GLAUBER BAREIA LIBERATO DA ROCHA Estudo clínico-patológico do carcinoma de células claras de glândula salivar.

GLAUBER BAREIA LIBERATO DA ROCHA

Estudo clínico-patológico do carcinoma de células claras de glândula salivar

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências Odontológicas

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientadora: Profa. Dra. Suzana C. Orsini

Machado de Sousa

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

Catalogação-na-Publicação Serviço de Documentação Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rocha, Glauber Bareia Liberato da .

Estudo clínico-patológico do carcinoma de células claras de glândula salivar / Glauber Bareia Liberato da Rocha ; orientador Suzana C. Orsini Machado de Sousa. -- São Paulo, 2019.

73 p.: tab., fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Versão corrigida

Carcinoma. 2. Glândulas salivares. 3. Adenocarcinoma de células claras.
Sousa, Susana C. Orsini Machado de. II. Título.

Rocha GBL. Estudo clínico-patológico do carcinoma de células claras de glândula salivar. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Aprovado em: 22 /07/ 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior

Instituição: Professor de Patologia Bucal da faculdade de Odontologia da USP-SP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Marcelo Minharro Cecchetti

Instituição: Assistente do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da USP-SP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Bruno Tavares Sedassari

Instituição: Professor da Faculdade de Medicina da Universidade Nove de Julho

UNINOVE

Julgamento: Aprovado

Dedico essa dissertação de mestrado a minha esposa Vivian Macedo da Rocha por todo o apoio incondicional que me foi dado, mostrando que se queremos algo melhor precisamos de responsabilidade, dedicação e amor, dedico também a minha família e amigos que também me apoiaram, em especial aos meus pais Sebastião e Maria, e minha tia Inês.

AGRADECIMENTOS

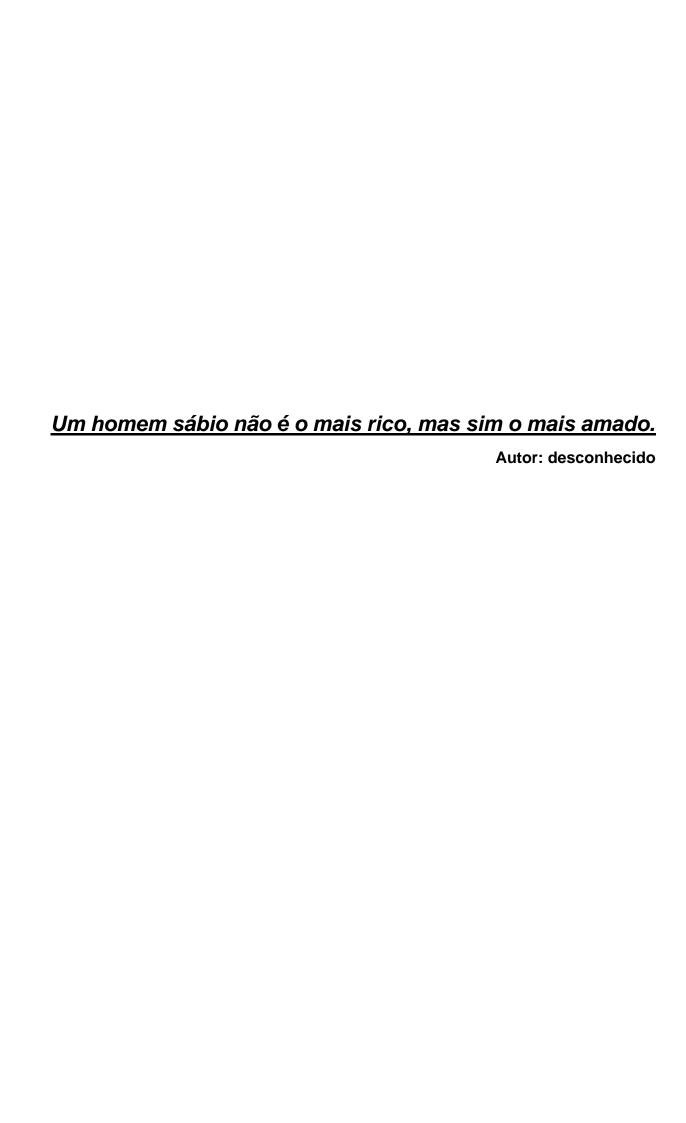
Agradeço a Professora Dra. Suzana C. Orsini Machado de Sousa, professora da pós-graduação da Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por ter aceito ser minha orientadora e estimular a estudar procurando sempre a excelência.

Agradeço ao professor Dr. Fabio Daumas Nunes, professor da pós-graduação da Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, responsável pelo Laboratório de Patologia Molecular, por orientar e disponibilizar o laboratório para realização desse estudo.

Agradeço a todos os professores da pós-graduação Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pelos ensinamentos e aos meus colegas de pós-graduação pela amizade e companheirismo, mostrando que há vários caminhos para se alcançar o melhor resultado.

Agradeço a Dra. Maria Paula Siqueira Perez, ao Dr. Gustavo Grothe Machado e a todos os meus colegas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo incentivo e apoio para eu ingressar na pósgraduação.

Agradeço ao Juvani Lago Saturno e a Eliza dos Santos biólogos que me auxiliaram em todos os experimentos realizados para a confecção desse estudo e todos os funcionários da Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da USP pela ajuda e apoio.



RESUMO

Rocha GBL. Estudo clínico-patológico do carcinoma de células claras de glândula salivar [dissertaçãoo]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia 2019 Versão Corrigida.

Na classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2017 foram relatados 11 tipos de neoplasias benignas e 20 tipos de neoplasias malignas das glândulas salivares. Dentre estes últimos está o carcinoma de células claras de glândula salivar, uma neoplasia rara que corresponde a menos de 1% dos carcinomas de glândulas salivares. Tem no seu aspecto histológico semelhança com outras neoplasias que também apresentam células claras, tendo a imuno-histoquímica e os testes moleculares importante papel para seu diagnóstico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os aspectos histopatológicos, imuno-histoquímicos e biomoleculares, correlacionando com aspectos clínicos, dos casos carcinomas de células claras de glândula salivar, diagnosticados no serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP) diagnosticados no período entre 1997 e 2018. Em todos os casos foram avaliados os cortes histológicos, reações de imuno-histoquímica para citoqueratinas 7 e 14 (CK7 e CK14), proteína p63, proteína S-100 e actina de musculo liso (SMA), além de teste molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para pesquisa da expressão do gene de fusão EWSR1-ATF1. No levantamento dos casos do serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de odontologia da USP no período de 1997 até 2018 observamos 11 lesões com as características histológicas e imuno-histoquímicas para se caracterizar como carcinoma de células claras de glândulas salivares, sendo 81,81% em mulheres, 77,77% de cor da pele branca, média de idade 56,42 anos e as regiões mais acometidas foram o palato e a mucosa jugal com 36,36% dos casos cada. Histologicamente nove casos apresentavam hialinização; e invasão neural e necrose estavam presentes em 6 e 2 dos casos respectivamente. Todos os casos foram positivos para ácido periódico-Schiff (PAS), e na imuno-histoquímica CK7 e CK14 estavam presentes em todos os casos, assim como p63. Já S-100 e SMA foram negativos em todos. No teste molecular de PCR apenas duas lesões mostraram o gene de fusão EWSR1-ATF1. Concluímos que o carcinoma de células claras é mais prevalente em mulheres com idade entre 50 e 60 anos, com predileção pelo palato. A histologia associada à imuno-histoquímica muitas vezes é suficiente para se fechar esse diagnóstico, por se tratar de uma lesão com um só tipo celular. A hialinização nem sempre está presente na lesão e a invasão neural é muito comum. Os testes moleculares devem ser utilizados como auxilio no diagnóstico, e o resultado da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene EWSR1-ATF1 é fiel apenas em lesões recentes.

Palavras-chave: Carcinoma. Glândulas salivares. Adenocarcinoma de células claras.

ABSTRACT

Rocha GBL. Clinical pathological study of clear cell carcinoma of the salivary gland. [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia 2019 Corrected Version.

The 2017 classification organized by the World Health Organization (WHO) has reported 11 types of benign tumors and 20 types of malignant tumors of the salivary glands. Among the latter, clear cell carcinoma of the salivary gland represents a rare type of tumor that corresponds to less than 1% of all salivary gland carcinomas. Its histological aspect resembles other tumors that also present clear cells. Therefore, immunohistochemical and molecular tests play an important role for its diagnosis. The objective of the current study was to evaluate the histopathological, immunohistochemical and biomolecular aspects by correlating these information with the clinical features of clear salivary gland cell carcinomas cases that were diagnosed between 1997 and 2018 by the Oral and Maxillofacial Pathology Service of the São Paulo School of Dentistry. Universidade de Histological immunohistochemical reactions for cytokeratins 7 and 14 (CK7 and CK14), p63 protein, S-100 protein and smooth muscle actin (SMA) were evaluated in all cases. In addition, real-time molecular polymerase chain reaction (PCR) tests for EWSR1-ATF1 fusion gene expression were performed. In the survey conducted at the Oral and Maxillofacial Pathology service of the Universidade de São Paulo School of Dentistry 1997 and 2018, we identified 11 lesions with histological and between immunohistochemical characteristics that might characterize as clear cell carcinoma of salivary glands. These lesions furnished the following data: 81.81% of the cases occurred in female subjects, 77.77% were Caucasian, the mean age was 56.42 years and the most frequently affected regions were the palate and the inner cheek buccal mucosa, with 36.36% of the cases each. Histological analyses resulted in nine cases of hyalinization, 6 cases of neural invasion and 2 cases of necrosis. All cases were positive for periodic acid-Schiff (PAS). Immunohistochemical markers CK7, CK14 and p63 were present in all cases, while S-100 and SMA were negative at all. In the molecular PCR test, only two lesions exhibited the EWSR1-ATF1 fusion gene. We concluded that clear cell carcinoma is more prevalent in women aged between 50 and 60 years, with predilection for the palate area. The histolopathological assessment associated with immunohistochemical expression provide enough information to close the diagnosis, because this is a lesion with a single type of cell. Hyalinization is not always present in the lesion and neural invasion is very frequent. Molecular testing might be considered as a diagnostic aid, and the polymerase chain reaction (PCR) result for the EWSR1-ATF1 gene is applicable only in more recent lesions.

