PERFIL DO COMPONENTE MIOEPITELIAL EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

CAROLINNE ALVES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção de Título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo
Co-Orientadora: Dra. Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo
2021

FICHA CATOLOGRÁFICA

de Oliveira, Carolinne Alves.
Perfil do componente mioepitelial em neoplasias de glândulas salivares / Carolinne Alves de Oliveira – São Paulo, 2021.
57f.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientador: Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo.

1. Células mioepiteliais/Myoepithelial cells. 2. Imunoistoquímica/Immunohistochemistry. 3. Neoplasias de Glândulas salivares/Salivary Gland Neoplasms. 4. Carcinoma ex-adenoma pleomórfico/Carcinoma Ex-Pleomorphic Adenoma. 5. Carcinoma mioepitelial/Myoepithelial carcinoma.

CDU 616

O nosso ir faz o caminho.

\- *C.S. Lewis*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais (Elaine e Rogério), irmãos (Rhayssa e Ryan) e avós (Josefa, Elias, Ednalva e Eugênio (in memoriam)), por apoiarem meus passos com muito zelo e incentivo nesta caminhada científica que apenas começou. Obrigada por encorajarem esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço:
À Deus por ser minha fortaleza e inspirar meus dias com Sua paz.
Aos meus pais (Elaine e Rogério) e meus irmãos (Rhayssa e Ryan) que são minha base para prosseguir com confiança através do apoio incondicional.
À Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, minha orientadora, por me confiar este projeto e me ensinar tanto no dia a dia com muita paciência e dedicação.
À Kátia por todo auxílio nos experimentos e no dia a dia no CIPE.
À Dra. Silvia Vanessa Lourenço, minha coorientadora, por seu tempo ajudando na composição dos resultados e apresentações.
Ao Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto por igualmente dispor de seu tempo para ajudar a compor os resultados deste projeto.
Ao Dr. Fábio Albuquerque Marchi pela análise bioinformática e à Janaina Naiara Germano pela análise Estatística deste estudo.
Aos departamentos de Cabeça e Pescoço e Anatomia Patológica pelo apoio no desenvolvimento deste projeto.
À Instituição e a Pós-graduação pela atenção e suporte durante este período.
À Suely Francisco, por me ajudar com os ajustes de formatação desta dissertação.
À Ágatha Gomes por me ajudar a ilustrar este projeto com as figuras criadas.
Ao grupo ao qual faço parte com Milena Monteiro, Pedro Garcia, Ágatha Gomes e Raisa Costa por estarem por perto e me ajudarem com ideias para as apresentações, mesmo em meio ao nosso distanciamento presencial neste período de Pandemia.
À Rhayssa, minha irmã, por me ajudar com a revisão dos textos e à Beatriz, minha amiga, por me ajudar nas revisões em inglês.
À minha família, familiares e amigos por todo incentivo, cuidado e apoio sempre presentes.
Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Oncogenômica e Inovação Terapêutica pelo apoio financeiro.
A Capes pelo suporte financeiro.

RESUMO

de Oliveira CA. **Perfil do componente mioepitelial em neoplasias de glândulas salivares.** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

As neoplasias de glândulas salivares são um grupo heterogêneo de lesões que correspondem aproximadamente a 3-6% dos casos de neoplasias de cabeça e pescoço e apresentam características histológicas distintas. A grande variação no padrão histológico das lesões de glândulas salivares tem sido atribuída à presença de células mioepiteliais, que apresentam padrões distintos em cada neoplasia. O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão de um painel de proteínas do citoesqueleto, adesão e proliferação celular, sendo elas: actina de músculo liso (AML), calponina, caldesmon, citoceratina 14 (CK14), E-caderina, vimentina, beta-catenina, Ki-67 e p63 em neoplasias malignas das glândulas salivares utilizando a técnica de imunoistoquímica (IHQ). Foram selecionadas retrospectivamente, um total de 15 amostras, sendo 08 amostras de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, 04 de carcinoma mioepitelial, 03 de adenocarcinoma de células basais. Os casos foram analisados e os resultados, obtidos através da imumoistoquímica, comparados com os dados demográficos, clínicos e patológicos. A expressão das proteínas foi analisada qualitativamente e semi-quantitativamente, sendo classificada em negativo, positivo focal, positivo difuso ou positivo abundante. A actina de músculo liso (AML) foi observada em dois casos de adenocarcinoma de células basais (ACCB), três de carcinoma mioepitelial (CAME) e três de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP). A calponina foi expressa em dois casos, tanto de ACCB quanto de CAME e em três casos de CXAP. A proteína caldesmon foi observada em dois casos de ACCB, os quatros casos de CAME e sete casos de CXAP. Três casos de ACCB e de CAME e cinco de CXAP apresentaram expressão de CK14. A E-caderina foi observada em todos os casos dos três tipos tumorais, assim como a beta-catenina. A proteína vimentina foi expressa em todos os casos de ACCB e CAME, e predominantemente nos casos de CXAP. Poucos casos, tanto de ACCB, CAME e CXAP apresentaram positividade para Ki-67. A proteína p63 foi observada em todos os casos de ACCB e CAME, sendo pouco expressa em CXAP. A análise de clusterização hierárquica demonstrou a formação de dois *clusters*, sendo um deles predominantemente composto por CXAP. A comparação da expressão das proteínas com as características demográficas, clínicas e patológicas demonstrou associação entre a perda de expressão das proteínas CK14 e p63 e a ocorrência de metástase. Os resultados sugerem que a expressão das proteínas beta-catenina, E-

caderina, caldesmon e vimentina apresentou-se de forma muito similar, sugerindo um perfil equivalente de expressão entre essas neoplasias derivadas do ducto intercalar. Já a ausência de expressão de AML e calponina parece estar associada à separação dos grupos na análise de clusterização, sugerindo que deve ser considerada como um fator na diferenciação tumoral.

ABSTRACT

de Oliveira CA. **Myoepithelial component profiling in salivary gland tumors.** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

Salivary gland neoplasms are a heterogeneous group of lesions that account for approximately 3-6% of head and neck tumors, with distinct histological characteristics. The variation in the histological pattern of salivary gland lesions has been attributed to the presence of myoepithelial cells, that present different patterns in each neoplasm. The aim of the study was to evaluate the expression of a panel of cytoskeletal, cell adhesion and cell proliferation proteins, namely: smooth muscle actin (SMA), calponin, caldesmon, cytokeratin 14 (CK14), E-cadherin, vimentin, beta- catenin, Ki-67 and p63 in salivary glands malignant neoplasms, using immunohistochemical technique (IHC). Fifteen samples were retrospectively selected, being 08 carcinoma ex-pleomorphic adenoma samples, 04 myoepithelial carcinoma samples, 03 basal cell adenocarcinoma samples. The immunohistochemical results were analyzed and compared with demographic, clinical and pathological data. Protein expression were qualitatively and semi-quantitatively analyzed and classified as negative and positive (focal, diffuse, or abundant). Smooth muscle actin (SMA) was observed in two cases of basal cell adenocarcinoma (BCAC), three cases of myoepithelial carcinoma (MECA) and three cases of carcinoma ex-pleomorphic adenocarcinoma (CXPA). Calponin was expressed in two cases of BCAC, two cases of MECA, and three cases of CXPA. Caldesmon protein was observed in two cases of BCAC, four cases of MECA and seven cases of CXPA. Three cases of BCAC and MECA and five of CXPA presented CK14 expression. E-cadherin was observed in all cases of the three tumor types, as well as beta-catenin. Vimentin protein was expressed in all BCAC and MECA cases, and predominantly in CXPA cases. Few cases of BCAC, MECA and CXPA were positive for Ki-67. p63 protein was observed in all cases of BCAC and MECA, and present low expression in CXPA. The hierarchical clustering analysis demonstrated the formation of two clusters, one of them being predominantly composed of CXPA. Protein expression comparison with demographic, clinical and pathological characteristics demonstrated an association between loss of expression of CK14 and p63 proteins and the occurrence of metastasis. The results suggest that the expression of beta-catenin, E-cadherin, caldesmon and vimentin proteins was very similar, suggesting an equivalent expression profile among these neoplasms derived

from the intercalated duct of the salivary gland. The absence of SMA and calponin expression seems to be associated with the separation of groups in the clustering analysis, suggesting that it should be considered as a factor in tumor differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação estrutural da glândula salivar, indicando os ductos, ácinos e porção parenquimatosa.

Figura 2 - Representação da distribuição de células mioepiteliais pelas estruturas da glândula salivar.

Figura 3 - Representação da distribuição das proteínas que serão avaliadas no estudo.

Figura 4 - Aspectos histológicos de neoplasias do ducto intercalar da glândula salivar.

Figura 5 - Imunoexpressão das proteínas actina de músculo liso (AML), calponina, caldesmon e vimentina em amostras de glândula salivar normal e em neoplasias malignas de glândula salivar.

Figura 6 - Imunoexpressão das proteínas CK14, E-caderina e beta-catenina em amostras de glândula salivar normal e em neoplasias malignas de glândula salivar.

Figura 7 – Imunoexpressão das proteínas p63 e Ki-67 em amostras de glândula salivar normal e em neoplasias malignas de glândula salivar.

Figura 8 – Perfil de expressão das proteínas em amostras de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial e adenocarcinoma de células basais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das principais características apresentadas das células mioepiteliais e dos tumores carcinoma ex-adenoma pleomórfico, adenocarcinoma de células basais e carcinoma mioepitelial.

Tabela 2 - Lista de relação dos anticorpos primários, procedência, diluição, recuperação antigênica, controle positivo e padrão de marcação.

Tabela 3 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com tumores de glândula salivar.

Tabela 4 - Imunoexpressão das proteínas de citoesqueleto e adesão celular em amostras de adenocarcinoma de células basais, carcinoma mioepitelial e carcinoma ex-adenoma pleomórfico.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP: Adenoma pleomórfico

ACB: Adenoma de células basais

ACCB: Adenocarcinoma de células basais

α-AML: Alfa-actina de músculo liso

β-catenina: Beta-catenina

CAME: Carcinoma mioepitelial

CXAP: Carcinoma ex-adenoma pleomórfico

CK14: Citoceratina 14

IHQ: Imunoistoquímica

PLAG1: Pleomorphic Adenoma gene 1

TGS: Tumores de glândulas salivares

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Glândulas salivares 1
1.2 Células mioepiteliais 2
1.3 Tumores de glândulas salivares 3
1.3.1 Carcinoma ex-adenoma pleomórfico 4
1.3.2 Carcinoma mioepitelial 4
1.3.3 Adenocarcinoma de células basais 5
1.4 Marcadores proteicos 7
1.5 Justificativa 10

2 OBJETIVOS 11
2.1 Objetivo geral 11
2.2 Objetivos específicos 11

3 MATERIAL E MÉTODOS 12
3.1 Casuística 12
3.2 Imunoistoquímica 12
3.3 Análise de clusterização hierárquica 14
3.4 Estatística 14

4 RESULTADOS 15
4.1 Casuística 15
4.2 Dados clínicos, patológicos e demográficos 16
4.3 Imunoistoquímica 18
4.4 Análise de clusterização hierárquica 25
4.5 Análise estatística 26

5 DISCUSSÃO 27

6 CONCLUSÃO 32

7 REFERÊNCIAS 33

ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 – Tabela com Associação entre expressão proteica e características demográficas, clínicas e patológicas dos tumores

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares são glândulas exócrinas anexas do sistema digestório, de origem ectodérmica e contém três principais tipos de células denominadas acinares, ductais e mioepiteliais. Anatomicamente, essas glândulas são divididas em três pares maiores, sendo elas, parótida, submandibulares e sublinguais, e numerosas glândulas menores localizadas em várias regiões da cavidade oral, faringe e laringe. Estruturalmente, as unidades secretoras e ductais formam a porção parenquimatosa da glândula e o tecido conjuntivo, que dá sustentação à glândula, tem componentes como: os nervos, vasos linfáticos e sanguíneos formando o estroma. Histologicamente, são compostas por porção acinar secretora (que pode ter composição mucosa, serosa ou mista) e ductal (dividido entre ducto intercalar, ducto estriado e ducto excretor), como pode ser observado na Figura 1. A principal função dessas glândulas é a secreção de saliva, que é um fluido complexo que desempenha várias funções importantes, tais como manter a cavidade oral úmida, exercer efeito protetor em dentes e mucosa, a formação do bolo alimentar, secreção de proteínas digestivas, manutenção do pH, ação bactericida para o ambiente bucal e manter a homeostase da cavidade oral (Milletich 2010; Jaeger e Freitas 2016; de Paula et al. 2017; Ghannam e Singh 2019; Athwal e Lombaert 2020).

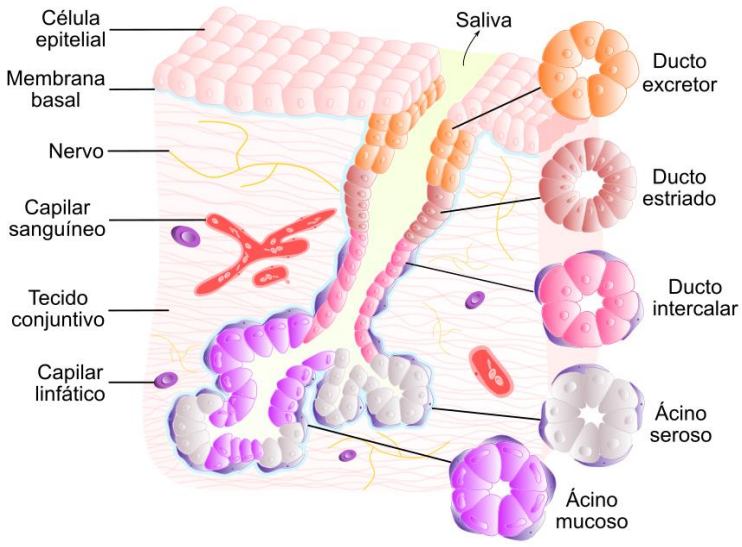

Figura 1 - Representação estrutural da glândula salivar, indicando os ductos, ácinos e porção parenquimatosa. Fonte: autoria própria.

