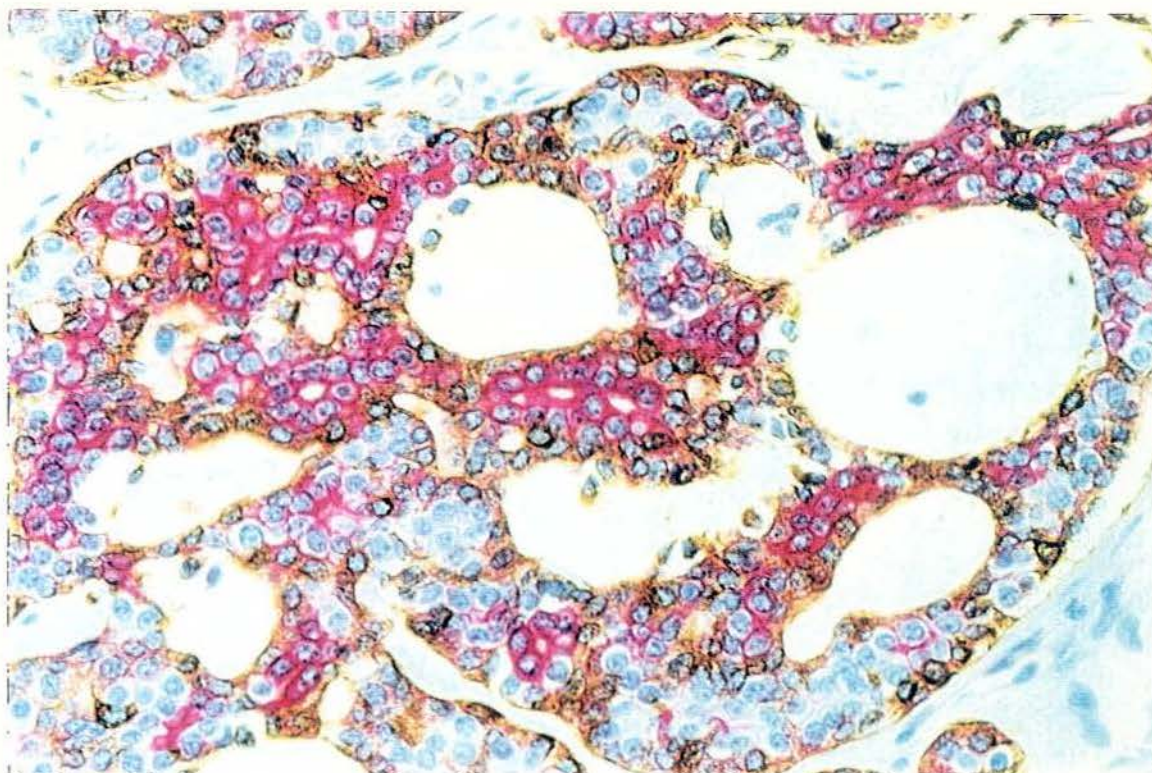


Figura 31 - CAC, tipo cribriforme. Actina (diaminobenzidina) x CK 14 (fast red). Expressão de CK 14 nas células ductais luminais e expressão de actina nas células que revestem os pseudo-cistos e periféricas dos cilindros. 400x.

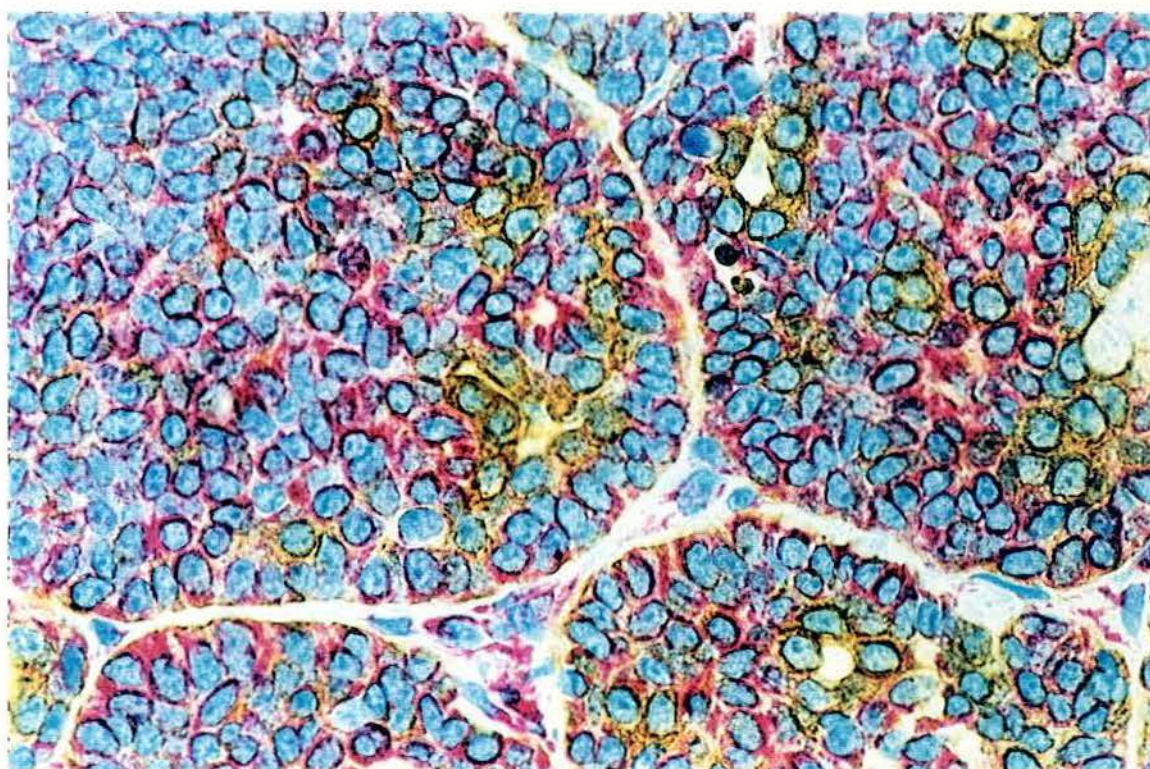


Figura 32 - CAC, área sólida. CK 14 (diaminobenzidina) x vimentina (fast red). Expressão de vimentina na maioria das células tumorais e expressão de CK 14 em algumas células, principalmente luminais. 630x.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisados tumores de glândulas salivares que embora apresentem comportamento biológico variado, têm em comum a provável histogênese a partir da célula de reserva do ducto intercalar (Batsakis⁵, 1980; Eversole³⁷, 1971).