Keywords: Carcinoma. Salivary glands. Adenocarcinoma, clear cell.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE1/AE3 citoqueratinas AE1/AE3

AFIP Associação de Patologia das Forças Armadas

AMP adenosina 3',5'-monofosfato

°C graus Celsius

cDNA ácido desoxirribonucleico complementar

CK7 citoqueratina 7

CK14 citoqueratina 14

DNA ácido desoxirribonucleico

EMA antígeno epitelial de membrana

FISH hibridização fluorescente in situ

OMS Organização Mundial de Saúde

p63 proteína p63

PAS ácido periódico-Schiff

PCR reação em cadeia da polimerase

RNA ácido ribonucleico

rcf força centrifuga relativa

S-100 proteína S-100

SMA Actina de músculo liso

USP Universidade de São Paulo

μl microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Histórico	21
2.2	Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos	31
2.3	Testes moleculares	38
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Histológico e imuno-histoquímico	47
4.2	PCR em tempo real	49
4.2.1	Isolamento do RNA	49
4.2.2	Síntese do cDNA	50
4.2.3	PCR em tempo real	51
4.2.4	Eletroforese	51
5	RESULTADOS	53
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO A	75

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias de glândulas salivares correspondem a 0,5% das neoplasias humanos. Em região de cabeça e pescoço correspondem de 3 a 5% de todas as neoplasias, e, em relação à glândula salivar afetada, apenas 15% ocorrem em glândulas salivares menores. (1-3)

A neoplasia benigna mais comum de glândulas salivares é o adenoma pleomórfico e a neoplasia maligna mais comum é o carcinoma mucoepidermoide. (3) Na última classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) foram relatados 11 tipos de neoplasias benignas e 20 tipos de neoplasias malignas das glândulas salivares, tendo os testes moleculares um papel importante para a definição de diagnóstico de alguns dessas neoplasias. (1-3)

O carcinoma de células claras de glândula salivar é uma lesão rara e corresponde a menos de 1% dos carcinomas de glândula salivar. Histologicamente seu aspecto é semelhante a várias neoplasias que podem apresentar-se com células claras como, oncocitoma de células claras, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma epitelial mioepitelial, mioepitelioma de células claras, carcinoma mioepitelial, carcinoma de células acinares, metástase de carcinoma renal de células claras e melanoma de células claras. Desta forma, muitas vezes o diagnóstico diferencial apenas em bases morfológicas torna-se difícil, sendo necessário o uso de métodos complementares como imuno-histoquímica ou biologia molecular, esta última que vem cada vez mais ocupando lugar de destaque na elucidação de diagnósticos ou do comportamento biológico das neoplasias . (1,3-6)

Em um estudo mais focado nessa lesão, Milchgrub et al. (4), descreveram uma série de casos, enfatizando algumas características histológicas da lesão como a distribuição das células e seu estroma hialino, além de traçar um perfil imuno-histoquímico característico.(4) Nesse artigo, a lesão de células claras foi chamada pela primeira vez de carcinoma de células claras hialinizante de glândulas salivares.(1,7,8) Mesmo após isso a lesão não foi aceita diretamente pela OMS e só chegou a ser reconhecida como Carcinoma de células claras de glândulas salivares na última classificação de 2017. (9) O reconhecimento dessa lesão em grande parte se deve aos achados de Antonescu et al. (10) que observaram em seus testes moleculares a presença do gene de fusão EWSR1-ATF1 em 82% dos casos. Tal gene não é observado em outra lesão de glândula salivar, o que tornou a lesão mais fácil

de ser diagnosticada, e na classificação da OMS é relatado que a presença desse gene caracteriza o diagnóstico dessa lesão. (9,10)

Outra lesão que apresenta esse gene de fusão é o carcinoma odontogênico de células claras. Essa lesão apresenta as mesmas características histológicas e imuno-histoquímicas que o carcinoma de células claras de glândula salivar, então os aspectos clínicos são muito importantes para esse diagnostico já que a primeira lesão é intra-óssea e a segunda apenas em mucosa. (11)

Diante do exposto e com intenção de auxiliar nos parâmetros de diagnóstico do carcinoma de células claras propomos esse trabalho retrospectivo dos casos assim diagnosticados no serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da USP.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

Desde 1983 já existem publicações de artigos relacionados ao carcinoma de células claras das glândulas salivares, como o de Chen (1). Nesse artigo o autor considera que o carcinoma de células claras poderia apresentar-se sob dois tipos histológicos, sendo uma variante monomórfica (variante sólida composta de cordões e ninhos de células claras) e uma variante polimórfica (composta de túbulos lineares e não lineares de células claras e células eosinofílicas), podendo ser ou não rico em glicogênio. O artigo descreve um caso de paciente do sexo feminino, 66 anos, apresentando uma lesão próxima da orelha direita e evolução de dois anos. Histologicamente a lesão apresentava a característica bimórfica, sendo positiva para ácido periódico-Schiff (PAS), demonstrando-se rica em glicogênio. Em sua discussão o autor relata que a variante bimórfica é descrita num estudo alemão de Feyrter que relata dois casos de carcinomas de células claras ricos em glicogênio, os dois casos com boa evolução após a ressecção da lesão. Ainda relata que dois entre os cinco casos descritos por Kleinsasser como carcinoma do ducto salivar, apresentavam características semelhantes aos carcinomas de células claras. Também é relatado que dois estudos de 1972 apresentavam casos semelhantes ao descrito por ele, porém com a nomenclatura de carcinoma epitelial-mioepitelial. Então o autor mostra os dados epidemiológicos dos 14 casos, como se correspondessem a uma única lesão e coloca que foram prevalentes na glândula parótida e em mulheres, com idade média de 58 anos.(1-3)

Ainda Chen (1) relata um estudo de Batsakis que descreve que a variável monomórfica já foi classificada como uma variante do carcinoma mucoepidermoide ou como cistoadenocarcinoma papilar, podendo ter ou não glicogênio e sendo impossível de diferenciar na histologia de metástases de outros carcinomas, principalmente do carcinoma de células claras renal. Essa variante acomete glândulas salivares menores e maiores e a invasão perineural era comum na sua avaliação morfológica.(1, 2, 4)

Milchgrub et al. (4) relatam que a classificação da OMS de 1991, vigente à época classificava o carcinoma de células claras em monomórfico e bimórfico, sendo confuso para o diagnóstico.(4, 5) Observando seus casos de 1970 a 1992 ela observou 11 casos com características muito semelhantes e conseguiu informações pós operatórias de 10 pacientes, sendo que um deles veio a óbito por complicações pós-operatórias, e o restante estava livre da lesão, tendo um deles falecido de outra causa. As características clínicas dessas lesões eram nódulos indolores de crescimento lento, em sua maioria de glândulas salivares menores da cavidade oral (82%), com predileção para mulheres com média de 55 anos. A remoção cirúrgica foi suficiente para a maioria dos casos. Metástase foi descrita em apenas dois casos, mostrando-se, portanto, uma neoplasia pouco agressivo, de baixo grau de malignidade. O quadro histológico dessas lesões era bem característico com células claras em um estroma hialino rico em glicogênio, raro o aparecimento de mucina e sem características mioepiteliais, então os autores classificaram essas lesões como carcinoma de células claras hialinizante.(2-4, 6)

Ainda na discussão destes mesmos autores, eles observaram que alguns casos de carcinoma de células claras monomórficos já eram considerados como carcinoma epitelial-mioepitelial, no entanto em seus casos não se observou características mioepiteliais tanto na microscopia quanto no exame imunohistoquímico, não se tratando, portanto, de uma lesão de origem mioepitelial. Outros diagnósticos diferenciais foram descartados, como carcinoma mucoepidermoide em que está presente mucina, diferentemente do carcinoma de células claras onde não há mucina, ou, quando presente é bem localizada, no interior de alguma célula. O, carcinoma de células acinares contém grânulos de zimogênio (amilase) e não contém glicogênio diferente do carcinoma de células claras, já o oncocitoma é uma lesão benigna em comportamento e acomete mais parótida, sendo a interface de células claras e outras células bem definidas. Outra neoplasia de células claras que acomete maxilares, o tumor de Pindborg, apresenta calcificações em seu meio, diferente do carcinoma de células claras de glândulas salivares. O carcinoma odontogênico de células claras é igual histologicamente à lesão aqui descrita, então sua diferenciação é feita apenas pela localização da lesão (intra ou extra óssea). Por este motivo alguns autores já consideraram a lesão intra-óssea como um carcinoma de células claras central. Já as lesões metastáticas não devem ser descartadas diante deste

diagnóstico e o carcinoma de células claras renal deve ser investigado.(4, 7,8,12,13,14)

Ellis (15) faz uma revisão sobre os carcinomas que apresentam células claras e orienta seu diagnóstico. Segundo o autor o chamado carcinoma de células claras não tem a característica de dois tipos de células distintas como o carcinoma epitelial-mioepitelial, ocorre entre a sexta e a oitava décadas de vida, e apresenta células claras em formato poligonal, podendo ter ou não um estroma hialino. O autor não acha conveniente, portanto, chama-lo de hialinizante. Da mesma forma ele critica outro autor que queria dividi-lo em epitelial e mioepitelial, já que essa lesão não tem característica mioepitelial. Esse carcinoma é rico em glicogênio e por isso alguns autores o chamaram de carcinoma de células claras rico em glicogênio, além de ser uma lesão de baixa agressividade, com raras figuras de mitose. Corresponde a menos de 1% dos carcinomas de glândulas salivares para a Associação de Patologia das Forças Armadas (AFIP) e 60% ocorrem em glândula salivar menor. A diferenciação das demais neoplasias é feita de forma semelhante ao descrito anteriormente.(15)

Sun et al. (16) fizeram uma revisão dos casos relatados na literatura de carcinoma de células claras e encontram 30 relatos na literatura inglesa e 10 na literatura chinesa além de mostrar mais um caso que histologicamente se assemelhava ao descrito por Milchgrub et al. (4). Dos 40 casos relatados na literatura, em 11 houve a ocorrência de metástases, todas em linfonodos regionais. A maioria dos casos era em cavidade oral, com local mais frequente em base de língua seguido de palato, assoalho bucal e mucosa jugal. Porém, havia relatos de lesões em parótida e hipofaringe.(8) Frente a tudo já exposto na literatura, havia a necessidade de se diferenciar e caracterizar as várias lesões que vinham sendo chamadas por vários nomes como carcinoma de células claras, carcinoma de células claras rico em glicogênio e carcinoma de células claras hialinizante.(2, 7, 14, 15)

Um trabalho com série de 8 casos de Solar, Schmidt e Jordan (17) levantados em seu serviço de 1982 até 2007, observaram a média de idade de 55 anos com a preferência pelo palato e com a maioria de mulheres. Também fizeram uma revisão da literatura de 1980 até 2007 e observaram 44 casos descritos, com epidemiologia semelhante à sua série de casos, sendo 35 na cavidade oral com um total de 50% em palato e língua, havendo ainda casos em hipofaringe, nasofaringe e parótida. O acometimento de linfonodos regionais foi de 23%, no entanto, é relatada apenas uma morte por causa da doença e dois relatos de metástase em pulmão.(17) No mesmo

ano, O'Sullivan-Mejia et al. (18) também relataram uma série de 8 casos levantados de seu serviço de 1992 até 2008. Sua epidemiologia foi semelhante à já descrita, com maioria em mulheres e com idade média de 66 anos sendo sete em cavidade oral. Desses 7, três apresentaram recorrência, e essa recorrência variou de um a seis anos. Revisando os casos da literatura, encontraram apenas 36 casos na literatura inglesa a partir de 1994. No entanto, levantando todos os casos descritos e incluindo os seus oito chegaram a um total de 55 casos. Os achados epidemiológicos era concordes com sua série de casos (72% mulher, 81% em cavidade oral e idade média de 68 anos). A maior novidade neste estudo foi uma lesão situada próxima à orbita.(18)