1.2 CÉLULAS MIOEPITELIAIS

As células mioepiteliais foram descritas pela primeira vez por Zimmerman em 1898, e identificadas em glândulas salivares por Tamarin em 1966, localizadas entre a membrana basal e as células epiteliais. Nas glândulas salivares elas são encontradas associadas à unidade secretora terminal (ácinos) e ao ducto intercalar, se mantendo unidas a estas unidades através de desmossomos. Essas células apresentam núcleo achatado, citoplasma perinuclear e longas ramificações que envolvem as células secretoras e ductais, como pode ser observada na Figura 2. Elas apresentam como característica principal a semelhança com células epiteliais e de músculo liso, constituindo um fenótipo único e bem característico, onde pode-se destacar a presença de filamentos intermediários, vesículas pinocitóticas e miofilamentos (Nanci 2013; Chitturi et al. 2015; Jaeger e freitas 2016; Shah et al. 2016; de Paula et al. 2017; Alali e Kochaji 2018; Ghannam e Singh 2019).

A origem das células mioepiteliais ainda vem sendo discutida. Acredita-se que elas provêm de células pluripotentes, mas sabe-se que seu papel é fundamental na morfogênese das glândulas em diferentes etapas do desenvolvimento, até a sua maturação e na promoção da diferenciação de células epiteliais pela secreção de fatores de crescimento e citocinas. Essas células são caracterizadas por sua capacidade de contração, manutenção da polaridade e a organização estrutural da unidade secretora terminal, função sensorial, transporte de metabólicos, formação e manutenção da membrana basal, e por produzir proteínas que atuam como supressores tumorais (inibidores de proteinase e fatores anti-angiogênese) (Ianez et al. 2010; Nanci 2013; Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016; Alali e Kochaji 2018; Ghannam e Singh 2019).

A produção de compostos da membrana basal e substâncias mixóides feitas por essas células e sua grande capacidade de diferenciação, demonstraram ser os responsáveis pela diversidade na morfologia dos tumores de glândulas salivares. Como mencionado em outros estudos, essas células promovem a diferenciação de células epiteliais, síntese de membrana basal e secreção de proteínas (maspina) que desempenham um papel de supressão tumoral. Essas propriedades representam pontos chaves para a melhor compreensão dos fatores que influenciam diretamente a estrutura histológica tumoral, bem como seu potencial de invasão e recidiva. Até o momento, poucos estudos caracterizaram o papel das células mioepiteliais em neoplasias da glândula salivar em comparação com outros tipos de células no mesmo tumor, fazendo-se necessário mais estudos destas células e sua real atribuição na tumorigênese

(Lourenço et al. 2007; Nanci 2013; Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016; Alali e Kochaji 2018; Ghannam e Singh 2019).

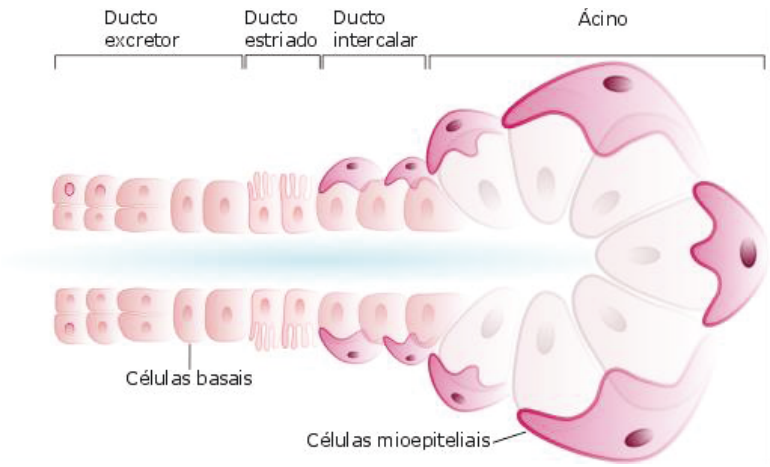

Figura 2 - Representação da distribuição de células mioepiteliais pelas estruturas da glândula salivar. Fonte: Adaptado de Adams et al. 2013.

1.3 TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR

Os tumores da glândula salivar (TGS) representam cerca de 3-6% das neoplasias de cabeça e pescoço, e cerca de 0,5% de todas as neoplasias malignas em humanos. Os locais mais afetados pelos tumores são as glândulas parótidas, submandibulares e as glândulas salivares menores do palato, enquanto a glândula sublingual é raramente afetada. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os tumores de glândulas salivares em mais de 30 subtipos histológicos malignos e benignos, baseados na citologia como uma ferramenta inicial para avaliação (Sowa et al. 2018; Noel et al. 2018; Lin et al. 2018; Meyer et al. 2021).

Como mencionado anteriormente, as células mioepiteliais têm a capacidade de se diferenciar e realizar uma transição entre componentes epiteliais e mesenquimais em um tumor, levando a um amplo espectro de diferenciação da matriz extracelular, como também produzir padrões arquitetônicos diferentes em um mesmo tipo tumoral, fazendo com que haja variedades morfológicas. Essas variações histológicas que geram um amplo espectro morfológico entre os diferentes tipos de neoplasias implicam em dificuldades no diagnóstico e nomenclatura para essas neoplasias, por isso é importante entender as características citoarquiteturais básicas de cada tipo de tumor, para que o diagnóstico possa ser feito através da análise dos componentes celulares, do arranjo celular e dos componentes extracelulares (Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016; Sowa et al. 2018; Cheuk e Chan 2020).

Neoplasias derivadas do ducto intercalar da glândula salivar apresentam um componente mioepitelial que se destaca: predominância de células mioepiteliais no mioepitelioma, adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial e carcinoma ex-adenoma pleomórfico e participação parcial das células mioepiteliais no adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais.

1.3.1 Carcinoma ex-adenoma pleomórfico

O carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) é definido como um tumor maligno, originado no ducto intercalar, a partir da recorrência do adenoma pleomórfico benigno primário e que pode ser composto de vários subtipos histológicos, mas os mecanismos que levam a esta transformação ainda são totalmente desconhecidos. Embora seja raro, foi relatado que ocorre em 0,15% das lesões e representa 3,6% de todos os tumores de glândula salivar acometendo principalmente a glândula parótida. Histopatologicamente, o CXAP é classificado em três categorias, sendo elas, carcinomas intracapsulares, minimamente invasivos e amplamente invasivos. É considerado um carcinoma agressivo, com alta taxa de metástases locais ou a distância, principalmente em casos amplamente invasivos. No carcinoma ex-adenoma pleomórfico, as alterações iniciais consistem tipicamente em células tumorais que substituem a camada epitelial do ducto interno normal, deixando a camada mioepitelial localizada na periferia normal e intacta. As alterações são atípicas, variando de focais a difusas e muitas vezes com áreas multifocais contendo carcinoma, que frequentemente supera e substitui muitos dos elementos benignos. A maioria dos CXAPs são de alto grau com características malignas bem definidas, como crescimento infiltrativo, pleomorfismo nuclear, aumento da atividade mitótica e necrose e apenas uma minoria destes tumores é de baixo grau. O papel das células mioepiteliais na progressão tumoral vem sendo estudado, pois tem sido notado que ao invés de atuar como supressor tumoral, essas células têm na verdade contribuído para um microambiente que favorece a progressão tumoral (Shah et al. 2016; Yin e Ha 2016; Kessler e Bhatt 2018; Covinsky et al. 2018; Seok et al. 2019; Okano et al. 2020; Scarini et al. 2021).

1.3.2 Carcinoma mioepitelial

O carcinoma mioepitelial (CAME) é considerado uma neoplasia maligna e rara, que representa até 2% de todas as neoplasias da glândula salivar, e tem características clínicas diversas, sendo na maioria dos casos diagnosticado em grau intermediário ou alto. Este tumor é originado no ducto intercalar, geralmente atinge a parótida e é considerado a versão maligna do mioepitelioma, mas também pode surgir a partir de recidivas do adenoma pleomórfico, como

um tipo histológico de carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Histologicamente há dificuldade de estabelecer uma identidade, mas de modo geral pode ser caracterizado pela vasta composição mioepitelial no ambiente tumoral, pelo padrão de crescimento celular sólido/trabecular, circundando um centro hipocelular que geralmente é mixóide e/ou necrótico. O tumor apresenta pleomorfismo acentuado, onde são identificados diferentes tipos celulares, como: células fusiformes, epitelióides, hialinas plasmocitoides, claras, estreladas e basalóides. A atipia nuclear varia de leve a acentuada, e a atividade mitótica costuma estar presente. É possível fazer sua diferenciação com o carcinoma epitelial-mioepitelial microscopicamente pela composição celular, ao identificar que o epitelial-mioepitelial, tem aspecto lobular, sendo em seu interior epitelial com as bordas mioepiteliais, enquanto o mioepitelial é majoritariamente com células mioepiteliais, podendo ter células epiteliais, mas sem ocupar mais de 10% do tumor (Rao et al. 2014; Nicholas et al. 2019; Zeitouni et al. 2019; Cheuk e Chan 2020; Xu e Katabi 2021).

O carcinoma mioepitelial não apresenta um padrão histológico bem diferenciado, mas atualmente tem sido caracterizado em estudos pela sua proliferação infiltrativa de células neoplásicas poligonais em forma difusa, com núcleos levemente aumentados e citoplasma eosinofílico, apresentação de comportamento variável, com recorrências locais e o desenvolvimento de metástases podem ser observados vários meses ou anos após o diagnóstico inicial. É observada uma expressão variável de proteínas, porém frequentemente expressam as proteínas vimentina e calponina, que são usadas como marcadores para a diferenciação mioepitelial, bem como outros marcadores que são úteis para destacar a arquitetura tumoral e destacar possíveis padrões. Contudo, novos estudos e achados imunoistoquímicos são necessários para tornar esse diagnóstico mais preciso (Rao et al. 2014; Nicholas et al. 2019; Zeitouni et al. 2019; Cheuk e Chan 2020; Xu e Katabi 2021).

1.3.3 Adenocarcinoma de células basais

O adenocarcinoma de células basais (ACCB) da glândula salivar é uma transformação maligna e com semelhança arquitetônica e citológica do adenoma de células basais (ACB) e é originado no ducto intercalar. É um subtipo raramente diagnosticado, responsável por 1-3% dos tumores da glândula salivar e acomete majoritariamente a parótida (>80%). Na última classificação OMS, o ACCB foi definido como um tumor de baixo grau e com bom prognóstico. Esse tumor pode ser composto por células basalóides menores com citoplasma escasso e núcleos escuros e/ou células basalóides poligonais, além disto esse tumor ainda apresenta sobreposição bifásica de células, abrangendo células ductais (luminais), basais e mioepiteliais. Baseado no padrão de crescimento, o tumor pode ser dividido em 4 subtipos: sólido, trabecular,

tubular e membranoso. O tipo sólido é mais comum e o membranoso é citado como o tipo com mais casos de recorrência. Ainda pode ser observado um padrão de arranjo cribriforme, mas apenas de modo focal. Vários autores indicam a necessidade de diferenciação entre ACB e ACCB, pois existe uma sobreposição de características citológicas e histomorfológicas entre essas neoplasias que dificultam a distinção entre eles, já que essa diferenciação é feita pela observação de crescimento infiltrativo e presença de invasão no adenocarcinoma de células basais e não no adenoma de células basais. Atualmente alguns estudos imunoistoquímicos (limitados) ajudam na diferenciação em relação a outras neoplasias (Jin e He 2018; Oyama et al. 2018; Cheuk e Chan 2020; Robinson 2021).

Na Tabela 1 abaixo pode-se ver um resumo das principais características das células mioepiteliais e das neoplasias objetos de estudo neste projeto.

Tabela 1 - Resumo das principais características apresentadas das células mioepiteliais e dos tumores carcinoma ex-adenoma pleomórfico, adenocarcinoma de células basais e carcinoma mioepitelial

Características	**Células mioepiteliais**	**Carcinoma ex-adenoma pleomórfico**	**Adenocarcinoma de células basais**	**Carcinoma mioepitelial**
Origem	Acredita-se ser a partir de células pluripotentes pré-existentes	Ducto intercalar	Ducto intercalar	Ducto intercalar
Morfologia	Células claras, plamocitóides, epitelióides e/ou basalóides	Apresenta componente mioepitelial de células anguladas, plasmocitóides, fusiformes, ou clara, e componente epitelial que ficam distribuídas em ilhas estruturas císticas com estroma mixóide	Composto por células epiteliais e mioepiteliais em uma organização bifásica	Predominantemente composto pelo componente mioepitelial de células fusiformes, claras ou plasmocitóides
Padrões estruturais	Mixóide, sólido, pseudo cístico ou cribriforme	Sólido, trabecular, tubular, mixóide ou membranoso	Sólido, trabecular, tubular, mixóide ou membranoso	Sólido ou mixóide
Participação no tumor	Diversidade de padrões arquitetônicos, diferenciação histológica e da matriz extracelular	-	-	-

1.4 MARCADORES PROTEICOS

Os componentes do citoesqueleto são de grande importância para identificação imunoistoquímica das células mioepiteliais. O citoesqueleto é uma estrutura complexa, formada por uma rede de proteínas que dá o suporte estrutural da célula, permitindo a mobilidade de organelas intracelulares e fornecendo uma estrutura para as movimentações de cromossomos durante a divisão celular. É composto por microfilamentos e filamentos intermediários que são estruturas importantes para a citoarquitetura e funções relacionadas a motilidade, contração e adesão celular. Os processos de adesão célula-célula e célula-matriz podem desempenhar um papel na proliferação celular, diferenciação, migração e sinalização intracelular durante o desenvolvimento tecidual e tumorigênese (Shah et al. 2016; Xiang et al. 2017).