Neste estudo optou-se pela técnica imuno-histoquímica da dupla marcação, para se verificar se a expressão dos diversos filamentos nas células neoplásicas ocorre independentemente ou não, buscando dessa forma contribuir para o entendimento da célula tumoral.

Com relação à metodologia empregada, a técnica de recuperação de antígenos descrita por Shi et al.⁸⁷ em 1991, utilizando irradiação por microondas, produz resultados comparáveis à digestão proteolítica e em muitos casos até superiores a esta, mesmo para anticorpos para os quais não é requerida a digestão enzimática (Norton⁷⁴, 1993). No presente estudo foram utilizados cinco tumores fixados em metacarn, fixador que impede a perda de sensibilidade da reação imuno-histoquímica, provocada pelos fixadores aldeídicos (Zarbo et al.⁹⁹, 1991). Nesses tumores fixados em metacarn não foi feita a irradiação por microondas, com o objetivo de comparar os resultados com aqueles obtidos com os tumores tratados em forno de microondas. Observou-se que, embora a marcação tenha sido ligeiramente mais intensa no material fixado em metacarn, conforme havia observado anteriormente Sousa⁸⁹ (1994), não houve diferença expressiva com relação aos cortes tratados em microondas.

Alguns dos tumores estudados exibem muitas vezes um padrão glandular, com presença de estruturas ductais formadas por duas camadas de células, sendo uma interna ou luminal e outra externa. Esse padrão morfológico mimetiza o ducto intercalar, confirmando a origem

histogenética desses tumores. Tal aspecto pode ser observado no adenoma pleomórfico, adenoma de células basais tubular e túbulo-trabecular e carcinoma adenóide cístico.

No grupo de tumores estudados, mostram um padrão morfológico diferente, por não apresentarem organização glandular específica, o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade e o adenoma de células basais do tipo sólido.

Analisando a co-expressão de filamentos intermediários, mais a actina e o antígeno epitelial de membrana, os resultados mostram que tanto as células de linhagem mioepitelial, como as lumbais dos tumores com arranjo glandular e as células dos tumores que não formam padrão glandular, apresentam um perfil imunohistoquímico definido, com algumas pequenas variações.

Nos tumores que formam estruturas glandulares, observou-se que as células ductais lumbais expressaram as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 e eventualmente co-expressaram a CK 14. Algumas estruturas ductais, especialmente aquelas com conteúdo secretório, mostraram expressão do antígeno epitelial de membrana (EMA) e eventualmente a co-expressão da CK 14.

Por outro lado, as células ductais externas, expressaram a vimentina, e co-expressaram actina e/ou CK 14. Em nenhum momento essas células expressaram as citoqueratinas 7, 8, 18, 19 ou o antígeno epitelial de membrana. Além de estruturas glandulares, em alguns tumores, como no adenoma pleomórfico e no mioepitelioma, as células de linhagem mioepitelial apresentaram-se com fenótipo plasmocitóide expressando vimentina, sendo não uniformemente positivas para as citoqueratinas 7, 8 e 18 e co-expressando eventualmente a CK 14. As células mioepiteliais exibiram ainda fenótipo fusiforme, co-expressando vimentina e actina ou foram poligonais ou cúbicas, co-expressando vimentina, citoqueratina 14 e, eventualmente, actina.

Há que se ressaltar que o mioepitelioma raramente apresenta estruturas ductais. Esse tumor é constituído em geral por células plasmocitóides ou fusiformes, com o perfil descrito acima.

Nos tumores que não apresentam organização glandular, observaram-se células ovaladas formando arranjos celulares sólidos, expressando vimentina e as citoqueratinas 7, 8 e 18, com co-expressão eventual da citoqueratina 14, e células formando ductos de uma camada, expressando vimentina, citoqueratinas 7, 8, 18 e, eventualmente co-expressando a CK 14. No adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, observaram-se ainda células com citoplasma amplo e granuloso e outras com aspecto mucoso ou oncocítico, expressando as citoqueratinas 7, 8 e 18, porém, não a citoqueratina 14 e a vimentina. As células de aspecto mucoso ou oncocítico co-expressam o antígeno epitelial de membrana. As células granulosas, mucosas e oncocíticas parecem corresponder às células granulosas descritas por Tandler⁹¹,1993, na junção entre ducto intercalar e ácino, com características intermediárias entre células próprias do ducto intercalar e células acinares.

Tem sido demonstrado que a célula mioepitelial neoplásica raramente reproduz as características fenotípicas observadas na glândula normal, seja do ponto de vista morfológico, seja na expressão de determinados antígenos. Enquanto a célula mioepitelial normal é basicamente uma célula estrelária, com prolongamentos longos e delicados que envolvem as células glandulares vizinhas (Hubner et al.⁵⁵,1971; Regesi & Batsakis⁸¹,1977) nas neoplasias essa célula apresenta morfologia variável, com elementos fusiformes, estrelários, poligonais, plasmocitóides e hialinos (Batsakis et al⁶, 1983; Dardick & Van Nostrand²³, 1985; Dardick et al²⁸, 1983). Ao microscópio eletrônico, a célula mioepitelial tumoral deixa de exibir a totalidade dos aspectos que a caracterizam como célula mioepitelial da glândula normal, ou seja,

miofilamentos, vesículas de micropinocitose, hemidesmosomas e membrana basal (Dardick et al.²⁸, 1983), apresentando por vezes alguns vestígios destes componentes, o que permite sua caracterização sub-celular como célula mioepitelial (Dardick et al.²⁸, 1983; Sousa⁸⁸ 1990).