Kauzman, Tabet e Stiharu (2) descrevem um caso clínico de lesão intra-oral em paciente masculino de 53 anos, sem recorrência em acompanhamento de 3 anos, no entanto seu trabalho faz uma extensa revisão de literatura relatando o histórico e as nomenclaturas dessa lesão. Quanto à quantidade de casos ele contabiliza 98 casos na língua inglesa, sendo 59 (60,2%) dos casos em mulheres, 37 (37,8%) em homens e dois casos o sexo não foi relatado, a média de idade foi de 54,8 anos e a mediana de 54 anos, em cinco casos a idade não foi relatada. A localização mais frequente foi o palato 27 (27,5%) casos, seguido pela língua com 25 (25,5%) casos. Oito casos ocorreram em assoalho bucal e 8 casos em mucosa oral; 6 casos envolviam nasofaringe ou orofaringe e 5 casos eram de glândula parótida. No que se refere à sua agressividade, concluem não ser uma lesão muito agressiva já que apenas 3 pacientes morreram em decorrência da lesão; além disso 6 metástases ocorreram em pulmão e 14 pacientes apresentaram recorrências.(2) Antonescu et al. (10) estudou aspectos moleculares do carcinoma de células claras e o carcinoma mucoepidermoide mostrando uma diferença entre o carcinoma de células claras de origem glandular dos demais carcinomas. O autor reconhece a presença do rearranjo no oncogene EWSR1 que se fusiona ao gene ATF1, formando um gene de fusão EWSR1-ATF1, que até então não havia sido descrito em outras lesões. O autor sugere que a presença desse gene de fusão auxilia na diferenciação do carcinoma de células claras de outras lesões. As demais características apresentadas pelo autor estavam de acordo com os relatos da literatura: mais no sexo feminino (14/23 casos), média de 59 anos, sendo 18 casos em cavidade oral e uma recorrência de 21%.(10)

Thway e Fisher (19) revisaram a literatura sobre a presença dos genes de fusão ESWR1-CREB1 e EWSR1-ATF1. O rearranjo do gene EWSR1 aparece em várias lesões como, histiocitoma angio-fibroso, sarcoma de células claras (gastrointestinal),

sarcoma mixóide pulmonar, sarcoma de Ewing e claro no carcinoma de células claras das glândulas salivares. Essas fusões gênicas estão diretamente ligadas à oncogênese dessas neoplasias. Nesse trabalho todas as alterações moleculares dessas lesões citadas no começo do parágrafo foram estudadas através da revisão de literatura confirmando que foi encontrado esses genes de fusão nas mesmas.(19)

Bilodeau et al. (11) fizeram um levantamento de casos em seu serviço de 1998 até 2010 e encontraram 17 casos (15 pacientes) de carcinomas de células claras de glândula salivar e 12 casos (8 pacientes) de carcinomas odontogênicos de células claras, tendo comparado a epidemiologia, aspectos histológicos e imunohistoquímicos das lesões. O carcinoma de células claras de glândula salivar mostrou maior predileção pelo palato e base de língua, a maioria dos casos ocorreu em mulheres com idade média de 60 anos, sendo a taxa de recorrência de 12% e metástase foi detectada em 25% (principalmente em linfonodos). Um dos casos apresentou recorrência após 15 anos, em região nasal. Já os casos de carcinoma odontogênico de células claras não tiveram predileção por sexo, a idade média foi de 55 anos e houve maior predileção pela mandíbula (62,5%). A taxa de recorrência chegou a 55%, e, em geral as lesões na recorrência eram maiores que a lesão inicial. Entre os carcinomas odontogênicos houve uma recorrência após 4 anos. Foram consideradas lesões de baixo grau de agressividade e com bom sucesso no tratamento.(11) Bilodeau et al. (20) publicaram outro estudo comparando os testes moleculares da lesão de origem odontogênica e da lesão de origem glandular e observaram através de hibridização fluorescente in situ (FISH) que o rearranjo do gene EWSR1 estava presente na maioria das duas lesões e não estava presente em lesões como tumor de Pindborg e carcinoma epidermoide de células claras. (6, 8, 10 ,20)

Shah et al. (14) fizeram um estudo com 10 casos de seu laboratório e 9 casos cedidos por outros dois laboratórios Todos os casos foram revisados e confirmados 16 casos como carcinomas de células claras. Foram realizadas avaliações histológicas, imuno-histoquímicas e moleculares, além da avaliação molecular de 6 mioepiteliomas para o rearranjo do gene EWSR1. Com relação aos aspectos epidemiológicos, foram semelhantes aos dos autores anteriores, com maior predileção para mulheres com média de idade de 63 anos, maioria dos casos em cavidade oral com o palato e base de língua como sítios principais.(14)

Weinreb em (7,21,22) publicou três artigos no mesmo ano, duas revisões de literatura em que só ele era o autor e uma revisão sobre o gene de fusão EWSR1-ATF1 em conjunto com Tanguay. Em seus trabalhos é relatado que alguns oncogenes são estudados para facilitar o diagnóstico e tratamento de lesões glandulares. A nomenclatura dessa lesão pela de AFIP de 2008 é de carcinoma de células claras, porém para a OMS na classificação de 2005 o termo usado era carcinoma de células claras sem outra especificação.(3, 7, 10, 21-24)

Brandwein-Gensler e Wei (13) fizeram um breve relato sobre o que deveria ser revisto na próxima classificação da OMS, e condenaram a nomenclatura dada pela OMS e pela AFIP ao carcinoma de células claras, pois tal lesão muitas vezes revela uma diferenciação escamosa, por causa de seus desmossomos e seus tonofilamentos e poucas vezes apresenta diferenciação glandular, também afirma que a presença do gene de fusão EWSR1-ATF1 a diferencia das outras lesões. Quanto às características da lesão ele revisa os trabalhos de outros autores já citados nessa revisão. (3, 13)

Simpson et. al (23) em uma revisão sobre diagnóstico de lesões de glândulas salivares, encontraram relatos do carcinoma de células claras desde 1937, e considerando sua revisão eles não observaram predileção por sexo, mas a faixa etária, a localização e os sintomas da lesão eram os mesmos já relatados em outros trabalhos. As características histológicas, imuno-histoquímicas e moleculares eram as mesmas observadas por outros autores citados previamente. Os autores acreditaram que com um gene de fusão característico dessa lesão a sua caracterização seria mais fácil.(23)

Zhao et al. (24) relatam que a maior ocorrência do carcinoma de células claras é em cavidade oral principalmente em palato, mas pode ocorrer em várias áreas da boca. Revisando a literatura os autores encontraram casos de lesões nasais sendo descritos sete deles no Pubmed e dez casos na literatura chinesa. No total eles revisaram 23 casos (1992-2013) de lesões nasais de seu serviço e encontraram 6 que se caracterizavam como carcinomas de células claras. Realizaram imunohistoquímica, porém nenhum teste molecular foi realizado. (24)

Nakano et al. (25) estudaram três casos de carcinoma de células claras hialinizante em duas mulheres e um homem, sendo um em língua, um em nasofaringe e um em palato mole. Realizaram estudo histológico, imuno-histoquímico e molecular das lesões sendo duas delas positivas para os testes moleculares do rearranjo do gene EWSR1. Em concordância os resultados de imuno-histoquímica das duas foi

semelhante, diferenciando da terceira lesão sobre quais citoqueratinas eram positivas, mesmo se tratando do mesmo diagnóstico.(25) Esse mesmo gene foi pesquisado em outras lesões de glândulas salivares por Skálová et al. (26) sendo atribuído um pior prognóstico para lesões como carcinoma mioepitelial de células claras na presença desse gene.(26)

Albergotti et al. (6) fizeram uma revisão de literatura e o relato de 9 casos encontrados em seu serviço. Em seus casos a média de idade foi de 58 anos, com pequena maioria de mulheres, os locais foram diversos, sendo dois em nasofaringe, um em maxila, um em base de língua, um em mucosa oral, um em palato duro, um em tonsila e um em cavidade paranasal. Na apresentação clínica nenhum tinha evidência de metástase a distância e dois pacientes apresentavam linfadenopatia regional. Um paciente faleceu no pós-operatório, 7 pacientes se mostraram livres da lesão durante seu acompanhamento, e um paciente não fez acompanhamento. Os dados clínicos foram semelhantes aos encontrados em sua revisão de literatura. Foram realizados testes imuno-histoquímicos e moleculares (FISH).(6)

Fonseca et al. (27) assim como Yin. e Ha.(28) fizeram trabalhos de revisão para tabular e orientar sobre a presença dos genes de fusão em algumas lesões e sua importância para o prognóstico.(27, 28). Ainda nesse mesmo ano Daniele et al. (3) fizeram uma revisão de literatura encontrando 150 casos de carcinoma de células claras denominado sem outra especificação ou denominado hialinizante de glândulas salivares somente relatados na literatura inglesa e acrescentaram dois casos observados em seu serviço, com total de 152 casos. Na sua epidemiologia viu que 71 dos 152 casos ocorreram entre 50 e 70 anos, houve uma grande predileção pela cavidade oral com 80% dos casos e a área mais comum foi a língua com 39 casos seguido do palato com 37 casos. Nessa revisão é ressaltada a importância de acompanhamento por um longo período visto que dez casos de recidiva dessa lesão ocorreram após 5 anos, quatro relatos após 10 anos e um relato de recidiva após 24 anos da primeira lesão.(3)

Seethala e Stenman (9) fizeram um artigo sobre a classificação da OMS de 2017 para as neoplasias de glândulas salivares e comentaram a inclusão de novas lesões como o carcinoma secretório (análogo mamário), a reclassificação do adenocarcinoma cribiforme de baixo grau em carcinoma intraductal (qualificado como baixo grau), e a presença de genes de fusão auxiliando o diagnóstico de algumas destas neoplasias. Entretanto comentam não ser imprescindível sua detecção para o

diagnóstico, excetuando-se o gene de fusão EWSR1-ATF1 cuja presença é considerada exclusiva do carcinoma de células claras. Nesta nova classificação a denominação é simplesmente carcinoma de células claras, e não mais sem outra especificação ou hialinizante.(9)

Hernandez-Prera et al. (8) fizeram um estudo transversal para observar a incidência do carcinoma de células claras hialinizante em um serviço de patologia vinculado a um serviço de cirurgia de cabeça e pescoço. Foram levantados 594 casos de carcinoma de glândulas salivares de 1994 até 2014, com idade média de 57 anos, 54% de mulheres, a maioria da raça branca, e 43% eram de glândulas salivares maiores, 53% em glândulas salivares menores do trato aerodigestivo, 3% em local não especificado. O diagnóstico mais comum foi carcinoma mucoepidermoide com 34%, seguido do carcinoma adenoide cístico em 22% dos casos. Os casos de carcinoma de células claras representaram apenas 2,5% (8) dos casos. Nem todos os casos haviam sido diagnosticados inicialmente como de carcinoma de células claras. Em 3 deles o diagnóstico foi de carcinoma mucoepidermoide, um deles carcinoma epitelial-mioepitelial e um como carcinoma não especificado com células claras. Da mesma forma dois foram reclassificados como carcinoma de células claras odontogênico por serem intra-ósseos em maxila, e um por apresentar expressão de S-100 e SMA foi reclassificado em carcinoma epitelial-mioepitelial. Foram feitos testes imuno-histoquímicos e moleculares para confirmar o diagnóstico.(8) Durante sua revisão os autores analisaram153 casos relatados na literatura e observaram que o acompanhamento variou bastante de 1 a 336 meses, com mediana de 24 meses, sendo que com os dados disponíveis foi possível observar que o risco de metástase cervical foi de 5% nos primeiros 5 anos e 15% no acompanhamento de 10 anos, além de uma taxa de recorrência de 19% em 5 anos e 49% em 10 anos. A taxa de sobrevida dos pacientes para 5 e 10 anos foi de 89% e 83%, respectivamente, e quando estes dados restringiram-se aos pacientes que faleceram em decorrência da neoplasia, a sobrevida de 10 anos foi para 97%, mostrando ser uma lesão pouco agressiva. (8)