O papel das células mioepiteliais no desenvolvimento e progressão de alguns tumores da glândula salivar tem sido demonstrado por vários estudos. Por esse motivo, é necessário buscar marcadores para a identificação de células mioepiteliais neoplásicas em diferentes tumores da glândula salivar. Vimentina, actina de músculo liso, calponina, entre outros, são defendidos como bons marcadores mioepiteliais para tumores de glândulas salivares. Na Figura 3 temos um exemplo da localização das proteínas que serão avaliadas (Shah et al. 2016; Mutlu et al. 2017; Xiang et al. 2017; Stamboni 2018; Teixeira et al. 2019; Meyer et al. 2021).

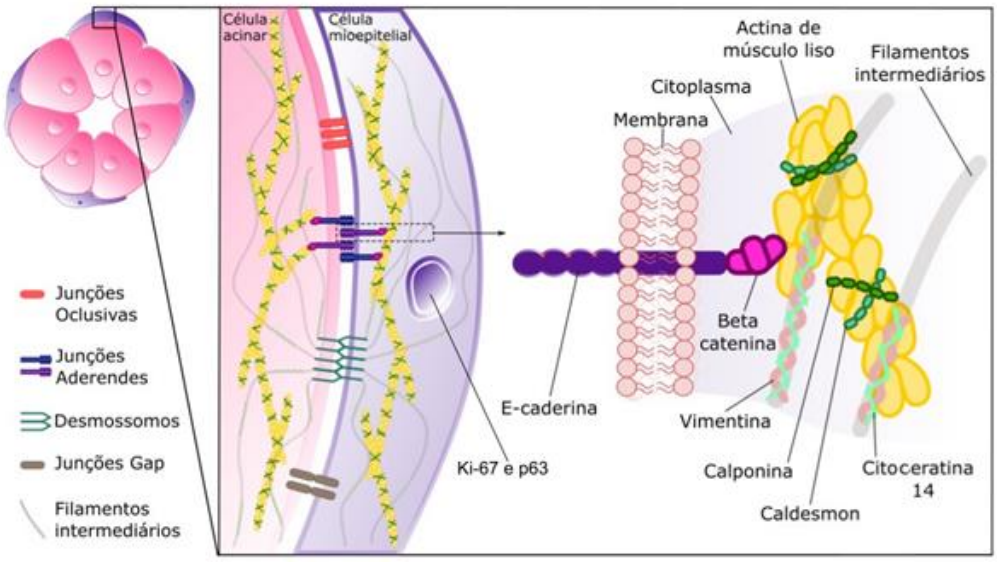

Figura 3 - Representação da distribuição das proteínas que serão avaliadas no estudo. Fonte: autoria própria.

Actina de músculo liso (α-AML)**:** A actina faz parte do sistema de microfilamento das proteínas do citoesqueleto, sendo responsável pela motilidade celular, representando uma proteína contrátil presente no estroma, sendo um dos marcadores imunoistoquímicos mais comumente utilizados para a identificação das células mioepiteliais (Tang e Gerlach 2017; Ravi et al. 2018).

Calponina: A calponina é uma proteína reguladora associada ao filamento de actina, expressa em músculo liso e células não musculares. Três genes homólogos, CNN1, CNN2 e CNN3, codificam as isoformas de calponina 1 2 e 3. Todas as três isoformas de calponina são proteínas de ligação a actina com funções na inibição da ATPase de miosina ativada por actina e estabilização do citoesqueleto de actina, enquanto cada isoforma executa diferentes papéis fisiológicos com base em suas expressões específicas do tipo de célula. Atualmente tem sido relatada como marcador sensível de células neoplásicas mioepiteliais, apresentando forte expressão nos tumores da glândula salivar (Liu e Jin 2016; Ciuba et al. 2018; Abdulrahman et al. 2019).

Caldesmon: É uma proteína de ligação com a actina, tropomiosina e calmodulina e existe em duas isoformas, h-CaD (alto peso molecular) e l-CaD (baixo peso molecular) em células musculares lisas e não musculares, respectivamente. É capaz de estabilizar filamentos de actina, inibindo a atividade ATPasica da actomiosina e protegendo os filamentos de actina. A expressão de caldesmon pode controlar a migração celular através da reorganização do citoesqueleto de actina (MAYANAGI et al. 2008; LIU et al. 2019; CHAN et al. 2019).

Citoceratina 14: A CK14 é um dos cerca de 20 isotipos de citoceratina diferentes das células humanas, sendo a proteína do filamento intermediário característica das células epiteliais. Permite que as células constituam uma rede elástica, fazendo com que permaneçam unidas à membrana basal para suportar o estresse mecânico, além de contribuir para a citoarquitetura e integridade estrutural. Em vários tipos de carcinomas a expressão alterada da CK é indicativa de uma diferenciação aberrante. Desta forma, o aumento da expressão de CK14 é frequentemente correlacionada com mau prognóstico e neoplasias mais avançadas (Gao et al. 2017; Li et al. 2018; Stamboni 2018).

E-caderina: É uma glicoproteína, considerada uma caderina clássica, que forma um componente funcional importante nas junções aderentes entre as células epiteliais. Está ligada, através de uma série de proteínas, e à actina no citoesqueleto. Tem a capacidade de inibir a proliferação celular pela regulação de p27, via EGFR. Portanto, é geralmente descrita como um supressor de invasão e uma molécula supressora de proliferação. E tem sido objeto de estudo em uma variedade de tumores, como em casos de carcinomas de cabeça e pescoço, pois tem

sido correlacionada a alta proliferação, desdiferenciação, invasão, metástase e mau prognóstico (Phattarataratip et al. 2019; Xie et al. 2017; Zeng et al. 2019).

β-catenina: É uma molécula chave na sinalização da via Wnt e desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento de células. A fosforilação da β-catenina é regulada por várias cinases e fosfatases. Após a ativação da via de sinalização Wnt, a β-catenina é capaz de se translocar para o núcleo. A desfosforilação anormal da β-catenina, como a vista no desenvolvimento do câncer, pode resultar em aumento da translocação nuclear. Apesar de ser uma molécula efetora da ativação do sinal Wnt, também é uma proteína envolvida na adesão celular com a E-caderina. É capaz de mediar a transativação de genes alvo envolvidos na progressão tumoral, invasão e metástases (Prakash et al. 2016; Ishibashi et al. 2018).

Vimentina: A vimentina é uma proteína do filamento intermediário do tipo III, específica do mesênquima, é conhecida por manter a integridade celular e fornecer resistência ao estresse. Foi observado que a expressão da vimentina se correlaciona com o fenótipo pouco diferenciado. Estudo em câncer de pulmão demonstrou a importância da expressão da vimentina na identificação da origem mesenquimal de uma célula, como marcador prognóstico e para detecção de micrometástases (Kidd et al. 2014; Dmello et al. 2017; Abdulrahman et al. 2019).

p63: Esta proteína, que apresenta expressão nuclear, é sabidamente necessária para renovação de células pluripotentes e para diferenciação do desenvolvimento de células epiteliais. Nas glândulas salivares é observada em células basais, no ducto intercalar, ao redor das células luminais. Em estudos anteriores foi observada a expressão desta proteína em alguns tumores de glândulas salivares, onde é mencionada positividade de p63 em células mioepiteliais modificadas no adenoma pleomórfico, e em células fusiformes nos mioepiteliomas, ou seja, o p63 apresenta uma imunoexpressão em células mioepiteliais na fase de diferenciação, sinalizando fase de maturação (Bilal et al. 2003; Genelhu et al. 2006; Teixeira et al. 2019).

Ki-67: É uma proteína nuclear bem estabelecida na literatura pela sua importância na sinalização de divisão celular, pois está associada a transcrição do RNA ribossomal, é controlada por vias proteolíticas e apresenta propriedades importantes para a regulação do ciclo celular, e por isso, é considerado um importante marcador para identificação de proliferação celular. É altamente expressa em diversos tipos de câncer e por apresentar tais características, essa proteína tem sido associada a marcador de caráter prognóstico, já que é identificada nas células através da imunoistoquímica apenas em fases ativas do ciclo mitótico, podendo assim, ser indicativo para avaliação de proliferação de células tumorais e invasão (Ben-izhak et al. 2008; Sobecki et al. 2017; Mansy et al. 2020).

Um estudo preliminar do nosso grupo demonstrou, que neoplasias benignas derivadas do ducto intercalar das glândulas salivares (adenoma de células basais, adenoma pleomórfico e mioepitelioma) apresentaram um marcante componente mioepitelial com características fenotípicas bastantes similares, sugerindo que essas lesões possam representar espectros histológicos de um mesmo tumor (Stamboni 2018). Dando continuidade a esse estudo, propusemos avaliar a expressão de proteínas relacionados ao citoesqueleto e adesão celular em tumores malignos derivados do ducto intercalar, verificando se a avaliação de um painel de marcadores proteicos é capaz de classificar essas neoplasias de acordo com o perfil de composição de células mioepiteliais.

1.5 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos têm sido realizados visando a identificação de células mioepiteliais em glândulas salivares. Contudo, um marcador apropriado para essas células em condições normais e neoplásicas ainda não está definido. A compreensão da expressão de proteínas do citoesqueleto e de adesão celular é importante para averiguar a composição das neoplasias derivadas das glândulas salivares. A identificação de alterações nessas neoplasias poderá apontar novos caminhos para o entendimento das bases moleculares destas lesões, facilitando sua classificação e diagnóstico, além de fornecer informações para a determinação de fatores prognósticos e evidências para o desenvolvimento de novas incursões terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinação de um perfil imunoistoquímico de células mioepiteliais em tumores malignos de glândula salivar

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a imunoexpressão das proteínas citoceratina 14, vimentina, actina de músculo liso, calponina, caldesmon, beta-catenina, E-caderina, Ki-67 e p63 em amostras de carcinoma mioepitelial, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, adenocarcinoma de células basais e glândulas salivares histologicamente normais

Verificar se os tumores podem ser classificados de acordo com o perfil de expressão dessas proteínas

Comparar a expressão das proteínas com características demográficas, clínicas e patológicas dos tumores

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo retrospectivo onde foram selecionadas um total de 15 amostras, sendo 08 amostras de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, 04 amostras de carcinoma mioepitelial, 03 amostras de adenocarcinoma de células basais e 07 amostras de glândulas salivares histologicamente normais, provenientes de pacientes submetidos à cirurgia no período de 1980 a 2020 no A.C.Camargo Cancer Center, e com material parafinado armazenado no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

A seleção dos casos foi realizada por busca no sistema Recruit, desenvolvido pela própria Instituição. Os casos correspondentes à busca foram solicitados ao arquivo para a avaliação histológica. As lâminas coradas em hematoxilina e eosina de cada caso foram analisadas para checagem das estruturas glandulares presentes e seleção do material a ser utilizado na pesquisa. Foram incluídos neste estudo os casos que apresentaram blocos de parafina com material satisfatório e com confirmação do diagnóstico, revisto com o auxílio de um patologista (Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto). Dados demográficos, clínicos e patológicos de cada caso foram estudados nos prontuários arquivados no SAME do A.C.Camargo Cancer Center para montagem de um banco de dados no sistema REDCap, contendo informações demográficas, clínicas e patológicas.

Os blocos do material selecionado para a pesquisa foram separados e cortes histológicos desse material, com 3µm de espessura, foram utilizados para a realização da técnica de imunoistoquímica.

A realização desse estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), sob o número 2706/19B (Anexo 1).

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol, lavados com etanol e re-hidratados em água.

A recuperação antigênica foi realizada por tratamento com calor na presença de: citrato de sódio pH 6.0 ou EDTA/Tris pH 9.0, utilizando-se panela de pressão, microondas ou banho maria 96ºC, de acordo com a padronização a ser realizada para cada anticorpo utilizado.

Após a recuperação antigênica, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio em 3 banhos de 5 minutos. Em seguida, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas utilizando-se a solução *Protein Block* (Leica Biosystems) por 20 minutos. As lâminas foram incubadas por 16 horas a 4ºC com o anticorpo específico.

O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado por meio do sistema de detecção *Novolink Polymer Detection System* (Leica Biosystems). A revelação foi feita utilizando-se como substrato cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (*DAB*) e contracoloração utilizando-se a hematoxilina. Todas as reações foram acompanhadas de um controle, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado. As reações foram analisadas em microscópio convencional e os dados estudados de forma descritiva e semi-quantitativa. Na análise descritiva foi avaliada a localização da marcação (núcleo, citoplasma, membrana) e a intensidade de marcação (fraca ou forte). Na análise semi-quantitativa foi considerado o seguinte escore, baseado no número de células: 0, negativo (quando até 10% das células estão marcadas); 1, positivo focal (entre 10-50% das células marcadas); 2, positivo difuso (entre 50-90% das células marcadas) e 3, positivo abundante (quando mais de 90% das células marcadas).