À análise imuno-histoquímica, a célula mioepitelial da glândula normal apresenta filamento de actina (Araújo et al.³, 1994; Chen et al.¹⁷, 1988; Dardick et al.³², 1992; Draeger et al.³⁴, 1991; Gugliotta et al.⁴⁴, 1988; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Takai et al.⁹⁰, 1995; Tsukada et al.^{92,93}, 1987; Zarbo et al.⁹⁹, 1991) e citoqueratina 14 (Araújo & Sousa², 1996; Burns et al.¹⁰, 1988; Dardick et al.²⁹, 1987; Dardick et al.³¹, 1991; Draeger et al.³⁴, 1991; Sousa⁸⁹, 1994; Takai et al.⁹⁰, 1995) e é negativa para vimentina (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Burns et al.¹⁰, 1988; Draeger et al.³⁴, 1991; Geiger et al.⁴³, 1987; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Takai et al.⁹⁰, 1995), a qual foi descrita, porém, em células triangulares basais dos ductos periféricos de glândulas salivares em formação, em fetos (anticorpo Vim 9), ou em células mioepiteliais e células triangulares basais de ductos estriados e excretoras em glândulas adultas (anticorpo Vim 24) (Gustafsson et al.⁴⁸, 1988). Não obstante, a célula mioepitelial neoplásica é positiva para vimentina, conforme demonstrado por diversos autores (Araújo & Araújo¹, 1990; Araújo et al.³, 1994; Burns et al.¹⁰, 1988; Caselitz et al.¹⁴, 1981; Caselitz et al.¹⁵, 1982; Dardick²², 1995; Erlandson et al.³⁶, 1984; Gustafsson et al.⁴⁷, 1989; Leoncini et al.⁶¹, 1988; Morinaga et al.⁶⁷, 1987; Takai et al.⁹⁰, 1995).

O anticorpo anti-actina HHF 35 reconhece isótipos de actina presentes em células contráteis, como as musculares cardíacas, esqueléticas e lisas e células mioepiteliais de glândulas salivares (Tsukada et al.⁹³, 1987). A presença de actina nas células mioepiteliais localizadas na periferia dos ácinos e ductos intercalares das glândulas salivares parece estar relacionada com o papel funcional de contração

dessas células, a fim de facilitar a eliminação da secreção das células acinares ou ductais luminais (Draeger et al.³⁴, 1991).

Nos tumores de glândulas salivares nos quais há reconhecidamente participação mioepitelial, tem sido observada a presença de actina, detectada pelo anticorpo HHF 35, embora de maneira não uniforme (Araújo et al.³, 1994; Chen et al.¹⁷, 1988; Dardick et al.³², 1992; Takai et al.⁹⁰, 1995; Tsukada et al.⁹³, 1987; Zarbo et al.⁹⁹, 1991).

A expressão de CK 14 nas células basais das estruturas ductais confere às mesmas uma rede de filamentos firme e elástica, que indicaria uma função de sustentação e de proteção com relação às células luminais mais frágeis (Draeger et al.³⁴, 1991). Na epiderme, a presença das citoqueratinas 14 e 5 e de proteínas que fazem a ligação entre os filamentos intermediários e outros elementos do citoesqueleto, é fundamental para a ancoragem das células basais. A ausência da citoqueratina 14, por mutação genética, leva à formação de bolhas, por perda de ancoragem da célula basal (Fuchs & Cleveland⁴¹, 1998). Paralelamente, Domingues* constatou que em fetos humanos as células do epitélio bucal ao migrarem para formar a glândula salivar, não apresentam a citoqueratina 14, nem mesmo na camada basal. A citoqueratina 14 parece, pois, expressar-se nas células quando as mesmas necessitam ancorar-se ao tecido conjuntivo circundante, o que provavelmente ocorre após a morfodiferenciação glandular.

A CK 14 tem sido observada em diversas neoplasias de glândulas salivares em que participam células mioepiteliais. Sua presença foi verificada tanto em células luminais como em células

* Domingues, M.G. (Faculdade de Odontologia, USP - São Paulo). Comunicação pessoal, 1998.

externas de estruturas ductais desses tumores e de maneira não uniforme, nas células mioepiteliais modificadas do adenoma pleomórfico e mioepitelioma (Araújo & Souza², 1996; Burns et al.¹⁰, 1988; Dadick et al.³⁰, 1989; Draeger et al.³⁴, 1991; Figueiredo³⁹, 1995; Sousa⁸⁹, 1994; Takai et al.⁹⁰, 1995).

Diante da variação de aspectos apresentados pela célula mioepitelial nas neoplasias glandulares, Araújo et al.³ (1994) e Dardick²² (1995) enfatizam a inadequação de se usar marcadores “absolutos” de células mioepiteliais em glândulas salivares normais como critério diagnóstico para alguns tumores dessas glândulas, dos quais participam células mioepiteliais.

Nossos resultados mostraram que, mesmo sendo positivas para vimentina, um dos indicadores mais precoces da diferenciação mioepitelial neoplásica (Araújo & Araújo¹, 1990), muitas células mioepiteliais presentes nos tumores de glândula salivar co-expressam vimentina com citoqueratina 14 e com actina.

A co-expressão desses dois últimos filamentos com a vimentina sugere um grau intermediário de diferenciação da célula mioepitelial, que apresenta um filamento considerado precursor de diferenciação mioepitelial (vimentina), paralelamente a outros dois (actina e citoqueratina 14), característicos da diferenciação mioepitelial completa, observada na glândula normal.

Embora presentes na célula mioepitelial da glândula normal, nas neoplasias a expressão da actina e da citoqueratina 14, quando ocorre, parece ser independente. Assim, células poligonais e plasmocitóides eventualmente co-expressam vimentina e citoqueratina 14, porém, não actina. Por outro lado, as células fusiformes, em geral co-expressam vimentina e actina e são negativas para a CK 14.

Nas demais células neoplásicas observadas, cuja positividade para vimentina indica uma natureza mioepitelial, observa-se co-expressão não uniforme de actina e/ou citoqueratina 14.