Lan et al. (29) relataram dois casos de carcinoma de células claras em região paranasal confirmando com testes moleculares de FISH e PCR, já que os testes imuno-histoquímicos foram inconsistentes para fechar o diagnóstico.(29) Alali et al. (30) também apresentaram uma dessas lesões em região paranasal e na revisão de literatura encontraram 3 casos publicados na mesma região. Os resultados de imuno-

histoquímica foram característicos da lesão e o teste de FISH também foi positivo. Um fato curioso é que os outros três casos eram do sexo masculino.(30)

Hsieh et al. (31) revisaram 49 casos de carcinomas mucoepidermoide com células claras, fazendo o teste de FISH para o rearranjo do gene MAML2 e 17 casos foram negativos e foram testados para o rearranjo do gene EWSR1, sendo três casos positivos. Analisando o quadro histológico destes 3 casos, o diagnóstico foi mudado para carcinoma de células claras. Outros cinco casos que já tinham o diagnóstico de carcinoma de células claras também foram revisados e testados, mantendo o diagnóstico. Desses 8 casos 7 eram mulheres e a maioria das lesões ocorreu em palato, seguido por base de língua. Já é sabido que a diferenciação apenas histológica entre o carcinoma mucoepidermoide com células claras e o carcinoma de células claras é difícil, pois assim como as células claras podem ocorrer no carcinoma mucoepidermoide, pode haver muco no carcinoma de células claras. Sendo assim os testes moleculares podem auxiliar nessa diferenciação, para que condutas adequadas sejam realizadas, visto que carcinoma mucoepidermoides negativos para o rearranjo do gene MAML2 são mais agressivos e o carcinoma de células claras tem recidivas tardias relatadas.(31)

Zhao et al. (32) revisando seus casos, observaram dois casos de carcinoma de células claras não especificado, dois de carcinoma mucoepidermoide e um carcinoma epitelial-mioepitelial, que apresentavam células claras e poderiam se enquadrar no diagnóstico de carcinoma de células claras de glândulas salivares. Houve pequena predileção para o sexo feminino, a média de idade foi de 56,6 anos, e os sintomas clínicos variaram um pouco. As localizações foram diversas como base de língua, palato, nasofaringe e glândula parótida. Apenas um paciente morreu em decorrência da lesão após 11 meses, sendo que esse era o paciente com a maior lesão e sua ocorrência foi em parótida, com metástases em pulmão após 6 meses. Os outros 4 pacientes permaneciam vivos e sem evidências da doença. O teste molecular de FISH foi positivo para o rearranjo do gene EWSR1 em todos os casos.(32)

Yang et al. (33) em seu serviço observaram 14 casos identificados como carcinoma de células claras hialinizante, de 2002 até 2012. A média de idade foi de 53 anos, com pequena predileção para o sexo feminino, e o principal sintoma foi de uma massa indolor e firme à palpação. A principal localização foi em palato com 6, seguido da base de língua com 3, e cinco pacientes (37,5%) apresentavam linfonodos palpáveis, sendo submetidos a esvaziamento cervical, mas sem evidencias de

metástase a distância. O acompanhamento desses pacientes variou de 3 a 7 anos e 3 pacientes (21,4%) tiveram recidiva local, dois em um ano (com mais de uma recorrência) e outro em 4 anos. Todos tinham a lesão de maior volume e linfonodos comprometidos na primeira intervenção, nenhum paciente faleceu em função da doença.(33)

Nesse artigo foi feita uma revisão de literatura havia 141 casos de carcinomas de células claras, e, juntando com os 14 apresentados por ele totalizaram 155 casos. A média de idade dos pacientes era de 57 anos e 63,2% eram mulheres, sendo o local de maior ocorrência a língua, seguida do palato. A glândula maior mais acometida foi a parótida. Oitenta e um pacientes apresentavam dados disponíveis sobre linfadenopatia que estava presente em 14 (17,3%) dos pacientes, e, 70 tinham dados sobre metástase a distância que esteve presente em dois casos. A grande maioria foi tratada com ressecção e a dissecção linfonodal foi feita em 24 de 93 casos (sendo 12 positivos). Dezessete dos casos tiveram radioterapia adjuvante, em um foi realizada apenas radioterapia e em um apenas quimioterapia. Dos 130 pacientes que tinham relatos pós-operatórios, 23 (17,7%) apresentaram recidiva local, com uma média de tempo de 47,7 meses para a recorrência; e cinco de 128 pacientes tinham metástases regionais e quatro de 114 metástase a distância, sempre acometendo o pulmão. Em 105 pacientes com acompanhamento prolongado observou-se que 91 (86,7%) estavam livres da lesão, oito (7,6%) estavam vivos, mas com a lesão, quatro (3,8%) morreram da doença e dois (1,9%) morreram de complicações pós-operatórias, mostrando o bom prognóstico da doença.(33)

Chapman et al. (34) relataram três casos de carcinoma de células claras que foram negativos para o gene de fusão EWSR1-ATF1, porém positivos para EWSR1-CREM. Um caso era em nasofaringe, um em base de língua e um em pulmão. Inicialmente acreditavam tratar-se de carcinomas mucoepidermoides por apresentarem mucina, porém foram negativos para os genes de fusão característicos dessa lesão e como apresentavam áreas de hialinização foram testados para o gene do carcinoma de células claras. No entanto, mesmo não sendo o gene específico dessa lesão, como sua presença não acontece em 100% dos casos o autor acredita ser um outro gene de fusão que apareça nessa lesão.(34)

2.2 Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos

Os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos do carcinoma de células claras de glândulas salivares foram descritos ao longo do tempo. Um dos primeiros relatos onde uma neoplasia de parótida foi denominado carcinoma de células claras foi o artigo de Chen (1) que mostrava uma lesão com estruturas tubulares formadas por dois tipos celulares, sendo células luminais eosinofílicas e células externas claras, PAS sensível, portanto, rica em glicogênio. (1)

O quadro histológico do carcinoma de células claras descrito por Milchgrub et al. (4) mostrava uma lesão bem delimitada com células claras de formato poligonal em sua maioria dispostas em ilhas, cordões ou ninhos em um estroma hialino. Algumas células eosinofílicas eram vistas junto às células claras. Estas eram PASdiástase sensível positivas e em alguns casos o PAS foi positivo no estroma, sendo que mucina era raro de encontrar. Mitoses foram vistas só nos casos com metástases, e infiltração neural foi observada, mas sem infiltração vascular. Na imuno-histoquímica mostrou positividade para antígeno epitelial de membrana (EMA), citoqueratina AE3 e AE1 e negatividade para S100 e actina de músculo liso (SMA), mostrando que é uma neoplasia epitelial, mas não mioepitelial. Na microscopia eletrônica foram vistos lagos de glicogênio, porém sem áreas de necrose, indicando uma lesão de baixo grau. Diante do exposto da histologia dessa neoplasia, e por sua característica epitelial os autores a denominam de carcinoma de células claras hialinizante diferenciando dos outras neoplasias com células claras.(3, 4) Vários autores tem relatado casos de lesões semelhantes a essa descrição histológica e com o nome de carcinoma de células claras hialinizante. (4, 7, 8, 14, 16, 19, 26, 28)

Ellis (15) descreve que o carcinoma de células claras é composto por células poligonais claras, dispostas em ninhos, cordões ou ilhas, rico em glicogênio podendo ter um estroma hialino ou fibroso. Os resultados de imuno-histoquímica mostraram positividade para citoqueratinas e negatividade para proteína S-100 (S-100) e SMA. De acordo com o autor a presença de algumas poucas células com mucina não descaracteriza a lesão e não a classifica como um carcinoma mucoepidermoide.(15)

Felix et al. (5) estudaram a matriz extracelular do carcinoma de células claras hialinizante e observaram colágeno tipo III na matriz extracelular ao redor das células e colágeno tipo I difuso na matriz extracelular. Para os autores essa distribuição do

colágeno mostra que não há muito material da lâmina basal ao contrário do que acontece nos carcinomas de origem mioepitelial, diferenciando essa lesão das demais.(5, 19, 23)

Solar, Schmidt e Jordan (17) em sua série de casos, observaram em suas lesões 5 casos exibindo mitoses, sendo um desses mais agressivo; 3 com infiltração neural e 3 com necrose, e relataram que em sua revisão de 44 casos apenas um apresentava necrose e 15 (28%) apresentavam invasão neural, sem nenhuma ligação com sua agressividade. Em sua série o caso agressivo tinha na histologia a presença de mitose e necrose. Nas reações de imuno-histoquímica e histoquímica seus casos foram reativos para citoqueratinas e PAS, respectivamente, e negativos para SMA e S-100, sendo essa a principal característica dessa lesão para ajudar a diferencia-la das demais lesões com células claras. Com isso os autores mostraram mais uma vez que a lesão é de origem epitelial, não tendo nenhum componente mioepitelial.(17) As características imuno-histoquímicas também foram descritas nos casos de O'Sullivan-Mejia et al. (18), com apenas uma lesão de palato apresentando S-100 focalmente positivo. Também é relatada a positividade para proteína p63 (p63) (marcador de células de epiteliais e mioepiteliais) em sete dos oito casos apresentados em seu trabalho. Esse autor montou um painel imuno-histoquímico para diferenciar o carcinoma de células claras de glândula salivar das outras lesões. Nesse painel ele mostra que o carcinoma de células claras é positivo para PAS, Citoqueratinas, EMA e p63, sendo negativo para PAS-diástase, mucina, S-100, SMA e CD10 (marcador para carcinoma renal). As demais lesões que apresentam células claras foram assim diferenciadas; carcinoma mucoepidermoide apresenta positividade para mucina; carcinoma epitelial mioepitelial apresenta positividade para SMA e S-100, e negatividade para PAS; carcinoma de células acinares positividade para SMA e PAS-D; carcinoma renal de células claras CD10 positivo; carcinoma odontogênico de células claras não teve diferença na imuno-histoquímica.(18) Portanto, o carcinoma odontogênico de células claras é a única lesão que não é possível de se diferenciar histologicamente e por imuno-histoquímica do carcinoma de células claras de glândula salivar, isso só é possível de fazer pela região acometida no paciente.(7, 15, 17). A extensa revisão realizada por Kauzman, Tabet e Stiharu (2) não mostrou nada de novo relacionado ao estudo histológico e imuno-histoquímico, apenas confirmou que em 98 casos a maioria era mulher com 60,2% com idade média de 54,8 anos com o palato e língua sendo os principais locais de acometimento.(2)

Antonescu et al. (10) observou a presença de invasão neural em 11 dos seus 23 casos, sem invasão vascular ou necrose; 3 casos com invasão óssea e poucas figuras de mitose, e no estudo imuno-histoquímico todos foram positivos para P63. Todos os casos foram positivos para citoqueratinas e apenas um caso foi positivo para S-100, no entanto a presença de mucina focal foi observada em 10 casos.(3, 10)