Para os anticorpos com protocolo automatizado, foi utilizado o protocolo padrão para o equipamento Ventana BenthMark Ultra (Roche). Na Tabela 2 encontra-se a lista de anticorpos e protocolo de uso para as proteínas estudadas.

Tabela 2 - Lista de relação dos anticorpos primários, procedência, diluição, recuperação antigênica, controle positivo e padrão de marcação

Soro primário	Clone	Procedência	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo	Padrão de marcação
Calponina	EP798Y	Cell Marque	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Mama	Citoplasma
Caldesmon	E89	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Intestino	Citoplasma
Actina Músculo liso	1A4	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Útero	Citoplasma
Vimentina	V9	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Placenta	Citoplasma
Citoceratina 14	SP53	Cell Marque	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Carcinoma espinocelular	Citoplasma
Beta-catenina	14	Cell Marque	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Fibromatose mama	Membrana e nuclear
E-caderina	36	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Carcinoma de mama	Membrana
p63	NCL-p63	Leica	1:80	EDTA/Tris pH9,0, panela de pressão 15’	Carcinoma de próstata	Nuclear
Ki-67	MIB-1	Dako	Pronto para uso	EDTA/Tris pH9,0, panela de pressão 15’	Carcinoma de próstata	Nuclear

3.3 ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

Para fins de análise de clusterização hierárquica não supervisionada, a expressão das proteínas foi categorizada de forma semi-quantitativa (conforme descrição no item 3.2). Para a construção da clusterização hierárquica, foi utilizada a função heatmap.2 disponível no pacote gplots (versão 3.0.1) e obtido no repositório bioconductor (https://www.bioconductor.org/). O programa utilizado nessa análise foi o R (https://www.r-project.org/).

3.4 ESTATÍSTICA

Para a comparação entre as variáveis categóricas (demográficas, clínicas e patológicas) e a expressão das proteínas foi utilizado o teste qui-quadrado ou exato de Fisher quando apropriado. Para as variáveis numéricas foi utilizando o teste de Mann-Whitney ou Kruskal Wallis.

Para essas análises, a expressão das proteínas foi categorizada como negativa (escore 0) ou positiva (escore 1 2 e 3). O software utilizado foi SPSS e o nível de significância adotado é de 5% para todos os testes.

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados 15 pacientes diagnosticados com tumores de glândula salivar, sendo 3 com adenocarcinoma de células basais, 4 com carcinoma mioepitelial e 8 com carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Na Figura 4, pode-se observar aspectos histológicos de alguns dos casos selecionados para o estudo.

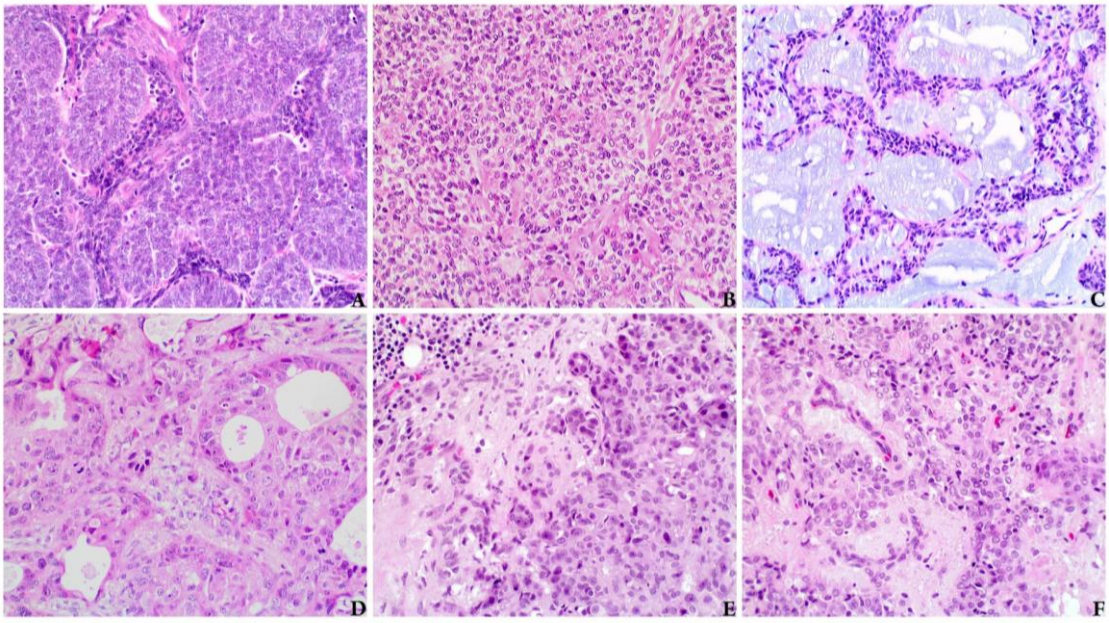

Figura 4 - Aspectos histológicos de neoplasias do ducto intercalar da glândula salivar. A, adenocarcinoma de células basais: neoplasia de arquitetura lobular, formada por células basalóides; B, carcinoma mioepitelial: neoplasia formada por lençóis de células mioepiteliais modificadas, de aspecto plasmocitóide e com citoplasma claro; C, carcinoma mioepitelial: área tumoral com presença de formações ductiformes permeadas por material mucóide; D-F, carcinoma ex-adenoma pleomórfico: neoplasia infiltrativa composta por células com pleomorfismo nuclear e com formações ductiformes atípicas. Notar em E a presença de células atípicas, com núcleos hipercromáticos e por vezes multinucleadas.

4.2 DADOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E DEMOGRÁFICOS

Os dados demográficos, clínicos e patológicos foram avaliados nos prontuários dos pacientes e as informações obtidas (tipo de tumor, gênero, data de nascimento, idade, grau histológico, local do tumor, embolização vascular, invasão perineural, linfonodo comprometido, recidiva, data da recidiva, metástase, data da metástase, estado atual, tipo de tratamento, data da cirurgia, data da última atualização, além da expressão das proteínas pesquisadas) foram armazenadas em banco de dados na plataforma REDCap.

A média de idade dos pacientes foi de 52,73 anos e a mediana 53,00 (variando entre 21 e 76 anos). A maioria dos pacientes era do sexo feminino, dois pacientes desenvolveram recidiva (carcinoma mioepitelial) e dois desenvolveram metástase (carcinoma ex-adenoma pleomórfico). A maioria dos tumores ocorreu na glândula parótida. Para dois dos quatro casos de carcinoma mioepitelial, só foi possível o uso do material proveniente de sítio metastático. Os dados detalhados da casuística estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com tumores de glândula salivar

Características	Categoria	Carcinoma ex-adenoma pleomórfico	Carcinoma mioepitelial	Adenocarcinoma de células basais
Idade (em anos)	< = 40	02	00	01
	> 40	06	04	02
Gênero	Feminino	05	04	02
	Masculino	03	00	01
Local do tumor	Parótida	06	01	03
	Submandibular	01	01	00
	Glândulas menores	01	00	00
	Sítio metastático	00	02	00
Embolia vascular	Sim	00	00	00
	Não	05	01	02
	ND*	03	03	01
Invasão perineural	Sim	01	00	00
	Não	05	01	02
	ND	02	03	01
Linfonodo comprometido	Sim	02	00	00
	Não	04	01	01
	ND	02	03	02
Grau histológico	Baixo	03	03	03
	Intermediário	02	00	00
	Alto	03	01	00
Metástase	Sim	02	00	00
	Não	05	04	03
	ND	01	00	00
Recidiva	Sim	00	02	00
	Não	07	02	03
	ND	01	00	00

ND*, informação não disponível

4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações imunoistoquímicas foram realizadas para proteínas de adesão celular, citoesqueleto e proliferação, formando o painel deste estudo, são elas: actina de musculo liso, calponina, caldesmon, citoceratina 14, E-caderina, beta-catenina, vimentina, Ki-67 e p63. Nas Figuras 5, 6 e 7 podemos observar imagens representativas da expressão das proteínas em glândulas salivares normais, e em cada tipo tumoral. Na Tabela 4 pode-se observar o padrão de imunoexpressão das proteínas.

A proteína **actina de músculo liso (AML)** apresentou expressão em dois dos três casos de adenocarcinoma de células basais, apresentando padrão de marcação variando entre focal e positivo abundante. A positividade foi observada principalmente nas células mioepiteliais da periferia de blocos de células epiteliais negativas. Já no carcinoma mioepitelial, três dos quatro casos apresentaram expressão nas células mioepiteliais em todo o tumor, mas variando em grau (entre focal, difusa e abundante). No carcinoma ex-adenoma pleomórfico, três dos 8 casos apresentaram positividade difusa nas células mioepiteliais e células basais nas estruturas ductais e acinares. Nas glândulas salivares histologicamente normais, a expressão foi observada nas áreas ductiformes.

A proteína **Calponina** foi expressa nas células mioepiteliais em dois dos três casos de adenocarcinoma de células basais, sendo observada expressão focal e abundante. Já no carcinoma mioepitelial, dois dos quatro casos apresentaram expressão variando entre focal e difusa. No carcinoma ex-adenoma pleomórfico, a expressão foi observada em dois casos, apresentando padrão de marcação focal e difuso nas células mioepiteliais na área tumoral. Nas glândulas salivares histologicamente normais, a expressão foi observada nas células mioepiteliais.

A expressão da proteína **Caldesmon** em adenocarcinoma de células basais, foi observada em todos os casos e em toda a área tumoral, variando entre focal e difusa. Em carcinoma mioepitelial, todos os casos apresentaram um positivo difuso, com variação na intensidade de marcação entre as células periféricas e centrais (que eram mais fracas). No carcinoma ex-adenoma pleomórfico, cinco casos apresentaram expressão difusa, com intensidades variadas e dois casos apresentaram um padrão de expressão mais focal, em subpopulações de células mioepiteliais, além de expressão frequente nas células estromais. Nas glândulas salivares histologicamente normais, a expressão foi observada nas células mioepiteliais.

A expressão da **citoceratina 14 (CK14)** em adenocarcinoma de células basais, foi observada tanto em células mioepiteliais quanto epiteliais em todos os casos, variando entre focal, difuso e abundante. No carcinoma mioepitelial, três dos quatro casos foram positivos, variando entre difuso e abundante, com áreas de populações de células positivas e negativas. No carcinoma ex-adenoma pleomórfico, a expressão foi bem variável: os cinco casos positivos apresentaram expressão focal, difusa e abundante, tanto nas células mioepiteliais quanto nas células epiteliais em todo tumor. Nas glândulas salivares histologicamente normais, a expressão foi observada nas células mioepiteliais e áreas ductiformes.

A proteína **E-caderina** foi expressa em todos os casos de adenocarcinoma de células basais, demonstrando marcação de membrana nos blocos tumorais e em toda a área tumoral, tanto em células mioepiteliais, quanto em células epiteliais. No carcinoma mioepitelial foi expressa em todos os casos, predominantemente apresentando uma marcação abundante, sendo que um caso apresentou marcação difusa, com áreas de subpopulações de células com intensidade mais fracas ou negativas. No carcinoma ex-adenoma pleomórfico, a expressão foi observada em todos os casos, variando entre difusa e abundante, sendo que o componente mioepitelial apresentou positividade com uma intensidade mais fraca. Nas glândulas salivares histologicamente normais, a expressão foi observada nas áreas ductiformes.

A proteína **Beta-catenina** apresentou expressão citoplasmática em todos os casos de adenocarcinoma de células basais, variando entre difusa e abundante em toda a área tumoral. Em um dos casos foi observada expressão nuclear focal. No carcinoma mioepitelial foi observada expressão de membrana em todos os casos. No carcinoma ex-adenoma pleomórfico, foi observada expressão em padrão de membrana em todos os casos, variando entre difusa e abundante, com áreas mais fortes e fracas. Um dos casos apresentou também marcação citoplasmática. Marcação nuclear também foi observada em um caso com diferenciação basalóide. Nas glândulas salivares histologicamente normais, a expressão foi observada nas áreas ductiformes.

A proteína **Vimentina** apresentou expressão abundante no adenocarcinoma de células basais, nas células mioepiteliais circuncidando as células epiteliais centrais (que foram negativas). No carcinoma mioepitelial foi observada expressão em todos os casos, sendo que três dos quatro casos apresentaram marcação abundante, e um apresentou marcação difusa, com ausência de expressão em algumas subpopulações de células. No carcinoma ex-adenoma pleomórfico a expressão foi observada em todos os casos, com padrão difuso ou abundante nas células mioepiteliais. Não foi observada expressão nas glândulas salivares histologicamente normais.

A proteína **Ki-67** foi observada em padrão focal em um caso de adenocarcinoma de células basais, especialmente na área periférica do tumor. No carcinoma mioepitelial, foi observada de forma focal em dois casos. No carcinoma ex-adenoma pleomórfico quatro casos apresentaram expressão focal, destacando-se um caso com alto índice mitótico. Não foi observada expressão nas glândulas salivares histologicamente normais.

A expressão nuclear da proteína **p63** no adenocarcinoma de células basais foi observada em todos os casos, com padrão variável. No carcinoma mioepitelial, foi observada expressão abundante em toda a área tumoral. No carcinoma ex-adenoma pleomórfico, três casos apresentaram positividade (difusa ou focal) em toda a área tumoral. Nas glândulas salivares histologicamente normais, a expressão foi observada nas células mioepiteliais.