No adenoma de células basais tubular e, por vezes, no adenoma pleomórfico e no carcinoma adenóide cístico tubular, observamos ductos bem definidos, formados por dupla camada, cujas células luminais e conteúdo secretório são positivos para o antígeno epitelial de membrana (EMA). EMA é a designação de uma glicoproteína isolada a partir das membranas dos glóbulos gordurosos do leite. Sua expressão nos tumores de glândula salivar indica diferenciação epitelial luminal, muitas vezes associada com presença de secreção intra-luminal (Azumi & Battifora⁴, 1987; Bergman et al.⁷, 1991; Caselitz et al.¹³, 1986; Caselitz et al.¹⁷, 1988; Ferreiro³⁸, 1994; Günhan et al.⁴⁵, 1992; Gusterson et al.⁴⁹, 1982; Kahn et al.⁵⁸, 1985; Norberg et al.⁷¹, 1991; Williams et al.⁹⁷, 1993). A pesquisa de EMA constitui um instrumento útil para a investigação da histogênese e heterogeneidade desses tumores, apresentando também valor diagnóstico em adenomas pleomórficos constituídos predominantemente por células fusiformes e na variante sólida do carcinoma adenóide cístico (Gusterson et al.⁴⁹, 1982). Achados semelhantes aos nossos, com relação ao antígeno epitelial de membrana, foram relatados no adenoma pleomórfico (Günhan et al.⁴⁵, 1992; Gusterson et al.⁴⁹, 1982; Kahn et al.⁵⁸, 1985), em adenomas de células basais do tipo tubular (Günhan et al.⁴⁵, 1992; Gusterson⁴⁹, 1982; Kahn et al.⁵⁸, 1985) e em carcinomas adenóide císticos (Azumi & Battifora⁴, 1987; Bergman et al.⁷, 1991; Caselitz et al.¹³, 1986; Chen et al.¹⁷, 1988; Günhan et al.⁴⁵, 1992; Kahn et al.⁵⁸, 1985). Nossos resultados mostraram que nos ductos cujas células luminais são positivas para EMA, a célula externa co-expressa mais comumente vimentina com actina e com citoqueratina 14 do que em outros, cujas células luminais são positivas para citoqueratina 14 e negativas para EMA. Nestes últimos,

observados no adenoma de células basais túbulo-trabecular, no adenoma pleomórfico e no carcinoma adenóide cístico, a célula ductal externa é positiva para vimentina e mais raramente co-expressa vimentina e actina ou vimentina e citoqueratina 14. Essas observações parecem indicar que a co-expressão dos três filamentos - vimentina, citoqueratina 14 e actina em estruturas ductais, é mais comum quando a célula externa está em contato com células luminais mais diferenciadas. Estas teriam características secretórias, como a marcação mais intensa para o antígeno epitelial de membrana no pólo apical e no conteúdo secretório intra-luminal.

Araújo & Sousa² (1996) sugerem que uma diferenciação mioepitelial completa deve estar correlacionada com funções secretórias e excretórias. Nossos achados confirmam esta sugestão, embora a célula ductal externa ainda co-exprese vimentina, demonstrando um perfil imuno-histoquímico distinto da célula mioepitelial da glândula normal.

A co-expressão de CK 14 e actina nas células ductais externas combinaria função de ancoragem ao estroma e suporte para as células luminais, por meio de sua expressão de CK 14 (Fuchs & Cleveland⁴¹, 1998), e uma função contrátil, semelhante à da célula muscular, necessária para seu envolvimento em atividade excretora (Hubner et al.⁵⁵, 1971; Regezi & Batsakis⁸¹, 1977). Por outro lado, a co-expressão de vimentina nessas células sugere para as mesmas um papel de células precursoras (Draeger et al.³⁴, 1991), porém já com o comprometimento para diferenciação mioepitelial como demonstra a expressão de actina e CK 14.

Nos tumores em que se observa organização glandular específica, mimetizando ducto intercalar, com estruturas ductais formadas por camada interna e externa, houve a expressão das citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 nas células luminais. Devido à sua presença constante nas células luminais, a co-expressão entre elas não foi analisada.

Eventualmente as células lumbais expressam ainda a citoqueratina 14. Achados semelhantes foram observados em adenomas pleomórficos (Araújo & Sousa², 1996; Draeger et al.³⁴, 1991; Sousa⁸⁹, 1994; Takai et al.⁹⁰, 1995); carcinomas adenóide císticos (Araújo & Sousa², 1996; Figueiredo³⁹, 1995; Sousa⁸⁹, 1994) e no adenoma de células basais (Araújo & Sousa², 1996; Sousa⁸⁹, 1994). Algumas células lumbais foram positivas para o antígeno epitelial de membrana (EMA), indicando atividade secretória das mesmas. Nesse caso, as células lumbais deixam de expressar ou apresentam apenas esporadicamente a citoqueratina 14. Em nenhum dos tumores as células lumbais expressaram vimentina ou actina, por isso não foi feita a dupla marcação destas com as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19.

Em nenhum dos tumores analisados foi observada a presença das citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 nas células externas das estruturas ductais. Na maior parte das vezes essas células expressam vimentina, podendo ainda co-expressar citoqueratina 14 e actina, conforme discutido anteriormente.

Nos tumores em que não há organização glandular específica, as células apresentam características transicionais, demonstradas pela positividade às citoqueratinas 7, 8, 14 e 18, e à vimentina, provavelmente correspondendo às células transicionais descritas nos estudos com microscopia eletrônica (Carvalho et al.¹¹, 1993; Dardick & Van Nostrand²⁵, 1988; Norberg et al.⁷¹, 1991).