Bilodeau et al. (11) comparou os aspectos histológicos e imuno-histoquímicos do carcinoma de células claras de glândula salivar ao carcinoma odontogênico de células claras, e encontrou um padrão celular semelhante de ninhos, cordões ou ilhas de células claras poligonais. A hialinização não está presente em todas as lesões, mas é mais presente nas lesões de origem glandular (64,7% x 50%). Invasão neural é frequente nas duas lesões com maior frequência na de origem glandular (47,1% x 33,3%), e, metaplasia escamosa pode estar presente, mas invasão vascular é rara, porém podem ocorrer nas duas lesões. As grandes diferenças foram a presença de espaços císticos apenas nas lesões de origem glandular, porém presentes em apenas 11% dos casos e a presença de células em paliçada na periferia apenas nos casos de lesões odontogênicas em 58% dos casos. Essa disposição de células sustenta a teoria de que essa lesão seja de origem odontogênica diferente das lesões em tecido mole.(11) No que se refere às características imuno-histoquímicas todas foram positivas para citoqueratinas e p63 e todas negativas para S-100, SMA e mucina e todas positivas na histoquímica de PAS. Na microscopia eletrônica é observado que as células tem características de células da camada espinhosa do epitélio, por apresentar glicogênio, tonofilamentos e desmosssomos.(3, 8, 11, 21-23) No trabalho do mesmo autor em 2013 ele não observa nenhuma novidade na parte histológica das lesões além do já relatado anteriormente. (10, 20)

Shah et al. (14) em sua revisão de 16 casos de carcinoma de células claras hialinizante, observaram histologicamente o padrão clássico de células poligonais com citoplasma claro dispostas em ninhos, cordões ou ilhas. Alguns achados interessantes foram que três casos apresentaram necrose focal, 6 casos infiltração neural e nenhum caso infiltração linfovascular. Um caso apresentava maior número de mitoses e pleomorfismo, porém o paciente não fez acompanhamento. No que se refere à imunohistoquímica todos foram positivos para citoqueratinas e p63 e negativos para SMA. O S-100 foi negativo em quase todos, com um caso apenas focalmente positivo.(14)

Zhao et al. (24) em seis casos de lesões nasais que classificaram como carcinomas de células claras observaram uma lesão com células claras com formato

poligonal em meio a um tecido fibroso, mitoses eram raras, eram ricas em glicogênio e na imuno-histoquímica eram positivas para citoqueratinas e negativas para S-100, calponina, e em sua maioria negativa para EMA. Além disso, foram pouco positivos para Ki67 (marcador de proliferação celular), tendo como conclusão que se tratavam de carcinomas de células claras hialinizantes.(24)

Nakano et al. (25) em seus três casos observaram quadro histológico semelhante ao já descrito por outros autores. Na imuno-histoquímica todos os casos foram positivos para citoqueratinas e p63, negativos para S-100 e SMA, e, o interessante é que os dois casos positivos para citoqueratina 14 (CK14) foram positivos para o gene de fusão EWSR1-ATF1.(25)

Albergotti et al. (6) em sua série de casos observaram no exame histológico invasão neural em 3 dos 9 casos e invasão angiolinfática, necrose e mitoses foram observados em dois casos. Destes achados histológicos o mais comum encontrado em sua revisão foi a invasão neural, não tendo, porém, impacto sobre prognóstico. Já a presença de necrose foi o único achado que se associou a um pior prognóstico em sua revisão de literatura. Na imuno-histoquímica todos foram positivos para citoqueratinas e P63, na histoquímica foram positivos para PAS, todos os casos foram negativos para S-100, SMA e vimentina.(6)

Em sua revisão de literatura Daniele et al. (3) observaram que o estroma hialino descrito pode tanto ser uma pequena faixa de tecido como um septo espesso. O formato das células não variou e a invasão neural estava presente em um terço dos casos. As reações de imuno-histoquímica mostraram que a neoplasia era positivo para várias citoqueratinas (5, 7, 8, 14 e 19), para EMA, antígeno carcino-embrionário e p63, o Ki67 era pouco marcado, e eram negativos para vimentina, S-100, SMA e calponina, sendo essa as principais marcações para sua diferenciação dos demais carcinomas de células claras. Em seu relato ele observa que a positividade para vimentina e principalmente CD10 e negatividade a CK7 são indícios de metástase do carcinoma renal de células claras.(3, 30)

Hernandez-Prera et al. (8) observaram 15 carcinomas de células claras de glândula salivar e 2 odontogênicos que apresentaram padrão celular misto com células claras e núcleo excêntrico, aninhadas e ao redor de algumas células menores com citoplasma eosinofílico. A hialinização variou bastante entre as lesões com bandas escleróticas espessadas até pequenos septos fibrosos e reação estromal desmoplásica estava presente em 12 das lesões. Invasão perineural estava presente

em 5 dos 15 casos, invasão linfática em um caso, necrose em um caso e pequenos espaços císticos em 7 casos. Reação linfoplasmocitária peritumoral estava presente em 9 dos 15 casos. O estudo imuno-histoquímico mostrou positividade para p63, negatividade para S-100, SMA e proteína glial fibrilar, e mucicarmin foi positivo em algumas raras células em 5 casos (incluindo 3 casos anteriormente diagnosticados como carcinoma mucoepidermoide).(8)

Lan et al. (29) apresentaram dois casos de lesões paranasais, positivos para PAS e com positividade difusa para citoqueratinas. Um dos casos foi negativo para p63 e outro foi focalmente positivo para esse marcador este último caso foi negativo para S-100, vimentina e CD10, porém, a presença da mucina foi observada. Mas, como os testes moleculares foram positivos para o gene de fusão EWSR1-ATF1, os autores concluíram que eram dois casos de carcinoma de células claras.(29) Alali et al. (30) também apresentaram um caso em região paranasal que na imunohistoquímica foi positivo para p63 e citoqueratinas, negativo para S-100 e SMA e junto com o exame histológico foi caracterizado como um carcinoma de células claras hialinizante.(30)

Hsieh et al. (31) observando oito casos de carcinoma de células claras (sendo 3 anteriormente diagnosticados como carcinoma mucoepidermoide), constataram que a presença de células claras variou entre 10 e 80% da lesão. Hialinização nem sempre estava muito evidente, invasão neural ocorreu em 50% dos casos, necrose estava presente em 5 dos 8 casos e um caso apresentou invasão linfovascular. Na imunohistoquímica todos foram positivos para p63 e citoqueratinas, negativos para S-100, SMA e SOX10 (fator de transcrição celular), sendo muito compatível com o já descrito sobre essa lesão. A única observação é que quatro casos foram positivos para mucina o que não é tão comum, mas justifica a dificuldade em diagnosticar corretamente as lesões.(31)

Kujiraoka et al. (35) fizeram uma linhagem de células a partir de uma neoplasia odontogênica de células claras, a fim de avaliar o comportamento dessas células e observar se havia alguma diferença em relação ao carcinoma de células claras de glândula salivar, já que as duas lesões apresentam o gene de fusão EWSR1-ATF1. Foram observadas características odontogênicas na proliferação celular, com células em paliçada na borda da lesão e ilhas ameblastomatosas estavam presentes. A multiplicação celular era lenta, porém bem invasiva, demonstrado algumas diferenças histológicas das duas lesões além da diferença clínica do local de acometimento.(35)

Zhao et al. (32) observaram as características histológicas de 5 casos. Três casos eram bem semelhantes ao descrito em literatura sobre o carcinoma de células claras de glândula salivar, com estroma hialino em dois, e mixóide em um caso. Já os outros dois casos eram um pouco diferentes, sendo um deles de uma paciente que veio a óbito com uma massa expansiva com células dispostas em cordões, com citoplasma claro ou eosinofílico e um estroma também hialino. Porém, 10% dessa neoplasia mostrava uma alteração de células considerada de alto grau de malignidade. O último caso apresentou células dispostas em cordões, às vezes ninhos, com citoplasma claro e ligeiramente eosinofílico, além de núcleos moderadamente irregulares, e também invasão neural.(32) Na imuno-histoquímica todos foram reativos para pan-citoqueratina, quatro para p63 e 4 para CK14, nenhum foi reativo para S-100, calponina e proteína glial fibrilar. Um dado interessante é que o Ki67 estava presente em 5 % da região mais clássica da lesão e 40% da região com alto grau de malignidade. Não houve relação direta entre a invasão neural ou presença de estroma hialino e o prognóstico da lesão. Lesões mais agressivas ou que tenham alto grau de malignidade não são comuns a esta neoplasia, no entanto um caso de semelhante ao de maior grau de malignidade já foi descrito por outro autor para essa neoplasia.(32)

Yang et al. (33) em seus 14 casos observaram no exame histológico as células poligonais com citoplasma claro dispostas em ninhos, ilhas ou cordões, com a presença de células de citoplasma eosinofílico em 12 casos. Estroma hialino também foi observado, bem como invasão neural em cinco casos e necrose em três casos, mas, em apenas um caso com necrose foi observada recorrência da lesão. Na imunohistoquímica, houve positividade para AE1/AE3 em 12 dos 12 casos testados, citoqueratina 8 em 10 dos 10 testados e EMA em 9 dos 9 testados, e todos negativos para S-100 e SMA de12 testados para calponina todos foram negativos e apenas um de 11 testados foi positivo para vimentina. O autor observou o rearranjo do gene EWSR1 com FISH em 12 dos 14 casos. Em seu artigo o autor revisou 155 casos da literatura, incluindo os seus 14 e relatou invasão perineural em 42 de 96 casos (43,8%), invasão angiolinfática em nove de 71 pacientes (12,7%), necrose em 7 de 51 pacientes e mitoses em 19 de 93 pacientes. Essas achados mostram um comportamento pouco agressivo da lesão.(33)

Uma tabela contendo os principais artigos com revisão dos casos relatados na literatura foi realizada para melhor entendimento da epidemiologia e das características histológicas da neoplasia. (tabela 2.1)

Tabela 2.1- Principais revisões de literatura com aspectos epidemiológicos e histológicos

Autor	N°	idade	sexo	localização	Histológico	Imuno-
Autor	IN	luaue	Sexu	iocalização	riistologico	histoquímico e
						histoquímico
Color	52	51,7	F 71%	Língue	15 casos de	
Solar,	52	51,7	F / 1%	Língua e		Citoqueratina
Schmidt e				palato	invasão neural e	EA1/EA3 e PAS
Jordan (17)					um caso de	positivos
					necrose	SMA, S-100 e mucicarmin
O'C. Ilia cara	55	68	F 700/	Límanna	20.40/:	negativos
O'Sullivan-	ວວ	68	F 72%	Língua e	,	Citoqueratina
Mejia et al.				palato	neural	EA1/EA3 e PAS
(18)						positivos SMA e S-100
						negativos
Kauzman,	98	54,8	F	Palato e		Citoqueratinas e
Tabet e	90	34,6	60,2%	língua		PAS positivos
Stiharu (2)			00,270	iiigua		SMA e S-100
Stillaru (2)						negativos
Albergotti et	136	57,2	F	Palato e	46,6%invasão	Citoqueratinas,
al. (6)	130	37,2	64,8%	língua	neural, 5 casos de	PAS e p63
an (o)			01,070	Imgua	invasão	positivos
					angiolinfática e 5	S-100 e SMA
					casos de necrose	negativos
Daniele et al.	152	56	F	Língua e	59,38% invasão	Citoqueratinas 7
(3)			61,5%	palato	neural e 9,2%	e 14 e p63
(-)			, , , , , ,	1	invasão	positivos
					angiolinfática	S-100 e SMA
					3	negativos
Hernandez-	153	57	F 61%	Palato e		_
Prera et al.				língua		
(8)						
Yang et al.	155	57	F63,2%	Língua e	43,8%invasão	Citoqueratinas
(33)				palato	neural, 12,7%	EA1/EA3 e 8,
					invasão	PAS e p63
					angiolinfática e	positivos
					3,31% de necrose	S-100 e SMA
						negativos