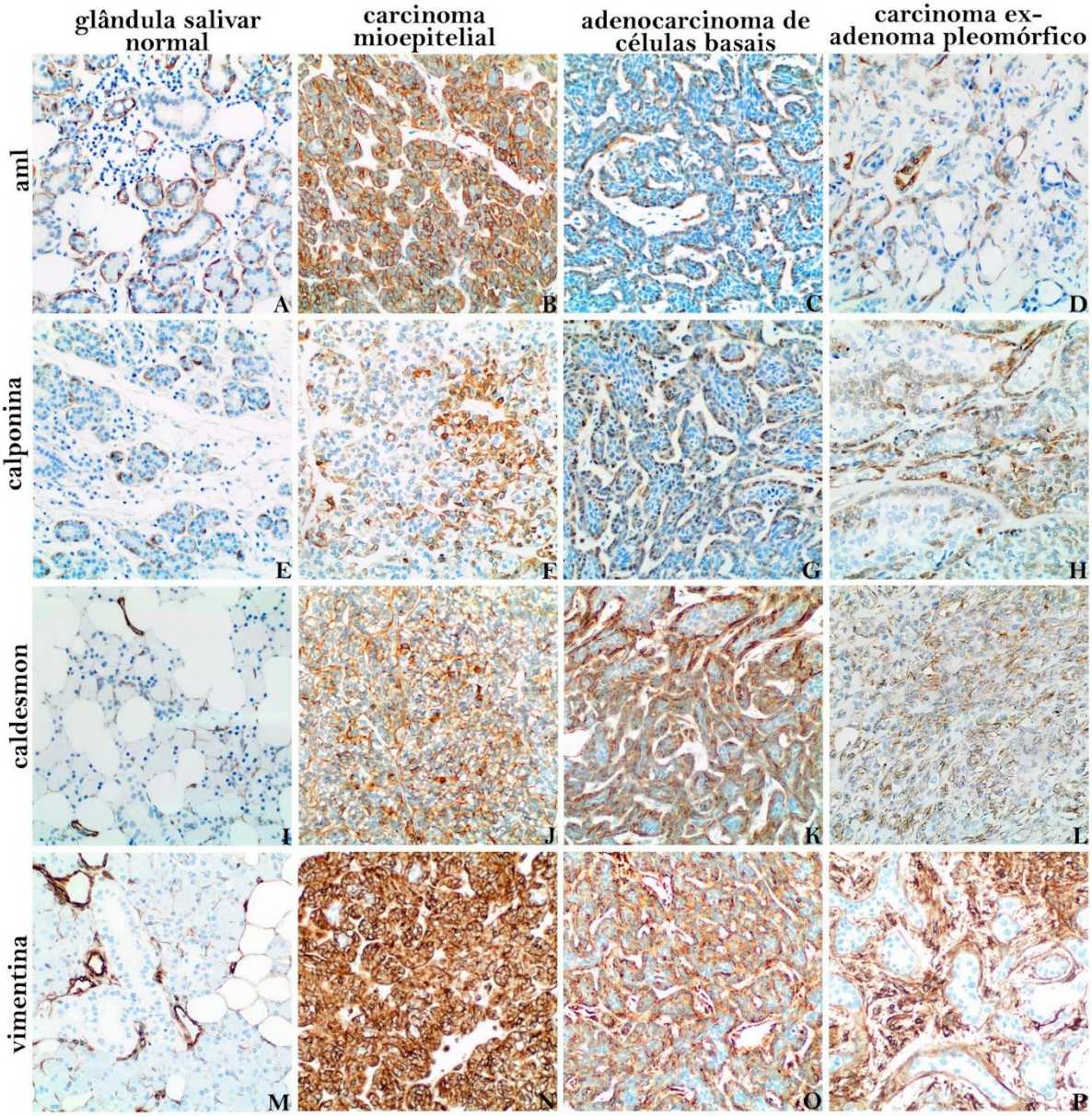

Figura 5 - Imunoexpressão das proteínas actina de músculo liso (AML), calponina, caldesmon e vimentina em amostras de glândula salivar normal e em neoplasias malignas de glândula salivar. Magnificação original X200.

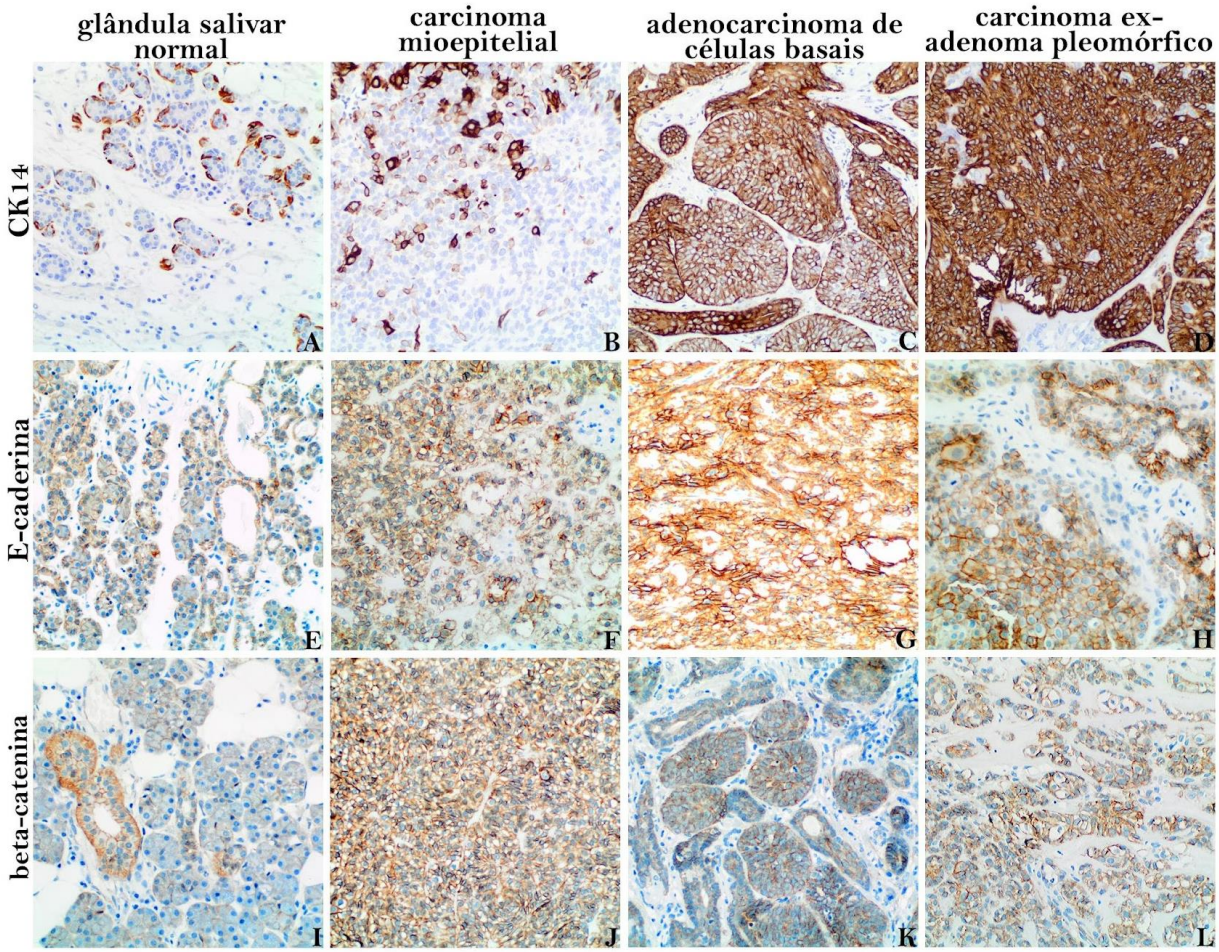

Figura 6 - Imunoexpressão das proteínas CK14, E-caderina e beta-catenina em amostras de glândula salivar normal e em neoplasias malignas de glândula salivar. Magnificação original X200.

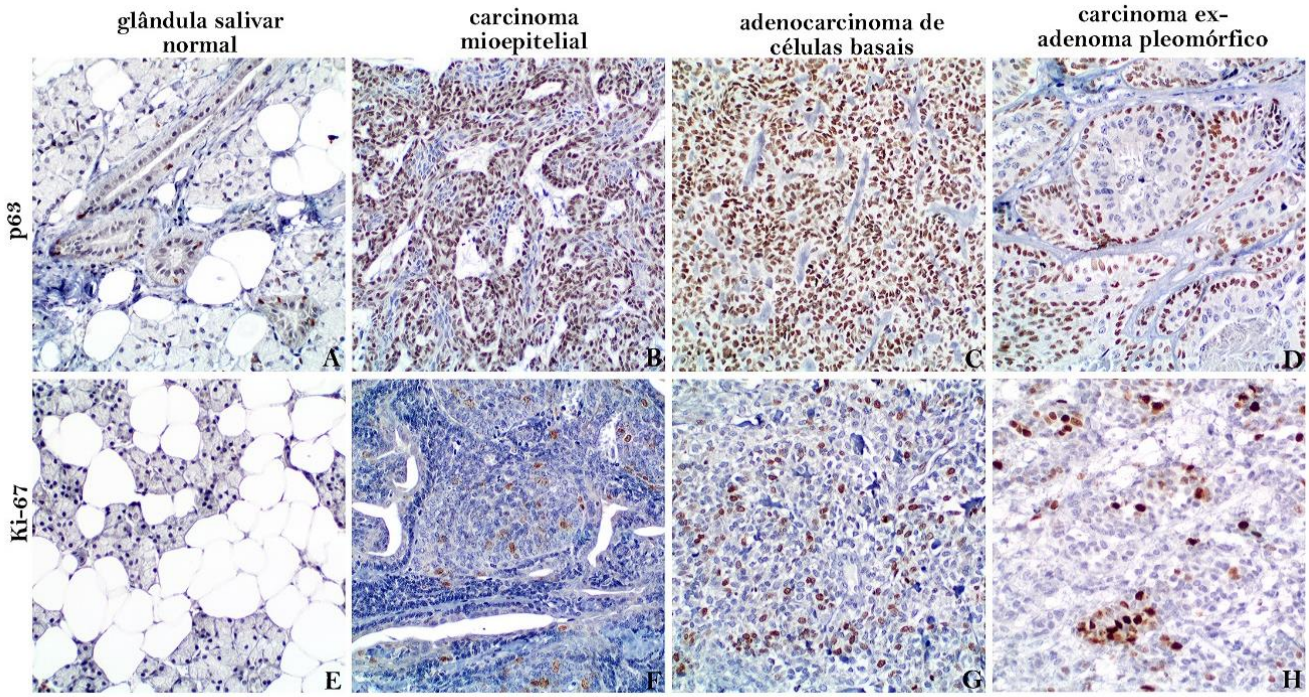

Figura 7 - Imunoexpressão das proteínas p63 e Ki-67 em amostras de glândula salivar normal e em neoplasias malignas de glândula salivar. Magnificação original X200.

Tabela 4 - Imunoexpressão das proteínas de citoesqueleto, adesão celular e proliferação em amostras de adenocarcinoma de células basais, carcinoma mioepitelial e carcinoma ex-adenoma pleomórfico

Proteína	Tumor	Negativo	Positivo focal	Positivo difuso	Positivo abundante	Total de amostras (número)*	p-valor**
Actina de músculo liso	Adenocarcinoma células basais	01	01	00	01	03	
	Carcinoma mioepitelial	01	01	01	01	04	0,517
	Carcinoma ex-adenoma	05	00	03	00	08	
Calponina	Adenocarcinoma células basais	01	01	01	00	03	
	Carcinoma mioepitelial	02	01	01	00	04	0,804
	Carcinoma ex-adenoma	05	01	02	00	08	
Caldesmon	Adenocarcinoma células basais	00	01	01	01	03	
	Carcinoma mioepitelial	00	00	04	00	04	> 0,999
	Carcinoma ex-adenoma	01	02	05	00	08	
Citoceratina 14	Adenocarcinoma células basais	00	01	00	02	03	
	Carcinoma mioepitelial	01	00	02	01	04	0,754
	Carcinoma ex-adenoma	03	02	01	02	08	
E-caderina	Adenocarcinoma células basais	00	01	00	02	03	
	Carcinoma mioepitelial	00	00	01	03	04	Não avaliável
	Carcinoma ex-adenoma	00	00	05	03	08	
Beta-catenina	Adenocarcinoma células basais	00	00	01	02	03	
	Carcinoma mioepitelial	00	00	00	04	04	Não avaliável
	Carcinoma ex-adenoma	00	00	03	05	08	
Vimentina	Adenocarcinoma células basais	00	00	01	02	03	
	Carcinoma mioepitelial	00	00	01	03	04	> 0,999
	Carcinoma ex-adenoma	01	00	02	05	08	
Ki-67	Adenocarcinoma células basais	02	01	00	00	03	
	Carcinoma mioepitelial	02	02	00	00	04	> 0,999
	Carcinoma ex-adenoma	04	04	00	00	08	
p63	Adenocarcinoma células basais	00	00	01	02	03	
	Carcinoma mioepitelial	00	00	00	03	03	0,345
	Carcinoma ex-adenoma	03	01	02	00	06	

*, o valor total de amostras pode variar de acordo com a disponibilidade de material para a realização da técnica de imunoistoquímica; **, a análise estatística foi realizada considerando a expressão negativa ou positiva (focal + difusa + abundante)

4.4 ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

Para identificar se é possível diferenciar as neoplasias de acordo com o perfil de expressão do painel de proteínas proposta neste estudo, uma análise de clusterização hierárquica foi realizada, considerando os valores de expressão semiquantitativos (Figura 8).