Nesse último grupo de tumores, as células apresentam características morfológicas e imuno-histoquímicas que indicam graus variados de diferenciação, aparentemente com comprometimento para diferenciação acinar. As menos diferenciadas são positivas para vimentina e às vezes para as citoqueratinas 7, 8, 14 e 18, outras encontram-se em estágios de maior diferenciação, não mais expressando vimentina e citoqueratina 14 e, finalmente, apresentando o antígeno

epitelial de membrana. A formação de estruturas funcionais possivelmente não ocorre devido a deficientes interações célula-célula e célula-matriz extra-celular. Em cultura primária de células derivadas do adenoma pleomórfico humano, Jaeger⁵⁶ (1995) observou que as células apresentavam características imuno-citoquímicas e sub-celulares de célula mioepitelial neoplásica. Tais células formaram estruturas luminais apenas quando crescidas dentro de um arranjo tridimensional de matrigel, uma combinação de proteínas da membrana basal, demonstrando a importância das interações célula-célula e célula-matriz extra-celular na formação de estruturas funcionais.

Concluindo, nos tumores com diferenciação para ducto intercalar, a célula mioepitelial expressa vimentina e, eventualmente, co-expressa actina e citoqueratina 14. Jamais a célula mioepitelial nesses tumores co-expressa outras citoqueratinas com a vimentina. Nos tumores sem diferenciação para ducto intercalar, como o adenoma de células basais do tipo sólido e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, há co-expressão de vimentina com citoqueratinas (7, 8, 18 e 14), o que indica que a célula que dá origem a estes tumores apresenta características transicionais.

A expressão de citoqueratina 14 e actina pela célula mioepitelial é independente, indicando que tal expressão deve ser induzida por estímulos diferentes. Entretanto, a função secretória da célula luminal, detectada pela EMA, parece ter influência na expressão de actina e citoqueratina 14 pela célula mioepitelial.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

No grupo de tumores nos quais há formação de estruturas ductais de duas camadas de células (adenoma pleomórfico, adenoma de células basais, tipo tubular e túbulo-trabecular e no carcinoma adenóide cístico, tipo tubular), as células luminais expressam as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 e eventualmente co-expressam a citoqueratina 14.

- Algumas estruturas ductais apresentam co-expressão das citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 com o antígeno epitelial de membrana nas células luminais, indicando atividade secretória das mesmas.

- As células externas das estruturas ductais e demais células não luminais expressam vimentina, eventualmente co-expressando actina e/ou citoqueratina 14 e são sempre negativas para as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 e o antígeno epitelial de membrana, demonstrando diferenciação mioepitelial.

- A co-expressão de vimentina, actina e citoqueratina 14 pelas células ductais externas é mais comum quando a célula luminal expressa o antígeno epitelial de membrana, indicando atividade secretória.

No grupo de tumores nos quais praticamente não há formação de estruturas ductais de duas camadas (adenoma de células basais, tipo sólido e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade), as células apresentam características transicionais, expressando vimentina, podendo expressar também as citoqueratinas 7, 8, 18 e 14. Eventualmente há co-expressão das citoqueratinas 8 e 18 com a citoqueratina 14.

- Algumas células co-expressam o antígeno epitelial de membrana com as citoqueratinas 7, 8 e 18, indicando atividade secretória.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ARAÚJO, V.C., ARAÚJO, N.S. Vimentin as a marker of myoepithelial cells in salivary gland tumors. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, v.247, p.252-5, 1990.
- 2- ARAÚJO, V.C., SOUSA, S.O.M. Expression of different keratins in salivary gland tumours. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, v. 32B, n.1, p.14-8, 1996.
- 3- ARAÚJO, V.C., CARVALHO, Y.R., ARAÚJO, N.S. Actin versus vimentin in myoepithelial cells of salivary gland tumors. A comparative study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.77, n.4, p.387-91, 1994.
- 4- AZUMI, N., BATTIFORA, H. The cellular composition of adenoid cystic carcinoma. *Cancer*, v.60, p.1589-98, 1987.
- 5- BATSAKIS, J.G. Salivary gland neoplasia: an outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg.*, v.49, n.3, p.229-32, 1980.
- 6- BATSAKIS, J.G., KRAEMER, B., SCIUBBA, J.J. The pathology of head and neck tumors: the myoepithelial cell and its participation in salivary gland neoplasia, part 17. *Head Neck Surg.*, v.5, p.222-33, 1983.

- 7- BERGMAN, R. et al. A comparative immunohistochemical study of adenoid cystic carcinoma of the skin and salivary glands. *Am. J. Dermatopathol.*, v.13, n.2, p.162-8, 1991.
- 8- BORN, I.A. et al. Cytokeratin expression in normal salivary glands and in cystadenolymphomas demonstrated by monoclonal antibodies against selective cytokeratin polypeptides. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v.411, p.583-9, 1987.
- 9- BURGESS, K.L. et al. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.82, p.674-80, 1996.
- 10- BURNS, B.F., DARDICK, I., PARKS, W.R. Intermediate filament expression in normal parotid glands and pleomorphic adenomas. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v.413, p.103-12, 1988.
- 11- CARVALHO, Y.R. et al. Polymorphous low-grade adenocarcinoma. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 22, n.1, p.19-29, 1993.
- 12- CASELITZ, J., LÖNING, T. Specific demonstraion of actin and keratin filaments in pleomorphic adenomas by means of immunoelectron microscopy. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.*, v.393, p.153-8, 1981.
- 13- CASELITZ, J., SCHULZE, I., SEIFERT, G. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: an immunohistochemical study. *J. Oral Pathol.*, v.15, p.308-18, 1986.

- 14- CASELITZ, J. et al. Intermediate-sized filament proteins (prekeratin, vimentin, desmin) in the normal parotid gland and parotid gland tumours. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.*, v.393, p.273-86, 1981.
- 15- CASELITZ, J. et al. The expression of different intermediate-sized filaments in human salivary glands and their tumours. *Pathol. Res. Pract.*, v.175, p.266-78, 1982.
- 16- CASELITZ, J. et al. Coexpression of keratin and vimentin filaments in adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.*, v.403, p.337-44, 1984.
- 17- CHEN, J.C., GNEPP, D.R., BEDROSSIAN, C.W.M. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: an immunohistochemical analysis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.65, n.3, p.316-26, 1988.
- 18- CHOMETTE, G. et al. Basaloid carcinoma of salivary glands, a variety of indifferntiated adenocarcinoma. Immunohistochemical study of intermediate filament proteins in 24 cases. *J. Pathol.*, v.163, p.39-45, 1991.
- 19- CHOMETTE, G. et al. Heterogeneity and co-expression of intermediate filament proteins in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Pathol. Biol.*, v.39, n.2, p.110-6, 1991.
- 20- CRIVELINI, M.M., SOUSA, S.O.M., ARAÚJO, V.C. Immunohistochemical study of acinic cell carcinoma of minor salivary gland. *Oral Oncology*, v.33, n.3, p.204-8, 1997.