2.3 Testes moleculares

Dois testes moleculares são mais utilizados para a localização de genes em lesões, FISH que utiliza sondas de DNA de fita simples que se ligam nas sequencias-alvo, o FISH tem a fluorescência para identificação dessa ligação, como são utilizadas em lâminas de tecidos fixados em formalina e parafina, facilitam a rotina de um laboratório de patologia, existem mais de um tipo de sonda no mercado, em geral se utiliza a sonda de fusão dupla que apresenta duas cores e quando estão sobrepostas significa que houve um rearranjo do gene estudado e ele pode estar fusionado a outro gene, porém não se sabe qual é o outro gene.(34) O teste da reação em cadeia da polimerase (PCR) que faz a amplificação do gene de fusão (já mostrando o genes rearranjados e fusionados) caso ele esteja presente na lesão, através de um ciclo de variação de temperaturas, as cadeias de ácido ribonucleico (RNA) se ligam a sequencias de genes dispostas em primers específicos para a sequência do gene estudado e replicando-as, esse ciclo é repetido várias vezes aumentando a quantidade de replicações do gene estudado possibilitando sua detecção.(10)

Alguns genes já eram estudados para se observar quais alterações estavam presentes nas lesões malignas, identificando genes precursores de carcinoma ou sarcomas, genes denominados oncogenes, como o gene EWSR1 que é observado no sarcoma de Ewing, esse gene é considerado um gene promiscuo por se fusionar facilmente a outros genes.(10, 19) . O gene ATF1 é da família do CREB e está diretamente relacionado a transformação do adenosina 3',5'-monofosfato (AMP) em AMP cíclico no meio intracelular, portanto a fusão desses genes ao EWSR1 está diretamente ligada a oncogênese das lesões em que são achados, alterando a produção de fatores de transcrição quiméricos e desregulando a expressão gênica da célula. A presença do gene nem sempre se traduz em lesão dependendo das alterações intracelulares, no entanto se sabe que o gene EWSR1 está ligado a alguns sarcomas quando presente em células mesenquimais e recentemente foi relacionado ao carcinoma de células claras de glândulas salivares, mesmo sendo uma neoplasia epitelial. (19)

Alguns trabalhos já mostravam a presença do gene MAML2 fusionado principalmente ao gene METC1 em cerca de 60% dos casos de carcinoma mucoepidermoide, e esta fusão foi relacionada a um comportamento menos agressivo

dessa lesão, no entanto o gene EWSR1 fusionado foi observado em 43% dos carcinomas mucoepidermoides através do teste de FISH e isso foi relacionado com um comportamento mais agressivo dessa lesão.(22) Outras lesões também demonstraram genes de fusão como carcinomas adenoides císticos com MYB-NFIB, não estando apenas esses genes alterados, mas o MYB está alterado entre 65 a 90% dessas lesões, adenomas pleomórficos com PLAG1 ou HMGA2 esses genes estão diretamente relacionados a produção de e-caderina e do metabolismo celular, o último gene também se encontra alterado no carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma secretório (análogo mamário) com o gene de fusão ETV6-NTRK3 que apareceu em 100% dos casos testados, esse gene está diretamente ligado aos receptores de membrana quinase e estão presentes em outras lesões de fora da cavidade oral, muitas dessas lesões apresentam vários rearranjos de genes.(14, 21,22)

O estudo de Antonescu et al. (10) observou a presença do gene EWSR1 com suas várias fusões em carcinoma de células claras de origem glandular, esse mesmo autor já havia estudado a presença desse gene nas neoplasias mioepiteliais do tecido mole tendo o resultado de 45% das lesões com a presença do gene e quando ele estava fusionado ao gene POU5F1 formando o gene de fusão EWSR1-POU5F1 a lesão apresentava células claras, por isso a ideia de se testar esse gene no carcinoma de células claras.(18) Para isso o autor utilizou os testes de FISH e PCR, esse trabalho foi multicêntrico e após as revisões de lâminas chegaram a um número de 23 carcinomas de células claras e 5 carcinomas mucoepidermoides, foram feitos testes de FISH para os genes MAML2 (11q21), EWSR1 (22q12), ATF1 (12q13), CREB1 (2q34), FUS (16p11), POU5F1 (6p21), PBX1 (1q23) e ZNF444 (19q13), os casos positivos tinham mais de 20% dos núcleos com o gene, então 18 (82%) casos de 22 testados foram positivos para fusão do gene ESWR1 e 13 (93%) casos de 14 testados de positivos para fusão do gene ATF1, nenhum caso apresentou outro gene, mesmo os casos com mucina não apresentaram o gene MAML2, no PCR houve amplificação do gene de fusão EWSR1-ATF1. Os carcinomas mucoepidermoides foram negativos para os genes ESWR1, FUS e ATF1, mesmo quando essas lesões apresentavam células claras. Tendo como conclusão do artigo que esse gene de fusão é característico do carcinoma de células claras de glândula salivar. (8, 10, 13, 21-23, 26, 27, 34)

Thway e Fisher (19) observaram na literatura que no histiocitoma angio-fibroso em sua maioria está presente o gene de fusão EWSR1-CREB1, no entanto também

se observa EWSR1-ATF1 em algumas áreas da neoplasia, já no sarcoma de células claras é o contrário a maioria apresenta o gene de fusão EWSR1-ATF1, podendo apresentar EWSR1-CREB1 também. O sarcoma mixóide pulmonar primário só apresenta EWSR1-CREB1, ao contrário do carcinoma de células claras de glândulas salivares que só apresenta EWSR1-ATF1, a neoplasia mioepitelial do tecido mole também só apresenta o gene de fusão EWSR1-ATF1, porém se diferencia do carcinoma de células claras hialinizante por ter um comportamento oposto na imuno-histoquímica apresentando S-100 positivo e P63 e citoqueratina negativos.(19)

Bilodeau et al. (20) também observou o rearranjo do gene EWSR1 em 5 de 6 casos (83,3%) de carcinomas odontogênicos de células claras através do teste de FISH, um desses casos positivos foi testado para a fusão do gene ATF1 e também foi positivo, ele também observou esse mesmo gene fusionado em 12 de 13 casos (92,3%) do carcinoma de células claras de origem glandular.(20) Algumas observações foram feitas, todos os casos com rearranjo do gene EWSR1 apresentavam estroma hialino ou fibrocelular, havia dois casos de neoplasia em parótida, um com o rearranjo do gene EWSR1 e outro em que o gene estava intacto, no entanto na histologia as duas lesões eram idênticas.(20, 28) Esse fato do rearranjo do gene ESWR1 estar presente nas lesões de origem glandular e odontogênica não significa que esta última se trate de um carcinoma central de células claras como alguns autores sugerem.(8, 13, 20, 34)

No trabalho de Shah et al. (14) foram feitos testes de FISH para detecção do rearranjo do gene EWSR1 e observado essa alteração em 13 (87%) dos 15 casos testados, dos dois casos negativos um apresentou um maior pleomorfismo, já o outro caso era bem característico de carcinoma de células claras de glândula salivar. As 6 lesões de mioepiteliomas testadas mostraram o gene EWSR1 intacto, apesar disso de na literatura há descrições do rearranjo desse gene em lesões mioepiteliais do tecido mole.(14)

Nakano et al. (25) fez o teste de FISH para verificar o rearranjo do gene EWSR1 e PCR para verificar o gene de fusão EWSR1-ATF1, sendo que dos três casos dois foram positivos para os dois testes, mostrando a concordância entre os testes.(25) Nesse mesmo ano Skálová et al. (26) fez um estudo sobre a incidência do rearranjo do gene EWSR1 através do teste de FISH em carcinomas de origem glandular e que apresentavam células claras, foram 51 (39%positivos) carcinomas mioepiteliais de células claras, 21 (24%positivos) carcinomas ex-adenomas pleomórficos, 11 (9%

positivos) carcinomas epitelial-mioepiteliais e 5 (80% positivos) carcinomas de células claras de glândulas salivares, o teste molecular realizado não foi específico para o gene de fusão EWSR1-ATF1. Os casos positivos dos carcinomas mioepiteliais apresentavam histologia semelhante entre si com ninhos de células claras de formato poliédrico e separada por septos fibrosos, esses casos apresentavam maior área de necrose na lesão e consequentemente um comportamento mais agressivo da lesão com pior prognóstico.(26)

Nos casos de carcinoma de células claras descritos por Albergotti et al. (6), ele fez o teste de FISH para o rearranjo do gene EWSR1 e dois não foram testados por falta de material, então dos 8 casos testados 7 foram positivos, o caso negativo foi reavaliado e diagnosticado como carcinoma epitelial-mioepitelial de células claras, com base em sua imuno-histoquímica, mostrando novamente a fidelidade desse teste para auxiliar no diagnóstico correto dessa lesão.(6)

Daniele et al. (3) em sua revisão observou que a presença do rearranjo do gene EWSR1 foi observado em 43 de 152 casos (já somados os dois casos apresentados por esse autor) como forma de diagnostica-los como carcinoma de células claras de glândula salivar.(3, 30)

Hernandez-Prera et al. (8) realizaram teste de FISH para o rearranjo do gene EWSR1 em 41 casos de neoplaisas com células claras, 15 carcinomas de células claras de glândulas salivares (13 positivos), 2 carcinomas de células claras odontogênico (um positivo). Houve positividade pequena para um carcinoma mioepitelial do osso e um carcinoma mucoepidermoide, sendo que para o restante das neoplasias os testes foram negativos. Como se sabe o rearranjo do gene EWSR1 é comum em outras lesões como sarcoma de Ewing e algumas neoplasias mioepiteliais. Portanto, apenas a presença do rearranjo não é suficiente para fechar o diagnóstico de carcinoma de células claras de glândulas salivares. A presença do gene de fusão EWSR1-ATF1 no carcinoma de células claras odontogênico ajuda a reforçar a teoria de que essa lesão é a representante central do carcinoma de células claras hialinizante.(8)

Lan et al. (29) apresentaram dois casos de lesões paranasais positivas para o rearranjo do EWSR1 em FISH e positivos para o gene de fusão EWSR1-ATF1. Como os dois casos apresentavam células claras, fechou o diagnóstico como carcinoma de células claras.(29) Alali et al. (30) mostraram em seu caso que o teste de FISH para o rearranjo do gene EWSR1 foi positivo, confirmando o diagnóstico. Nos outros três

casos revistos na sua literatura pelo autor, dois apresentavam o rearranjo do mesmo gene e o terceiro não fez o teste.(30)