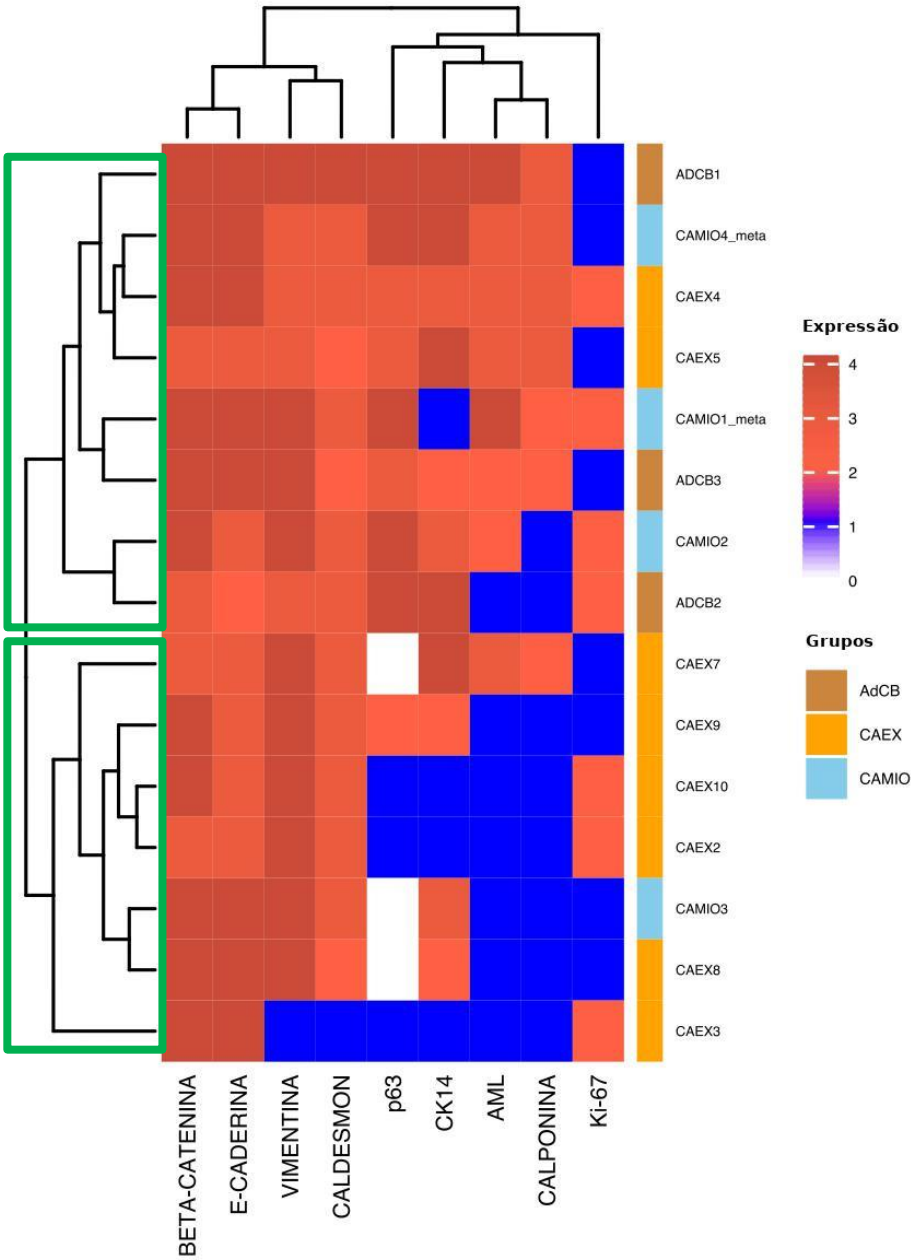

Figura 8 – Perfil de expressão das proteínas em amostras de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (amarelo), carcinoma mioepitelial (azul claro) e adenocarcinoma de células basais (marrom). A escala de expressão representa: branco, não avaliada; azul, negativo; vermelho claro, positivo focal; vermelho, positivo difuso e vermelho escuro, positivo abundante.

Por se tratar de uma análise de clusterização hierárquica não supervisionada, as amostras são agrupadas de acordo com a similaridade de expressão das proteínas e pode-se observar a separação de dois *clusters* maiores (indicados em verde na Figura 8). Em um *cluster* foi observado o agrupamento dos três casos de adenocarcinoma de células basais, três dos quatro casos de carcinoma mioepitelial e dois casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico. As amostras desse *cluster* apresentaram ausência de expressão das proteínas CK14, AML e calponina. No outro *cluster* observa-se o agrupamento de seis casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico e um caso de carcinoma mioepitelial, apresentando majoritariamente expressão das proteínas CK14, AML e calponina.

4.5 ANÁLISE ESTATISTICA

Comparando-se a expressão das proteínas nos diferentes tumores, não foi observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

Para a comparação da expressão das proteínas com os dados demográficos, clínicos e patológicos, foi considerada a casuística dos tumores de forma agrupada. Foi observada uma associação entre ausência de metástase e expressão das proteínas CK14 e p63 ($p=0,033$ e $p=0,018$, respectivamente). Para as demais características não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa. Essas análises podem ser observadas no Anexo 2.

5 DISCUSSÃO

Os tumores de glândulas salivares consistem em um grupo heterogêneo de neoplasias que apresentam grande diversidade histológica. São considerados raros, sendo a apresentação clínica variada. Essa grande variedade de apresentações morfológicas é atribuída a presença do componente mioepitelial nessas lesões (Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016; Sowa et al. 2018; Alali e Kochaji 2018).

O carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial e adenocarcinoma de células basais, são tumores malignos dentre subtipos histológicos de neoplasias provenientes do ducto intercalar das glândulas salivares e que apresentam variado componente mioepitelial (Sowa et al. 2018; Cheuk e Chan 2020). Ainda assim, cada tipo tumoral apresenta particularidades quanto à histologia, com características bem variadas, gerando um amplo espectro de lesões, sendo ainda debatida a diferenciação histológica desses tumores e sua classificação.

Nesta direção, alguns estudos vêm sendo realizados para analisar as células mioepiteliais nos tumores de glândula salivar bem como marcadores para essas células, com o intuito de melhorar a classificação e diferenciação dos subtipos tumorais. Dentre as diversas análises, alguns marcadores já usados na imunoistoquímica são proteínas presentes nas estruturas dessas células, como as moléculas de adesão celular e de citoesqueleto como: actina de músculo liso, citoceratina 14 e calponina e vimentina (Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016). Contudo, um painel para a caracterização dessas células em condições neoplásicas ou normais nos tumores de glândula salivar ainda não está estabelecido.

A **actina de músculo liso**, que é um importante componente para a motilidade e poder de contração da célula mioepitelial, e um marcador considerado diferencial (uma vez que não expresso em células epiteliais) foi pouco expressa nos casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Ogawa et al (2003), também demonstraram ausência de expressão ou expressão variável em casos de adenoma pleomórfico (contrapartida benigna do carcinoma ex-adenoma pleomórfico). Porém, segundo Ravi et al (2018) as células mioepiteliais geralmente apresentam expressão dessa proteína, sendo um marcador comumente utilizado para identificar essas células. Ainda neste estudo todos os casos de adenoma pleomórfico foram positivos para actina de músculo liso, sugerindo que a transformação maligna desses tumores acabou resultando na perda da expressão dessa proteína ou podendo ser uma característica de tipo histológico, como

visto por Alali e Kochaji (2018) onde os casos de carcinoma adenóide cístico do tipo sólido, foram negativos para AML nas células mioepiteliais. Nos casos de carcinoma mioepitelial e de adenocarcinoma de células basais, a expressão da proteína foi observada na maioria dos casos, demonstrando boa preservação das características originais. Raman e Sherlin (2019) observaram a utilidade da actina de músculo liso no diagnóstico de tumores benignos e malignos com caráter mioepitelial (adenoma pleomórfico, mioepitelioma, tumor de Warthin, carcinoma mucoepidermóide e adenoide cístico), mesmo apresentando positividade em outros componentes como miofibroblastos. Contudo, não há estudos semelhantes com as neoplasias objetos desse estudo.

A expressão da proteína **calponina**, que é uma proteína reguladora associada a actina de músculo liso, apresentou uma expressão heterogênea nos tumores, sendo que no carcinoma ex-adenoma pleomórfico, com expressão predominantemente ausente, assim como na metade dos casos de carcinoma mioepitelial. Em estudos anteriores, essa proteína é citada como um marcador sensível para células mioepiteliais neoplásicas em tumores de glândula salivar, como citado por Abdulrahman (2019). Essa proteína é importante para a determinação do potencial de motilidade dessas células tumorais, uma vez que podem interferir nas propriedades mecânicas da actina de músculo liso e na sua organização no citoesqueleto, como descrito por Ciuba et al (2018), e até mesmo afetar diversas outras atividades celulares como adesão e migração, como mencionado na revisão sobre calponinas de Liu e Jin (2016). De forma geral, a expressão de calponina acompanhou o padrão de expressão de AML.

A proteína **caldesmon**, que também é uma proteína reguladora associada a actina de músculo liso, foi observada na maioria dos casos, nos três tipos tumorais (com apenas um caso negativo). Furese et al (2005) e Ogawa et al (2003) observaram uma rara expressão ou ausência em adenoma pleomórfico, sugerindo assim, que uma possível expressão possa estar associada a células mioepiteliais alteradas e bem diferenciadas

A expressão de **CK14** foi observada na maioria dos casos neste estudo, independentemente do tipo tumoral, demonstrando que a maioria das células no ambiente tumoral preservaram sua capacidade de resistência ao estresse mecânico e integridade estrutural. Estes resultados corroboram com o estudo de Fuchs e Cleveland (1998) e Ogawa et al (2003) bem como diversos outros autores que reconhecem a presença dessa citoceratina nas células mioepiteliais. Estudo de Gao et al (2017) sugeriu que a CK14 poderia estar associada a um pior prognóstico por ser expressa na frente de invasão em carcinoma adenoide cístico.

A **E-caderina** que é uma proteína relacionada a adesão celular e envolvida diretamente com a beta-catenina, foi observada em todos os casos, apenas com áreas focais de negatividade.

A perda dessa proteína é normalmente associada ao aumento da transição epitélio mesênquima pelas células tumorais. No entanto, Phattarataratip et al (2019) demonstraram o aumento da expressão de E-caderina em tumores de glândula salivar (como adenoma pleomórfico) quando comparado a glândulas normais. Já o estudo de Andreadis et al (2006) demonstrou que a expressão de E-caderina é bem visualizada em tumores com diferenciação mioepitelial, o que corrobora os nossos resultados.

A **beta-catenina** é uma proteína envolvida com proliferação, diferenciação celular e na adesão celular juntamente com a E-caderina. Na revisão de Sowa et al (2018) foi observado que a hiperexpressão dessa proteína pode estar envolvida com o desenvolvimento de diversos tumores, bem como os de glândula salivar devido a sua associação com diversas vias de sinalização. Neste estudo, essa proteína foi observada em todos os casos independentemente do tipo tumoral, principalmente na membrana, mesmo com uma intensidade mais fraca, além de apresentar positividade nuclear em dois casos (adenocarcinoma de células basais e carcinoma ex-adenoma pleomórfico). Prakash et al (2016) pontuam que a expressão de beta-catenina pode desempenhar um papel na diferenciação histológica do adenoma pleomórfico e na transformação e progressão do carcinoma ex-adenoma pleomórfico, já que todas as amostras de adenoma pleomórfico expressaram beta-catenina, assim como para adenoma de células basais, que apresentou expressão no citoplasma e no núcleo em células estromais fusiformes. Estudo de Prado et al (2014) observou expressão diferencial entre adenoma pleomórfico e adenoma de células basais, diferentemente do que visualizamos nas versões malignas destes tumores, onde todos os casos tiveram padrão de expressão semelhante, mesmo com padrão histológico diferente. Quanto a expressão nuclear, Lee et al (2018) identificaram a presença de expressão nuclear apenas em casos de adenoma de células basais. No nosso estudo, a expressão nuclear de beta-catenina foi observada em áreas de diferenciação basaloide no carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Expressão nuclear de beta-catenina também foi observada no estudo de Isibashi et al (2018). Já o estudo de Sato et al (2017) descreve que mutações em certos genes (como CTNNB1) resultam em acúmulo de beta-catenina nuclear, levando à uma atividade anormal da via de sinalização Wnt e da expressão da proteína. Porém os mecanismos de acúmulo que levam a esta alteração ou até mesmo o rearranjo do gene MYB ainda não foram completamente esclarecidas.

A **vimentina** apresentou um padrão de positividade difuso ou abundante em todos os tumores analisados. A ampla expressão também foi observada em estudos com tumores benignos, como Stamboni (2018), Santos et al (2011) e Oh e Moon (2019) que observaram

expressão desta proteína em mioepiteliomas, nas células mioepiteliais modificadas, como por exemplo de padrão fusiforme.