- 21- CROCKER, J. et al. Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in salivary gland neoplasms. *J. Pathol.*, v.146, p.115-21, 1985.
- 22- DARDICK, I. Myoepithelioma: definitions and diagnostic criteria. *Ultrastruct. Pathol.*, v.19, p.335-45, 1995.
- 23- DARDICK, I., VAN NOSTRAND, A.W.P. Mioepithelial cells in salivary gland tumors-revisited. *Head Neck Surg.*, v.7, p.395-408, 1985.
- 24- DARDICK, I., VAN NOSTRAND, A.W.P. Morphogenesis of salivary gland tumors. A prerequisite to improving classification. *Pathol. Annu.*, v.22, p.1-53, 1987.
- 25- DARDICK, I., VAN NOSTRAND, A.W.P. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: a case report with ultrastructural findings. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.66, p.459-65, 1988.
- 26- DARDICK, I., BYARD, R.W., CARNEGIE, J.A. A review of the proliferative capacity of major salivary glands and the relationship to current concepts of neoplasia in salivary glands. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.69, p.53-67, 1990.
- 27- DARDICK, I., THOMAS, M.J., VAN NOSTRAND, A.W.P. Myoepithelioma-new concepts of histology and classification: a light and electron microscopic study. *Ultrastruct. Pathol.*, v.13, p.187-224, 1989.

- 28- DARDICK, I. et al. Pleomorphic adenoma, I: ultrastructural organization of "epithelial" regions. *Hum. Pathol.*, v.14, p.780-97, 1983.
- 29- DARDICK, I. et al. Immunohistochemistry and ultrastructure of myoepithelium and modified myoepithelium of the ducts of human major salivary glands: histogenetic implications for salivary gland tumors. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.64, n.6, p.703-15, Dec. 1987.
- 30- DARDICK, I. et al. Salivary gland myoepithelioma variants. Histological, ultrastructural and immunocytological features. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v.416, p.25-42, 1989.
- 31- DARDICK, I. et al. S-100 protein antibodies do not label normal salivary gland myoepithelium. Histogenetic implications for salivary gland tumors. *Am. J. Pathol.*, v.138, p.619-28, 1991.
- 32- DARDICK, I. et al. Immunohistochemical and ultrastructural correlates of muscle-actin expression in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas based on comparison of formalin and metanol fixation. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v.421, p.95-104, 1992.
- 33- DARDICK, I. et al. Trabecular and solid-cribriform types of basal cell adenoma. A morphologic study of two cases of an unusual variant of monomorphic adenoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.73, p.75-83, 1992.

- 34- DRAEGER, A. et al. Cytokeratins, smooth muscle actin and vimentin in human normal salivary gland and pleomorphic adenomas. *APMIS*, v.99, p.405-15, 1991.
- 35- ERLANDSON, R.A. Diagnostic immunohistochemistry of human tumors. An interim evaluation. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.8, n.8, p.615-24, 1984.
- 36- ERLANDSON, R.A., CARDON-CARDO, C., HIGGINS, P.J. Histogenesis of benign pleomorphic adenoma (mixed tumor) of the major salivary glands. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.8, n.11, p.803-20, 1984.
- 37- EVERSOLE, L.R. Histogenic classification of salivary tumors. *Arch. Pathol.*, v.92, p.433-43, 1971.
- 38- FERREIRO, J.A. Immunohistochemistry of basal cell adenoma of the major salivary glands. *Histopathology*, v.24, p.539-42, 1994.
- 39- FIGUEIREDO, C.R.L.V. *Estudo imuno-histoquímico do carcinoma adenóide cístico*. São Paulo, 1995, 86p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 40- FRANQUEMONT, D.W., MILLS, S.E. Plasmacytoid monomorphic adenoma of salivary glands. Absence of myogenous differentiation and comparison to spindle cell myoepithelioma. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.17, n.2, p.146-53, 1993.

- 41- FUCHS, E., CLEVELAND, D.W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*, v.279, p.514-19, 1998.
- 42- GARDNER, D.G., DALEY, T.D. The use of the terms monomorphic adenoma, basal cell adenoma, and canalicular adenoma, as applied to salivary gland tumors. *Oral Surg.*, v.56, n.6, p.608-15, 1983.
- 43- GEIGER, S. et al. Cytokeration polypeptides expression in different epithelial elements of human salivary glands. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v.410, p.403-14, 1987.
- 44- GUGLIOTTA, P. et al. Specific demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actin antibody. *J. Histochem. Cytochem.*, v.36, p.659-63, 1988.
- 45- GÜNHAN, O. et al. Expression of S-100 proteins, epithelial membrane antigen, carcinoembryonic antigen and alpha fetoprotein in normal salivary glands and primary salivary gland tumors. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, v.34, p.240-8, 1992.
- 46- GUSTAFSSON, H., VIRTANEN, I., THORNELL, L.E. Expression of cytokeratins and vimentin in salivary gland carcinomas as revealed with monoclonal antibodies. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v.412, p.515-24, 1988.