Hsieh et al. (31) fazendo o teste de FISH para o rearranjo do gene EWSR1 nos casos de carcinomas mucoepidermoides, que foram negativos para o rearranjo do gene MAML2, observaram três casos positivos para esse rearranjo. Juntando esses casos com mais 5 casos já com o diagnóstico de carcinoma de células claras de glândulas salivares, observaram que todos foram positivos para o rearranjo do gene EWSR1, testaram para o rearranjo do gene ATF1 através de FISH e os oito casos foram positivos. Sobrepondo as sondas foi ainda possível observar o gene de fusão EWSR1-ATF1 em todos os casos, certificando assim se tratar de carcinoma de células claras de glândula salivar. O autor relata que é possível haver um sub-diagnóstico dessa lesão assim como ocorre no carcinoma secretório (análogo mamário) de glândula salivar, que recentemente foi inserido na classificação da OMS e é facilmente confundido com carcinoma de células acinares de baixo grau.(31)

Chapman et al. (34) relataram três casos que inicialmente foram diagnosticados como carcinoma mucoepidermoide, porém nenhum gene de fusão testado estava presente na lesão. Então como a lesão apresentava células claras e hialinização foi realizado o teste de FISH para o rearranjo de EWSR1 que foi positivo, ATF1 que foi negativo e CREM que foi positivo também. No PCR com sequenciamento foi possível observar que a fusão dos genes EWSR1 com CREM, o ATF1 e o CREM fazem parte da família do CREB. Sendo assim, o autor acredita que esse seja um novo gene de fusão presente no carcinoma de células claras de glândulas salivares já que o EWSR1-ATF1 não está presente em 100% dos casos.(34)

Skálová et al. (36) fizeram uma grande revisão sobre os rearranjos dos genes e genes de fusão encontrados em algumas neoplasias de glândula salivar, começando com o carcinoma secretório (análogo mamário), uma lesão descrita há pouco tempo e que apresenta o gene de fusão ETV6-NTK3. O carcinoma de células claras (hialinizante) que entrou na última classificação da OMS como já descrito, apresenta o gene de fusão EWSR1-ATF1 carcinomas mucoepidermoides que apresentam o gene de fusão CRTC1-MAML2 tem menor agressividade e maior sobrevida do paciente; o carcinoma adenoide cístico apresenta o gene de fusão MYB-NFIB. Algumas outras lesões ainda não tem um gene específico para auxilio na diferenciação, porém algumas translocações já foram encontradas, então logo teremos mais definições que vão auxiliar ainda mais no diagnóstico.(36)

O gene de fusão EWSR1-ATF1 não aparece em outras lesões de glândulas salivares, porém o rearranjo do gene EWSR1 é visto em outras lesões como mioepitelioma de tecido mole. A própria autora também já observou esse rearranjo em neoplasias mioepiteliais de células claras, então podemos afirmar que apenas a detecção desse rearranjo não é suficiente para o diagnóstico de carcinoma de células claras hialinizante. É preciso o complemento imuno-histoquímico para a negatividade de S-100 e SMA, mostrando ser uma neoplasia de origem epitelial e ainda a positividade de citoqueratinas. A autora relata que a orientação atual é de não utilização de FISH para o diagnóstico dos casos clássicos em que não há marcação de mucina. Nos casos de dúvida ele é de grande ajuda. Ela faz essa afirmação, pois não há indícios de que a presença desse rearranjo esteja diretamente ligada ao prognóstico da lesão, como ocorre no caso de carcinoma mucoepidermoide e o rearranjo de gene MAML2.(36)

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente e quantitativamente os aspectos histopatológicos, imuno-histoquímicos e biomoleculares dos casos de carcinomas de células claras de glândula salivar, diagnosticados no serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP), no período entre 1997 e 2018, procurando correlacionar dados clínicos descritos no pedido de exame anatomopatológico aos aspectos histopatológicos, imuno-histoquímicos e biomoleculares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os casos diagnosticados como carcinoma de células claras sem outra especificação, originários de glândula salivar, foram recuperados dos arquivos do Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. O período avaliado foi entre os anos de 1997 e 2018. Foram incluídos no estudo também, alguns casos com diagnóstico de carcinoma de glândula salivar com presença de células claras, porém sem o diagnóstico de carcinoma de células claras. Todos os dados clínicos dos pacientes (idade, raça, sexo) foram coletados das fichas de pedido de exame, assim como os dados da lesão (localização, tempo de evolução, e aspectos clínicos). Todos os casos foram reavaliados as lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE), e novos cortes foram confeccionados quando necessário, e os casos com material disponível foram submetidos ao PCR. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo e seu parecer de aprovação está no anexo A.

Critérios de inclusão: Todos os casos diagnosticados como carcinoma de células claras ou com células claras, porém sem diagnóstico definido, e com origem de glândula salivar, constantes do arquivo do serviço de Patologia cirúrgica da Faculdade de Odontologia da USP, com os dados completos.

Critérios de exclusão: Outros carcinomas de células claras que não de origem em glândula salivar e casos com dados incompletos.

4.1 Imuno-histoquímica

Para definição do perfil imuno-histoquímico foram realizadas reações com os seguintes anticorpos, ou reavaliadas reações já existentes: S-100(marca DAKO, anticorpo Z311), SMA (marca DAKO, anticorpo M0851) e p63 (marca DAKO, anticorpo M7247), citoqueratina 7 (CK7) (marca Cell Marque, anticorpo M7018) e citoqueratina 14 (CK14) (marca BioGenex, anticorpo MU146-UC). Colorações com PAS-sem distase foram também realizadas quando não existentes.

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas da seguinte forma: Obtenção de cortes de 3µm, com micrótomo e colocação em lâminas de vidro silanizadas, as mesmas eram desparafinizadas com xilol aquecido a 37°, seguindo-se da hidratação gradativa com álcool até 80%. Após essa etapa as lâminas de vidro eram colocadas em tampão adequado (acido cítrico com ph 6,0 para CK7, CK14 e SMA, EDTA para p63, o S-100 não necessita de tratamento), por 30 minutos a 37° para recuperação antigênica. Então as lâminas foram resfriadas em água corrente, lavadas com água destilada e colocadas em solução de peróxido de hidrogênio com diluição de 1 para 1 com água destilada com a finalidade de remover a peroxidase endógena tecidual. A seguir as lâminas foram lavadas com solução de TRIS e colocadas na máquina Dako autostainer (Dako Colorado, Inc.), para o processamento automático da reação dos anticorpos com suas respetivas diluições (S-100 1:700, SMA 1:200, CK7 1:500, CK14 1:500, e p63 1:50), tendo um período de incubação de 30 minutos e utilizando o sistema Envision (EnVision® Dual Link System-HRP, DAKO, Carpinteria, CA, USA) como segundo anticorpo. O cromógeno selecionado para a revelação das reações foi a diaminobenzidina (DAB, 3,3 - diaminobenzidina), de cor castanha, incubado por 10 minutos. Após a lavagem, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados em cadeia ascendente de etanol, diafanizados em xilol e protegidos por lamínulas de vidro montadas em sistema automatizado (Tissue-Tek® Film® Coverslipper). Controles positivos (tecido glandular normal ou controle interno), e negativos (omissão do anticorpo primário) foram incluídos em todas as reações.

A coloração por PAS foi realizada de forma manual, com a obtenção de cortes de 3μm, com microtomo e colocação em lâminas de vidro silanizadas, os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol aquecido a 37°C e seguiu-se a hidratação gradativa com álcool até 80%. Os cortes histológicos foram colocados em ácido periódico-Schiff por 30 minutos, as lâminas de vidro eram lavadas com água corrente e após a lavagem, foram contracorados com hematoxilina de Mayer. Então as lâminas de vidro foram desidratadas em cadeia ascendente de etanol até 100%, a diafanização foi feita com xilol e colocação de lamínulas de vidro montadas em sistema automatizado (Tissue-Tek® Film® Coverslipper).

Após as reações de imunohistoquímica e coloração de PAS, as lâminas foram avaliadas em microscópio por um patologista experiente, através da análise da distribuição da marcação foram classificadas em positivas ou não.

4.2 PCR em tempo real

A identificação do gene de fusão EWSR1-ATF1 característico dessa neoplasia, foi realizada por PCR em tempo real e confirmado utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 4%.

4.2.1 Isolamento do RNA

O material para esse teste foi extraido dos blocos incluidos em parafina da seguinte forma: Com um microtomo foram feitos 10 cortes de 4 µm e colocados em um tubo de 1,5ml. Desparafinização foi realizada com a colocação de 1 ml de xilol no tubo com a amostra, fez-se a agitação com a utilização de um vortex e o xilol foi mantido por dez minutos e os tubos foram centrifugados a 9300rcf por 3 minutos, o xilol foi retirado com auxilio de uma pipeta de forma cuidadosa, esses processos foi repetido por mais duas vezes, garantindo a remoção de toda a parafina. Então foi colocado 1 ml de álcool etílico para remoção total do solvente, agitados através do vortex e mantido por dez minutos, os tubos foram centrifugados a 9300rcf por 3 minutos o álcool etílico foi retirado com auxilio de uma pipeta de forma cuidadosa. A secagem do material foi feita com a incubação a 37°C por 5 minutos com tubo aberto.

Foi utilizado o MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kit (A31881 Applied Biosystems) para a extração do RNA do material desparafinizado seguindo todos os passos orientados por seu fabricante. Esse sistema utiliza microparticulas chamadas de *Beads* que se ligam ao material genético e são separadas do sobrenadante através de imãs, e uma estante magnética foi utilizada para esse fim.

Foram acrescentados 210µl de solução de protease aos tubos de 1,5 ml com material desparafinizado, de modo a cobrir todo o conteúdo do tubo para a digestão da protease, incubados por uma hora a 55°C e mais uma hora a 90°C. Após a incubação o conteúdo foi centrifugado a 9300rcf por 3 minutos e o sobrenadante foi retirado com auxilio de uma pipeta de forma cuidadosa, adicionamos 20µl de *nucleid acid binding bead*s com a função de auxiliar a separação do RNA, a seguir foram

adicionados 900µl de solução de RNA binding buffer e misturados com o auxílio de um agitador por 5 minutos, então os tubos eram colocados na estante magnética por 2 minutos para estabilização das moléculas ligadas às beads e o sobrenadante foi retirado com o auxilio de uma pipeta de forma cuidadosa. Foram então adicionados 500µl do tampão de lavagem e misturados com o auxílio de um agitador por 1 minuto, seguido da colocação dos tubos na estante magnética por 2 minutos para estabilização das moléculas ligadas às beads e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se então 500µl da solução de lavagem 2 aos tubos e misturou-se com auxilio de um agitador por 1 minuto. Novamente os tubos foram colocados na estante magnética por 2 minutos para estabilização das moléculas ligadas às beads e o sobrenadante descartado, os tubos foram então mantidos abertos por 5 minutos para secagem. O próximo passo foi adicionar 100µl de solução de DNase aos tubos e misturar com auxílio de um agitador por 20 minutos e com temperatura de 37°C para melhor resultado da reação. Então adicionamos 450µl de RNA rebinding buffer e misturamos com auxílio do agitador por 5 minutos, em seguida os tubos foram colocados na estante magnética por 5 minutos para estabilização das moléculas ligadas às beads e o sobrenadante foi descartado. Finalizando adicionamos 50µl da solução de eluição, misturados com auxílio de um agitador por 5 minutos. Essa última solução faz o RNA se soltar das moléculas magnéticas, então quando colocamos os tubos na estante magnética o RNA ficou no sobrenadante. O RNA isolado foi retirado com auxilio de uma pipeta de forma cuidadosa e colocado em outro tubo de 0,5ml. Esse RNA foi guardado em freezer à temperatura de -80°C.