Ki-67, que é um marcador bem estabelecido de proliferação celular, foi frequentemente ausente nos casos estudados, demonstrando a capacidade menos agressiva dos tumores de glândula salivar, que já é conhecida na literatura, como mencionado por Ben-izhak et al (2008). Apenas um dos casos positivos (em carcinoma ex-adenoma pleomórfico) teve uma alta taxa de células marcadas em toda área tumoral, apresentando também alto índice mitótico e marcação nuclear de beta-catenina. Ben-izhak et al (2008) descreveu associação da expressão de Ki-67 com a idade dos pacientes: pacientes mais jovens com maior índice de Ki-67, demonstraram menor taxa de sobrevida quando comparados à pacientes mais idosos com índices menores de Ki-67. A proteína ainda é mencionada no estudo realizado por Díaz et al (2019) como um bom marcador para distinção da transformação maligna de adenoma pleomórfico, para carcinoma ex-adenoma pleomórfico.

A proteína **p63**, que é um indicador de diferenciação celular, foi expressa predominantemente de forma difusa nas áreas tumorais, principalmente em células mioepiteliais nos tumores estudados. Tal padrão de expressão também foi descrito por Teixeira et al (2019) em adenoma pleomórfico. Bilal et al (2003) também observaram expressão de p63 em todos os casos de carcinoma mioepitelial. Esta proteína pode ser considerada um marcador significativo para o diagnóstico de tumores de glândulas salivares com diferenciação mioepitelial, como o caso de adenoma pleomórfico e mencionado na revisão de Sivakumar et al (2021).

Sendo assim, com nossos achados associados aos dados da literatura, podemos supor que as proteínas caldesmon, beta-catenina, citoceratina 14, E-caderina, vimentina e p63 são abundantemente expressas nos tumores com diferenciação mioepitelial, enquanto calponina, actina de músculo liso e Ki-67 apresentaram resultados bem diversos, sendo a expressão ausente na maioria dos casos.

Para verificarmos se um painel de expressão dessas proteínas poderia facilitar a classificação desses tumores, foi realizada uma análise de clusterização hierárquica não supervisionada, que consiste em uma metodologia de agrupamento, que gera classificações com base em perfis de expressão (neste estudo, proteicos), com o intuito de detectar subgrupos tumorais baseado em dados patológicos como, fenótipo e comportamento biológico (Prasad et al. 2008; Coutinho-Camillo et al. 2017).

Nossos resultados demonstraram a formação de 2 *clusters*, sendo um deles composto majoritariamente por amostras de carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Cabe ressaltar que, os

casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico selecionados para este estudo foram os que apresentaram diferenciação mioepitelial. A expressão das proteínas beta-catenina, E-caderina, caldesmon e vimentina apresentou-se de forma muito similar entre os tumores, sugerindo um perfil equivalente entre esses tumores derivados do ducto intercalar. A ausência de expressão de AML e calponina parece estar associada à separação dos grupos na análise de clusterização, sugerindo que deva ser considerada como um fator na diferenciação tumoral, uma vez que essas proteínas são rotineiramente empregadas para identificar células mioepiteliais.

As amostras de adenocarcinoma de células basais agruparam-se no mesmo *cluster*, demonstrando um perfil consistente no padrão de expressão das proteínas, apesar da casuística reduzida. Considerando o carcinoma mioepitelial, mesmo as amostras provenientes do sítio metastático apresentaram um padrão de expressão muito similar à dos tumores em sítio primário.

Na análise estatística, observamos uma associação entre a perda da expressão das proteínas CK14 e p63 e o desenvolvimento de metástases. Essas análises foram realizadas considerando-se os tumores de forma agrupada. Para as demais características demográficas, clínicas e patológicas não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa. Contudo, cabe ressaltar que a casuística deste estudo foi pequena, sendo necessária a avaliação em um maior número de casos.

6 CONCLUSÃO

- ✓ As proteínas citoceratina 14, vimentina, actina de músculo liso, calponina, caldesmon, beta-catenina, E-caderina, Ki-67 e p63 foram expressas em padrão variável nos tumores avaliados

- ✓ A análise de clusterização mostrou uma separação mais consistente das amostras de carcinoma ex-adenoma pleomórfico em comparação com o carcinoma mioepitelial adenocarcinoma de células basais

- ✓ Foi observada uma associação entre a ocorrência de metástase e a perda da expressão das proteínas CK14 e p63

7 REFERÊNCIAS

Abdulrahman SS, Mohammad DN, Hamied MA, Abdulqadir MO. Immunohistochemical evaluation of salivary gland tumors differentiation and proliferation by using calponin and telomerase. Saudi Dent J. 2019 Jan;31(1):105-114.

Adams A, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. Oral Oncol. 2013 Sep;49(9):845-853.

Andreadis D, Epivatianos A, Mireas G, Nomikos A, Poulopoulos A, Yiotakis J, Barbatis C. Immunohistochemical detection of E-cadherin in certain types of salivary gland tumours. J Laryngol Otol. 2006 Apr;120(4):298-304.

Alali F, Kochaji N. Proliferative Activity of Myoepithelial Cells in Normal Salivary Glands and Adenoid Cystic Carcinomas Based on Double Immunohistochemical Labeling. Asian Pac J Cancer Prev. 2018 Jul 27;19(7):1965-1970.

Athwal KH, Lombaert MAI. Salivary Gland Embryology, Physiology, and Stem Cell Complexity. In: Witt RL, editor. Witt. Surgery of the Salivary Glands. New York: Elsevier; 2020. p.12-18.

Ben-Izhak O, Akrish S, Nagler RM. Ki67 and salivary cancer. Cancer Invest. 2008 Dec;26(10):1015-23.

Bilal H, Handra-Luca A, Bertrand JC, Fouret PJ. P63 is expressed in basal and myoepithelial cells of human normal and tumor salivary gland tissues. J Histochem Cytochem. 2003 Feb;51(2):133-9.

Chan CL, Chen JY, Shih MC, Wang CA, Liou YM. L-caldesmon alters cell spreading and adhesion force in RANKL-induced osteoclasts. J Biomed Sci. 2019 Jan 24;26(1):12.

Cheuk W, Chan JKC. Tumors of the Salivary Glands. In: Fletcher CDM, editor. Diagnostic Histopathology of Tumors. 5th ed. New York: Elsevier; 2020. p.301-410.

Cheuk W, Chan JK. Advances in salivary gland pathology. Histopathology 2007; 51: 1–20.
Chitturi RT, Veeravarmal V, Nirmal RM, Reddy BV. Myoepithelial Cells (MEC) of the Salivary Glands in Health and Tumours. J Clin Diagn Res. 2015 Mar;9(3):ZE14-8.

Ciuba K, Hawkes W, Tojkander S, Kogan K, Engel U, Iskratsch T, Lappalainen P. Calponin-3 is critical for coordinated contractility of actin stress fibers. Sci Rep. 2018 Dec 5;8(1):17670.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Puga RD, et al. Profile of apoptotic proteins in oral squamous cell carcinoma: a cluster analysis of 171 cases. Applied Cancer Res 2017; 37:2

Covinsky M, Cai Z, Ambelil M, Liu J, Zhu H. Low Grade Carcinoma Ex-Pleomorphic Adenoma: Diagnosis and Diagnostic Challenges Caused by Fine Needle Aspiration: Report of Three Cases and Review of Literature. Head Neck Pathol. 2018 Mar;12(1):82-88.

Díaz KP, Gondak R, Martins LL, de Almeida OP, León JE, Mariano FV, Altemani A, Vargas PA. Fatty acid synthase and Ki-67 immunoexpression can be useful for the identification of malignant component in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. J Oral Pathol Med. 2019 Mar;48(3):232-238.

de Paula F, Teshima THN, Hsieh R, Souza MM, Nico MMS, Lourenco SV. Overview of Human Salivary Glands: Highlights of Morphology and Developing Processes. Anat Rec (Hoboken). 2017 Jul;300(7):1180-1188.

Dmello C, Sawant S, Alam H, Gangadaran P, Mogre S, Tiwari R, et al. Vimentin regulates differentiation switch via modulation of keratin 14 levels and their expression together correlates with poor prognosis in oral cancer patients. PLoS One. 2017 Feb 22;12(2):e0172559.

Fuchs E, Cleveland DW. Structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science 1998; 279:514-19.

Furuse C, Sousa SO, Nunes FD, Magalhães MH, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. Int J Surg Pathol. 2005 Jan;13(1):57-65.

Gao XL, Wu JS, Cao MX, Gao SY, Cen X, Jiang YP, et al. Cytokeratin-14 contributes to collective invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. PLoS One. 2017 Feb 2;12(2):e0171341.

Genelhu MC, Gobbi H, Soares FA, Campos AH, Ribeiro CA, Cassali GD. Immunohistochemical expression of p63 in pleomorphic adenomas and carcinomas ex-pleomorphic adenomas of salivary glands. Oral Oncol. 2006 Feb;42(2):154-60.

Ghannam MG, Singh P. Anatomy, head and neck, salivary glands. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. Last Update: February 19 2019. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538325/.

Hernandez-Prera JC, Skálová A, Franchi A, Rinaldo A, Vander Poorten V, Zbären P, Ferlito A, Wenig BM. Pleomorphic adenoma: the great mimicker of malignancy. Histopathology. 2020 Dec 27.

Ianez RF, Buim ME, Coutinho-Camillo CM, Schultz R, Soares FA, Lourenço SV. Human salivary gland morphogenesis: myoepithelial cell maturation assessed by immunohistochemical markers. Histopathology. 2010 Sep;57(3):410-7.

Ishibashi K, Ishii K, Sugiyama G, Kamata YU, Suzuki A, Kumamaru W, et al. Regulation of β-Catenin Phosphorylation by PR55β in Adenoid Cystic Carcinoma. Cancer Genomics Proteomics. 2018 Jan-Feb;15(1):53-60.

Jaeger RG, Freitas VM. Histologia das glândulas salivares. In: Oriá RB, Brito GAC, editores. Sistema Digestório: integração básico-clínica. São Paulo: Blucher; 2016. p. 227-246.

Jin J, He XY. Basal cell adenocarcinoma of the nasopharyngeal minor salivary glands: a case report and review of the literature. BMC Cancer. 2018 Sep 10;18(1):878.

Jo VY. Myoepithelial Tumors: An Update. Surg Pathol Clin. 2015;8(3):445-66.

Katabi N, Xu B, Jungbluth AA, et al. PLAG1 immunohistochemistry is a sensitive marker for pleomorphic adenoma: a comparative study with PLAG1 genetic abnormalities. Histopathology 2018; 72:285-93.

Kessler AT, Bhatt AA. Review of the Major and Minor Salivary Glands, Part 2: Neoplasms and Tumor-like Lesions. J Clin Imaging Sci. 2018 Nov 15;8:48.

Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 Jan;50(1):1-6.

Lee YH, Huang WC, Hsieh MS. CTNNB1 mutations in basal cell adenoma of the salivary gland. J Formos Med Assoc. 2018 Oct;117(10):894-901.

Li YP, Jia XP, Jiang YQ, Wang W, Wang YL, Wang XL, Guo YX. Differential expression of cytokeratin 14 and 18 in bladder cancer tumorigenesis. Exp Biol Med (Maywood). 2018 Feb;243(4):344-349.

Lin HH, Limesand KH, Ann DK. Current State of Knowledge on Salivary Gland Cancers. Crit Rev Oncog. 2018;23(3-4):139-151.

Liu R, Jin JP. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. Gene. 2016 Jul 1;585(1):143-153.

Liu Y, Wu X, Wang G, Hu S, Zhang Y, Zhao S. CALD1, CNN1, and TAGLN identified as potential prognostic molecular markers of bladder cancer by bioinformatics analysis. Medicine (Baltimore). 2019 Jan;98(2):e13847.

Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Uyekita SH, Soares FA. Human salivary gland branching morphogenesis: morphological localization of claudins and its parallel relation with developmental stages revealed by expression of cytoskeleton and secretion markers. Histochem Cell Biol. 2007 Oct;128(4):361-9.

Mansy M, Soliman M, Mubarak R, Shamel M. The role of exogenous epidermal growth factor on Ki-67 proliferation marker expression in the submandibular salivary gland of albino rats receiving doxorubicin. F1000Res. 2020 Dec 3;9:1393.

Mayanagi T, Morita T, Hayashi K, Fukumoto K, Sobue K. Glucocorticoid receptor-mediated expression of caldesmon regulates cell migration via the reorganization of the actin cytoskeleton. J Biol Chem. 2008 Nov 7;283(45):31183-96.

Meyer MT, Watermann C, Dreyer T, Ergün S, Karnati S. 2021 Update on Diagnostic Markers and Translocation in Salivary Gland Tumors. Int J Mol Sci. 2021 Jun 24;22(13):6771.

Miletich I. Introduction to salivary glands: structure, function and embryonic development. Front Oral Biol. 2010;14:1-20.

Mutlu A, Ozturk M, Akpinar G, Kasap M, Kanli A. Proteomics analysis of pleomorphic adenoma of the human parotid gland. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2017 Aug;274(8):3183-3195.

Nanci, Antonio. Salivary gland. In: Ten Cate AR, editor. Oral histology. 8 th ed. St. Louis: Mosby; 2013. p.290-317.

Nicholas RG, Hanson JA, Meiklejohn DA. Myoepithelial Cell Carcinoma of the Oral Tongue: Case Report and Review of the Literature. Clin Med Insights Oncol. 2019 Apr 2;13:1179554919838254.

Noel L, Medford S, Islam S, Muddeen A, Greaves W, Juman S. Epidemiology of salivary gland tumours in an Eastern Caribbean nation: A retrospective study. Ann Med Surg (Lond). 2018 Nov 8;36:148-151.