- 47- GUSTAFSSON, H., VIRTANEN, I., THORNELL, L.E. Glial fibrillary acidic protein and desmin in salivary neoplasms. Expression of four different types of intermediate filament proteins within the same cell type. *Virchows Archiv. B. Cell Pathol.*, v.57, p.303-13, 1989.
- 48- GUSTAFSSON, H. et al. Distribution of intermediate filament proteins in developing and adult salivary glands in man. *Anat. Embryol.*, v.178, p.243-51, 1988.
- 49- GUSTERSON, B.A., LUCAS, R.B., ORMEROD, M.G. Distribution of epithelial membrane antigen in benign and malignant lesions of the salivary glands. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.*, v.397, p.227-33, 1982.
- 50- HAIMOTO, H., HOSODA, S., KATO, K. Differential distribution of immunoreactive S100- α and S100- β proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab. Invest.*, v.57, n.5, p.489-98, 1987.
- 51- HARA, K. et al. Distribution of S-100 b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.*, v.401, p.237-49, 1983.
- 52- HEATLEY, M.K. Cytokeratins and cytokeratin staining in diagnostic histopathology. *Histopathology*, v.28, p.479-83, 1996.
- 53- HIRANO, T., GLUCKMAN, J.L., VRIES, E.J. The expression of α vascular smooth-muscle actin in salivary gland tumors. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v.116, p.692-6, 1990.

- 54- HUANG, J.W. et al. Immunohistochemical evaluation of the Ca^{2+} - binding S-100 proteins S-100 A1, S-100 A2, S-100 A4, S-100 A6 and S-100 B in salivary gland tumors. *J. Oral Pathol. Med.*, v.25, p.547-55, 1996.
- 55- HUBNER, G. et al. Role of myoepithelial cells in the development of salivary gland tumors. *Cancer*, v.27, n.5, p.1255-61, May, 1971.
- 56- JAEGER, R.G. *Estudo de células cultivadas do adenoma pleomórfico humano. Análise do fenótipo celular frente à ação de proteínas da matriz extra-celular. Análise da distribuição cito-esquelética do filamento intermediários vimentina*. São Paulo, 1995. 79p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 57- KAHN, H.J. et al. Role of antibody to S-100 protein in diagnostic pathology. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.79, p.341-7, 1983.
- 58- KAHN, H.J. et al. Myoepithelial cells in salivary gland tumors. An immunohistochemical study. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.109, p.190-5, 1985.
- 59- KIERSZENBAUM, A.L. The ultrastructure of human mixed salivary tumors. *Lab. Invest.*, v.18, n.4, p.391-6, 1968.
- 60- LAM, R.M.Y. An electron microscopic histochemical study of the histogenesis of major salivary gland pleomorphic adenoma. *Ultrastruct. Pathol.*, v.8, p.207-23, 1985.

- 61- LEONCINI, P. et al. Distribution of cytoskeletal and contractile proteins in normal and tumour bearing salivary and lacrimal glands. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v.412, p.329-37, 1988.
- 62- LOYOLA, A.M. et al. Study of minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma differentiation based on immunohistochemical expression of cytokeratins, vimentin and muscle-specific actin. *Oral Oncology*, v.34, 1998 (in press).
- 63- MIETTINEN, M. et al. Expression of intermediate filament proteins in thyroid gland and thyroid tumors. *Lab. Invest.*, v.50, n.3, p.262-70, 1984.
- 64- MOLL, R. et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, v.31, p.11-24, 1982.
- 65- MORI, M. et al. Various expressions of modified myoepithelial cells in salivary pleomorphic adenoma. Immunohistochemical studies. *Path. Res. Pract.*, v.182, p.632-46, 1987.
- 66- MORI, M. et al. Multiple expression of keratins, vimentin, and S-100 protein in pleomorphic salivary adenomas. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.*, v.58, n.435-44, 1990.
- 67- MORINAGA, S., NAKAJIMA, T., SHIMOSATO, Y. Normal and neoplastic myoepithelial cells in salivary gland: an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.*, v.18, p.1218-26, 1987.

- 68- NAKAJIMA, T. et al. An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissue. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.6, p.715-27, 1982.
- 69- NAKAZATO, Y. et al. Localization of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein-related antigen in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Lab. Invest.*, v.46, n.6, p.621-6, 1982.
- 70- NIKAI, H. et al. Histologic evaluation of myoepithelial participation in salivary gland tumors. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.15, p.597-605, 1986.
- 71- NORBERG, L.E., BURFORD-MASON, A.P., DARDICK, I. Cellular differentiation and morphologic heterogeneity in polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland. *J. Oral Pathol. Med.*, v.20, p.373-9, 1991.
- 72- NORBERG, L., DARDICK, I., BURFORD-MASON, A.P. Differentiating myoepithelial and acinar cells in rat neonatal parotid gland and histogenetic concepts for salivary gland tumors. *J. Oral Pathol. Med.*, v.25, p.474-80, 1996.
- 73- NORBERG, L., STRATIS, M., DARDICK, I. Quantitation and localization of cycling tumor cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas: an immunohistochemical analysis. *J. Oral Pathol. Med.*, v.26, p.124-8, 1997.

- 74- NORTON, A. J. Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. *J. Oral Pathol.*, v.171, p.79-80, 1993.
- 75- OKURA, M. et al. Expression of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in cultured submandibular gland epithelial cells and salivary gland tissues. Histogenetic implication for salivary gland tumors. *Am. J. Pathol.*, v.148, n.5, p.1709-16, 1996.
- 76- OSBORN, M., WEBER, K. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab. Invest.*, v.48, n.4, p.372-94, 1983.
- 77- PALMER, R.M. The identification of myoepithelial cells in human salivary glands. A review and comparison of light microscopical methods. *J. Oral Pathol.*, v.15, p.221-9, 1986.
- 78- PALMER, R.M., LUCAS, R.B. Immunocytochemical identification of cell types in pleomorphic adenoma, with particular reference to myoepithelial cells. *J. Pathol.*, v.146, p.213-20, 1985.
- 79- PINKUS, G.S., KURTIN, P.J. Epithelial membrane antigen: a diagnostic discriminant in surgical pathology: immunohistochemical profile in epithelial, mesenchymal and hematopoietic neoplasms using paraffin sections and monoclonal antibodies. *Human Pathol.*, v.16, p.929-40, 1985.