Ogawa Y. Immunohistochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. Progr Histochem Cytochem 2003; 38:343-426.

Oh SJ, Moon D. Spindle cell myoepithelioma of the parotid gland. Arch Craniofac Surg. 2019 Oct;20(5):336-340.

Okano K, Ishida M, Sandoh K, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K. Cytological features of carcinoma ex pleomorphic adenoma of the salivary glands: A diagnostic challenge. Diagn Cytopathol. 2020 Feb;48(2):149-153.

Oyama Y, Nishida H, Kusaba T, Kadowaki H, Arakane M, Wada J, et al. Difference in transducin-like enhancer of split 1 protein expression between basal cell adenomas and basal cell adenocarcinomas - an immunohistochemical study. Diagn Pathol. 2018 Jul 27;13(1):48.

Phattarataratip E, Kositkittiwanit N, Kajornkiatkul P, Yeunyong P, Ratanapitak R. P120 catenin expression and its correlation with E-cadherin in salivary gland neoplasms. J Oral Biol Craniofac Res. 2019 Jan-Mar;9(1):57-62.

Prado RF, Cardoso CL, Consolaro A, Taveira LAA. Pleomorphic Adenoma versus Basal Cell Adenoma: An immunohistochemical analysis with β-catenin. Brazilian Dental Science. 2014 Jan-Mar;17(1).

Prakash S, Swaminathan U, Nagamalini BR, Krishnamurthy AB. Beta-catenin in disease. J Oral Maxillofac Pathol. 2016 May-Aug;20(2):289-99.

Prasad ML, Barbacioru CC, Rawal YB, Husein O, Wen P. Hierarchical cluster analysis of myoepithelial/basal cell markers in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. Mod Pathol 2008; 21:105-14.

Rao RS, Patil S, Amrutha N, Sanketh D, Agarwal A. The ambiguous salivary myoepithelial cells. J Contemp Dent Pract. 2014 Jul 1;15(4):523-8.

Ravi M, Boaz K, Natarajan S, Lewis A, Prasad M, Yellapurkar S. Expression of α-smooth muscle actin in benign and malignant salivary gland tumors: Na immunohistochemical study. Indian J Pathol Microbiol. 2018 Oct-Dec;61(4):479-484.

Raman S, Sherlin HJ. Utility of smooth muscle actin and CD117 as reliable markers in the diagnosis of salivary gland neoplasms. J Oral Maxillofac Pathol. 2019 May-Aug;23(2):218-223.

Robinson RA. Basal Cell Adenoma and Basal Cell Adenocarcinoma. Surg Pathol Clin. 2021 Mar;14(1):25-42.

Sato M, Yamamoto H, Hatanaka Y, Nishijima T, Jiromaru R, Yasumatsu R, et al. Wnt/β-catenin signal alteration and its diagnostic utility in basal cell adenoma and histologically similar tumors of the salivary gland. Pathol Res Pract. 2018 Apr;214(4):586-592.

Santos EP, Cavalcante DR, Melo AU, Pereira JC, Gomes MZ, Albuquerque RL Jr. Plasmacytoid myoepithelioma of minor salivary glands: report of case with emphasis in the immunohistochemical findings. Head Face Med. 2011 Dec 12;7:24.

Scarini JF, Egal ESA, de Lima-Souza RA, Crescencio LR, Emerick C, Kowalski LP, et al. Two sides of the same coin: Insights into the myoepithelial cells in carcinoma ex pleomorphic adenoma development. Crit Rev Oncol Hematol. 2021 Jan;157:103195.

Shah AA, Mulla AF, Mayank M. Pathophysiology of myoepithelial cells in salivary glands. J Oral Maxillofac Pathol. 2016; 20 (3): 480-490.

Seok J, Hyun SJ, Jeong WJ, Ahn SH, Kim H, Jung YH. The Difference in the Clinical Features Between Carcinoma ex Pleomorphic Adenoma and Pleomorphic Adenoma. Ear Nose Throat J. 2019 Sep;98(8):504-509.

Sivakumar N, Narwal A, Pandiar D, Devi A, Anand R, Bansal D,et al. Diagnostic utility of p63/p40 in the histological differentiation of salivary gland tumors: a systematic review. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology. 2021 Jul. Published Elsevier.

Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, Dulic V, Fisher D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. Cancer Res. 2017 May 15;77(10):2722-2734.

Sowa P, Goroszkiewicz K, Szydelko J, Chechlinska J, Pluta K, Domka W, et al. A Review of Selected Factors of Salivary Gland Tumour Formation and Malignant Transformation. Biomed Res Int. 2018 Aug 1;2018:2897827.

Stamboni HB. Assinatura imunoistoquíca das células mioepiteliais em neoplasias benignas de glândulas salivares. [Tese] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2018.

Tang DD, Gerlach BD. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. Respir Res. 2017 Apr 8;18(1):54.

Teixeira LN, Janner ÉC, Teixeira T, Passador-Santos F, Martinez EF, Demasi APD, et al. Comparison of p63/p40 Expression With Myoepithelial Markers in Minor Salivary Gland Tumors. Int J Surg Pathol. 2019 Jun;27(4):360-371.

Xiang C, Chen J, Fu P. HGF/Met Signaling in Cancer Invasion: The Impact on Cytoskeleton Remodeling. Cancers (Basel). 2017;9(5):44. Published 2017 May 5.

Xie Y, Li P, Gao Y, Gu L, Chen L, Fan Y, et al. Reduced E-cadherin expression is correlated with poor prognosis in patients with bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 2017 Aug 4;8(37):62489-62499.
Xu B, Katabi N. Myoepithelial Carcinoma. Surg Pathol Clin. 2021 Mar;14(1):67-73.

Yin LX, Ha PK. Genetic alterations in salivary gland cancers. Cancer. 2016 Jun 15;122(12):1822-31.

Zeitouni NC, Huang DD, Row D. An Unusual Presentation and Aggressive Course of Metastatic Myoepithelial Carcinoma. J Clin Aesthet Dermatol. 2019 Sep;12(9):46-48.

Zeng P, Sun S, Li R, Xiao ZX, Chen H. HER2 Upregulates ATF4 to Promote Cell Migration via Activation of ZEB1 and Downregulation of E-Cadherin. Int J Mol Sci. 2019 May 6;20(9). pii: E2223.

Anexo 1 – Documento com a aprovação do projeto no comitê de ética em pesquisa.

A.C.Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

São Paulo, 11 de setembro de 2019.

Á
Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo
Aluna: Carolinne Alves de Oliveira (Mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2706/19B
"Perfil do componente mioepitelial em neoplasias de glândulas salivares."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **03/09/2019**, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado: "Perfil do componente mioepitelial em neoplasias derivadas do ducto intercalar da glândula salivar." registrado neste CEP sob nº. 2706/19. O projeto afiliado em referência será Mestrado da aluna *Carolinne Alves de Oliveira*, sob orientação do *Dr. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo*.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caíres Serrano
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Associação entre expressão proteica e características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma ex adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial e adenocarcinoma de células basais

		AML		Calponina		Caldesmon		CK14		E-caderina	
Característica	**Categoria**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**
Gênero	**Masculino**	2 (25,0%)	2 (28,6%)	2 (28,6%)	2 (25,0%)	3 (21,4%)	1 (100%)	3 (27,3%)	1 (25,0%)	4 (26,7%)	N/A (0%)
	Feminino	6 (75,0%)	5 (71,4%)	5 (71,4%)	6 (75,0%)	11 (78,6%)	0 (0,0%)	8 (72,7%)	3 (75,0%)	11(73,3%)	N/A (0%)
		p>0,999		p>0,999		p=0,267		p>0,999		N/A*	
Local do Tumor	**Parótida**	4 (50,0%)	6 (85,7%)	4 (57,1%)	6 (75,0%)	9 (64,3%)	1 (100%)	8 (72,7%)	2 (50,0%)	10(66,7%)	N/A (0%)
	Glând. Menores	1 (12,5%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (7,1%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	N/A (0%)
	Submandibular	1 (12,5%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)	2 (25,0%)	2 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	1 (25,0%)	2 (13,3%)	N/A (0%)
	Sítio Metastático	2 (25,0%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)	0 (0,0%)	2 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	1 (25,0%)	2 (13,3%)	N/A (0%)
		p=0,556		p=0,142		p>0,999		p=0,495		N/A	
Embolização Vascular	**Sim**	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)
	Não	3 (100%)	5 (100%)	3 (100%)	5 (100%)	7 (100%)	1 (100%)	6 (100%)	2 (100%)	8 (100%)	N/A (0%)
		N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
Invasão perineural	**Sim**	0 (0,0%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	1 (100%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)	1 (11,1%)	N/A (0%)
	Não	3 (100%)	5 (83,3%)	3 (100%)	5 (83,3%)	8 (100%)	0 (0,0%)	7 (100%)	1 (50,0%)	8 (88,9%)	N/A (0%)
		p>0,999		p>0,999		p=0,111		p=0,222		N/A	
Linfonodo comprometido	**Sim**	1 (25,0%)	1 (20,0%)	1 (25,0%)	1 (20,0%)	1 (12,5%)	1 (100%)	1 (20,0%)	1 (25,0%)	2 (22,2%)	N/A (0%)
	Não	3 (75,0%)	4 (80,0%)	3 (75,0%)	4 (80,0%)	7 (87,5%)	0 (0,0%)	4 (80,0%)	3 (75,0%)	7 (77,8%)	N/A (0%)
		p>0,999		p>0,999		p=0,222		p>0,999		N/A	
Recidiva	**Sim**	2 (25,0%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)	2 (14,3%)	N/A (0%)	2 (18,2%)	0 (0,0%)	2 (14,3%)	N/A (0%)
	Não	6 (75,0%)	6 (100%)	6 (85,7%)	6 (85,7%)	12 (85,7%)	N/A (0%)	9 (81,8%)	3 (100%)	12(85,7%)	N/A (0%)
		p=0,473		p>0,999		N/A		p>0,999		N/A	
Metástase	**Sim**	0 (0,0%)	2 (33,3%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)	2 (14,3%)	N/A (0%)	0 (0,0%)	2 (66,7%)	2 (14,3%)	N/A (0%)
	Não	8 (100%)	4 (66,7%)	7 (100%)	5 (71,4%)	12(85,7%)	N/A (0%)	11 (100%)	1 (33,3%)	12(85,7%)	N/A (0%)
		p=0,165		p=0,462		N/A		**p=0,033**		N/A	

*N/A = Não avaliável

Anexo 2. Continuação

		Beta-catenina		Vimentina		Ki-67		p63	
Característica	**Categoria**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**
Gênero	**Masculino**	4 (26,7%)	N/A (0%)	3 (21,4%)	1 (100%)	1 (14,3%)	3 (37,5%)	1 (11,1%)	1 (33,3%)
	Feminino	11(73,3%)	N/A (0%)	11 (78,6%)	0 (0,0%)	6 (85,7%)	5 (62,5%)	8 (88,9%)	2 (66,7%)
		N/A		p=0,267		p=0,569		p=0,455	
Local do Tumor	**Parótida**	10(66,7%)	N/A (0%)	9 (64,3%)	1 (100%)	4 (57,1%)	6 (75,0%)	6 (66,7%)	2 (66,7%)
	Glând. Menores	1 (6,7%)	N/A (0%)	1 (7,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (12,5%)	N/A (0%)	N/A (0%)
	Submandibular	2 (13,3%)	N/A (0%)	2 (14,3%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)	0 (0,0%)	1 (11,1%)	1 (33,3%)
	Sítio Metastático	2 (13,3%)	N/A (0%)	2 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)	1 (12,5%)	2 (22,2%)	0 (0,0%)
		N/A		p>0,999		p=0,556		p>0,999	
Embolização Vascular	**Sim**	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)	N/A (0%)
	Não	8 (100%)	N/A (0%)	7 (100%)	1 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	5 (100%)	2 (100%)
		N/A		N/A		N/A		N/A	
Invasão perineural	**Sim**	1 (11,1%)	N/A (0%)	0 (0,0%)	1 (100%)	1 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
	Não	8 (88,9%)	N/A (0%)	8 (100%)	0 (0,0%)	3 (75,0%)	5 (100%)	5 (100%)	1 (50,0%)
		N/A		p=0,111		p=0,444		p=0,286	
Linfonodo comprometido	**Sim**	2 (22,2%)	N/A (0%)	1 (12,5%)	1 (100%)	1 (16,7%)	1 (33,3%)	1 (16,7%)	1 (33,3%)
	Não	7 (77,8%)	N/A (0%)	7 (87,5%)	0 (0,0%)	5 (83,3%)	2 (66,7%)	5 (83,3%)	2 (66,7%)
		N/A		p=0,222		p>0,999		p>0,999	
Recidiva	**Sim**	2 (14,3%)	N/A (0%)	2 (14,3%)	N/A (0%)	1 (16,7%)	1 (12,5%)	2 (22,2%)	0 (0,0%)
	Não	12(85,7%)	N/A (0%)	12(85,7%)	N/A (0%)	5 (83,3%)	7 (87,5%)	7 (77,8%)	2 (100%)
		N/A		N/A		p>0,999		p>0,999	
Metástase	**Sim**	2 (14,3%)	N/A (0%)	2 (14,3%)	N/A (0%)	2 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (100%)
	Não	12(85,7%)	N/A (0%)	12 (85,7%)	N/A (0%)	4 (66,7%)	8 (100%)	9 (100%)	0 (0,0%)
		N/A		N/A		p=0,165		**p=0,018**	

*N/A = Não avaliável