- 80- QUEIROZ, L.M.G. *Expressão do PCNA, Ki-67 c-erb β -2 e p53 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimórfico de baixo grau de malignidade de glândula salivar menor*. São Paulo, 1997. 79p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 81- REGEZI, J.A., BATSAKIS, J.G. Histogenesis of salivary gland neoplasms. *Otolaryngol. Clin. North. Am.*, v.10, n.2, p.297-307, 1977.
- 82- REGEZI, J.A. et al. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland. A comparative histologic and immunohistochemical study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.71, p.469-75, 1991.
- 83- SATO, M. et al. Search for specific markers of neoplastic epithelial duct and myoepithelial cell lines established from human salivary gland and characterization of their growth in vitro. *Cancer*, v.54, p.2959-67, 1984.
- 84- SEIFERT, G. et al. WHO International histological classification of tumours. Tentative histological classification of salivary gland tumors. *Pathol. Res. Pract.*, v.186, p.555-81, 1990.
- 85- SHEAR, M. The structure and function of myoepithelial cells in salivary glands. *Archs. Oral Biol.*, v.11, p.769-80, 1966.
- 86- SHINOHARA, H. et al. Coexpression of keratin and vimentin in salivary pleomorphic adenomas. *J. Oral Pathol. Med.*, v.18, p.133-9, 1989.

- 87- SHI, S.R., KEY, M.E., KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin fixed, paraffin embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 39, p.741-8, 1991.
- 88- SOUSA, S.C.O.M. *Estudo morfológico e imuno-histoquímico do adenoma pleomórfico de glândula salivar menor*. São Paulo, 1990. 65p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 89- SOUSA, S.C.O.M. Expressão da citoqueratina em neoplasias de glândula salivar. São Paulo, 1994. 57p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 90- TAKAI, Y. et al. Diagnostic criteria for neoplastic myoepithelial cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas. Immunocytochemical detection of muscle-specific actin, cytokeratin 14, vimentin and glial fibrillary acidic protein. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.79, p.330-41, 1995.
- 91- TANDLER, B. Structure of the duct system in mammalian major salivary glands. *Microsc. Res. Tech.*, v.26, p.57-74, 1993.
- 92- TSUKADA, T. et al. HHF35, a muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. Immunocytochemical and biochemical characterization. *Am. J. Pathol.*, v.126, p.51-60, 1987.

- 93- TSUKADA, T. et al. HHF35, a muscle actin-specific monoclonal antibody. II. Reactivity in normal, reactive and neoplastic human tissue. *Am. J. Pathol.*, v.127, n.2, p.389-402, 1987.
- 94- UPTON, M.P. et al. Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.10, n.8, p.560-7, 1986.
- 95- VAN MUIJEN, G.N.P. et al. Monoclonal antibodies with different specificities against cytokeratins. An immunohistochemical study of normal tissues and tumors. *Am. J. Pathol.*, v.114, p.9-17, 1984.
- 96- WARD, J.M. et al. Vimentin metaplasia in renal cortical tubules of preneoplastic, neoplastic, aging and regenerative lesions of rats and humans. *Am. J. Pathol.*, v.141, n.4, p.955-64, 1992.
- 97- WILLIAMS, S.B., ELLIS, G.L., AUCLAIR, P.L. Immunohistochemical analysis of basal cell adenocarcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.75, p.64-9, 1993.
- 98- YANG, L. et al. Immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen in salivary gland tumors: an assessment of growth potential. *Virch. Archiv. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v.422, p.481-6, 1993.
- 99- ZARBO, R.J., BACCHI, C.E., GOWN, A.M. Muscle-specific protein expression in normal salivary glands and pleomorphic adenomas: an immunocytochemical study with biochemical confirmation. *Mod. Pathol.*, v.4, n.5, p.621-6, 1991.

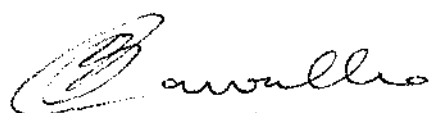
ABSTRACT

Human salivary gland tumors originated from intercalated ducts present a broad range of histologic and cytologic patterns, mainly due to the presence of myoepithelial cells. The aim of this study is to verify the differentiation grade of neoplastic cells and a possible relation between myoepithelial cell differentiation and the presence of luminal secretory contents. The expression of vimentin and cytokeratin (CK) intermediate filaments, actin myofilament and epithelial membrane antigen (EMA) was investigated by double labeling immunocytochemical technique, in thirty salivary gland neoplasms: 5 pleomorphic adenomas, 5 myoepitheliomas, 3 basal cell adenomas, 7 adenoid cystic carcinomas (ACC) and 10 polymorphous low grade adenocarcinomas (PLGA). Tumors with intercalated duct differentiation (pleomorphic adenomas, basal cell adenomas and ACC) express CKs 7, 8, 18 and 19 in the luminal cells and coexpress eventually CK14 with these CKs. Some luminal cells stained with anti-EMA antibody, mainly where a secretory content in the lumen was observed. Outer ductal cells and other myoepithelial-like cells express vimentin, sometimes coexpressing actin and/or CK14 with vimentin. Plasmacytoid cells in myoepitheliomas and pleomorphic adenomas express vimentin and rarely CKs 7, 8, 18 and 19, sometimes coexpressing these CKs with CK14 but they are negative for the remaining antigens. Tumors without intercalated duct differentiation (solid basal cell adenoma and PLGA) express vimentin and CKs 7, 8, 14 and 18, sometimes coexpressing CKs 8 and 18 with CK14. In conclusion, in tumors with intercalated duct differentiation, myoepithelial cells express vimentin and sometimes coexpress actin and/or CK14 with vimentin, never coexpressing other CKs with vimentin. CK14 and actin are independently expressed by myoepithelial cells, so their expression is

probably induced by different stimulus. However, the secretory function of luminal cells, visualized by EMA staining, seems to be related to the expression of actin and CK14 by myoepithelial cells. Tumors without intercalated duct differentiation show coexpression of vimentin and CKs 7, 8, 18 and 14, suggestive of a transitional aspect into acinar differentiation.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José dos Campos, 29 de maio de 1998.


Yasmin Rodarte Carvalho