4.2.2 Síntese do cDNA

Para síntese do cDNA, 10µl do RNA foram utilizados para a reação da transcrição reversa, e o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher), seguindo as orientações do fabricante. Preparamos primeiro o master mix, para um volume final de 20µl de cDNA, misturando 2µl de *RT buffer*, 0,8µl de *dNTP mix*, 2µl *RT randon primers*, 1µl de *multscribe reverse transcriptase* e 4,2µl de água livre de DNA, dando um total de 10µl. Esses 10µl de master mix foram misturados a 10µl de RNA de cada amostra e colocados em um termociclador (Termociclador

Matercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), e quatro ciclos, 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C e uma etapa de resfriamento a 4°C. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o uso.

4.2.3 PCR em tempo real

Com o cDNA obtido fizemos o PCR em tempo real utilizando o termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied BiosystemsCarlsbad, CA, USA), como fluoróforo utilizamos o Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e para amplificação do gene de fusão EWSR1-ATF1 foram utilizados os primers 5'- CAA GGA TTA AAT GAC AGT GTG ACT C -3' (forward) e 5'- CTT TCT GTG AGG AGC CTA TG -3' (reverse) obtidos da literatura do artigo de Nakano et al. (25) e sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies.

Foram misturados 25µl de Master Mix, 0,5µl primer *forward*, 0,5 µl primer *reverse*, 5µl de amostra e 19µl de água sem DNA em cada tubo de 500 µl. As reações foram realizadas em duplicata, e como controle negativo foi utilizado um tubo com todos os reagentes exceto o cDNA da amostra. O processo de ciclagem programado foi a denaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos para denaturação, e 60°C por 1 minuto para replicação. Ao mesmo tempo em que se ocorre a reação um gráfico com a curva de *melting* foi construido pela máquina. Esse gráfico demonstra as dissociações do DNA nos ciclos ocorrem de forma normal ou se há alguma interferência como a formação de dímeros. Outro gráfico de *plots* também é formado mostrando o aumento da quantidade de amplificação do gene testado. Nesse gráfico é possível observar quais amostras estão com amplificação e quais não, tendo um limite mínino chamado de *threshold* para ser considerada uma amplificação verdadeira.

5. RESULTADOS

Na pesquisa do banco de dados do serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da USP foram encontrados, no período analisado (1997-2018) 68760 casos. Desses, 797 eram neoplasias de glândulas salivares, sendo a neoplasia mais comum o adenoma pleomórfico com 293 casos, seguido pelo carcinoma mucoepidermoide com 120 casos. Para o nosso trabalho foram avaliados 18 casos com os seguintes diagnósticos: quatro carcinomas de células claras hialinizante, nove carcinomas de células claras, dois adenocarcinomas não especificados, um carcinoma de células claras rico em glicogênio, um carcinoma sugestivo de mucoepidermoide e um caso com diagnóstico descritivo de fragmento de mucosa com células claras sugerindo neoplasia glandular. Em dois casos as lâminas e os blocos da lesão foram retirados pela paciente e não se encontravam no serviço. Outros dois casos apresentavam as lâminas, mas não os blocos da lesão original, não sendo possível fazer as reações do PCR, porém incluídas aos dados epidemiológicos por possuírem as lâminas em HE e as marcações imunohistoquímicas. No entanto, três desses casos sem o bloco estavam com diagnóstico de carcinoma de células claras e um com diagnóstico de carcinoma de células claras hialinizante e em seus laudos feitos na época, relatavam positividade para citoqueratinas (CK7 e CK14). Os outros 14 casos estavam com seus respectivos blocos e lâminas sendo possível fazer novas reações de imuno-histoquímica quando necessário e análise do PCR.

Então, dos 16 casos com lâminas, 13 casos foram positivos para CK7, seis para CK14, 10 positivos para p63, dois positivos para S100 e um positivo para SMA. O exame de histoquímica de PAS revelou 14 casos positivos, não resistentes à diástase (tabela 5.1). Com isso, separamos 11 casos com aspectos histológico e imunohistoquímico compatíveis com carcinoma de células claras de glândulas salivares, e entre esses, quatro estavam com diagnóstico de carcinoma de células claras hialinizante, cinco estavam como adenocarcinoma de células claras, um estava como sugestivo de carcinoma mucoepidermoide e um estava como fragmento de mucosa contendo células claras sugerindo neoplasia de glândula salivar. Um caso com diagnóstico de carcinoma de células claras não se confirmou com imuno-histoquímica

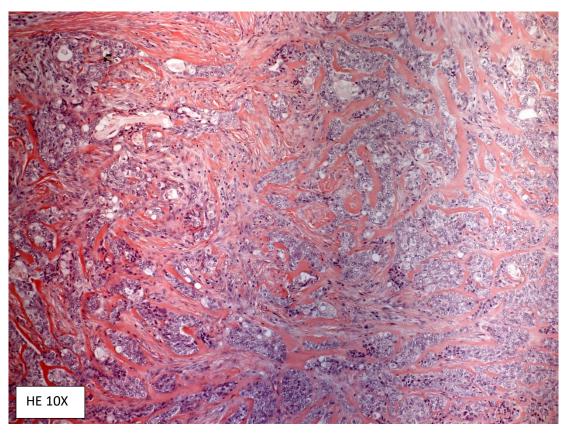
e foi retirado, e os outros dois casos com diagnóstico de carcinoma de células claras eram metástases de carcinoma renal.

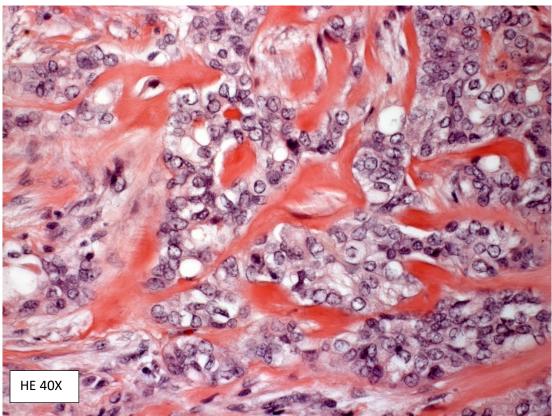
Onze casos com diagnóstico de carcinoma de células claras de glândulas salivares. Destes, 81,81% (9 casos) ocorreram em mulheres, 77,77% (7 de 9 casos) eram da raça branca, a média de idade foi de 56,42 (variando de 34 até 75) anos. A região mais acometida foi o palato junto com a mucosa jugal com 36,36% (4 casos cada um) dos casos. Histologicamente 81,81% dos casos apresentaram septos com hialinização variando de grandes e largos a estreitos com algumas células. (figura 5.1) Todos os casos apresentavam células claras poligonais com disposição em cordões, ninhos ou ilhas e por vezes, células com citoplasma eosinofílico também eram observadas, variando em sua quantidade. Invasão neural foi observada em seis dos casos (54,54%), necrose foi observada em dois dos casos (18,18%) e invasão linfovascular não foi observada. (tabela 5.2) Foram realizados PCR em tempo real nas 14 lesões em que haviam blocos de parafina disponíveis. No PCR 6 lesões das 9 (66,66%) classificadas em carcinoma de células claras foram positivas para o gene EWSR1-ATF1, as outras lesões que não foram classificadas como carcinoma de células claras foram negativas para o gene EWSR1-ATF1, a curva de melting mostra a normalidade da reação e o gráfico de plots mostra a amplificação das amostras (figura 5.2).

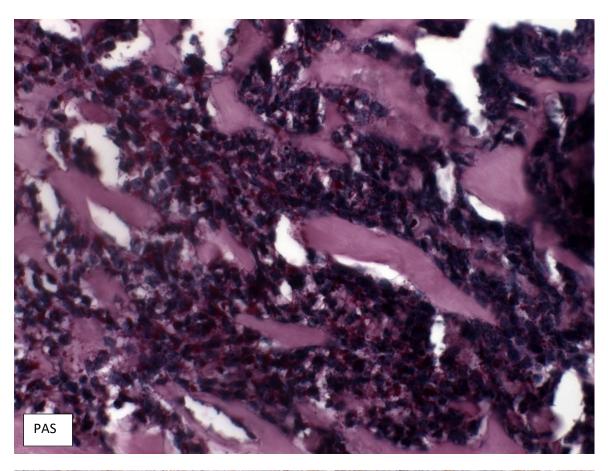
Tabela 5.1- Painel imuno-histoquímico das 16 lesões avaliadas.

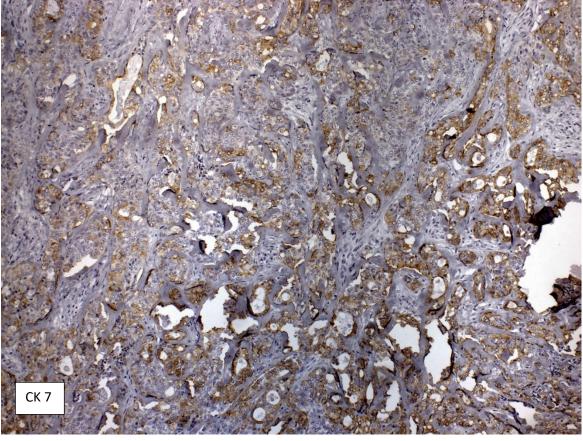
1									Diagnóstico final
	Carcinoma de células	+	+	•	•		+		Carcinoma de
	claras								células claras
2	Carcinoma de células	+	+	-	-		+		Carcinoma de
	claras hialinizante								células claras
3	Fragmento mucosa com	+	-	-	-	+	+	-	Carcinoma de
	células claras								células claras
4	Adenocarcinoma de	+	-	-	-	-	+	-	Adenocarcinoma
	células claras								
5	Sugestivo de	+	+	-	-	+	+	-	Carcinoma de
	mucoepidermoide								células claras
6	Carcinoma de células	+	+	-	-	+	+	-	Carcinoma de
	claras								células claras
7	Adenocarcinoma não	+	-	+	-	-	-	-	Carcinoma não
	especificado								especificado
8	Adenocarcinoma de	+	-	-	-	+	+	+	Carcinoma de
	células claras								células claras
9	Carcinoma de células	-	-	-	-	-	+	-	Metástase renal
	claras rico em glicogênio								
10	Adenocarcinoma de	+	+	-	-	+	+	+	Carcinoma de
	células claras								células claras
11	Adenocarcinoma	+	-	+	+	+	+	-	Adenocarcinoma
12	Carcinoma de células	+	-	-	-	+	+	+	Carcinoma de
	claras								células claras
13	Carcinoma de células	-	+	-	-	+	+	+	Carcinoma de
	claras hialinizante								células claras
14	Carcinoma de células	+	-	-	-	+	+	+	Carcinoma de
	claras hialinizante								células claras
15	Carcinoma de células	-	-	-	-	-	-	-	Metástase renal
	claras								
16	Carcinoma de células	+	-	-	-	+	+	+	Carcinoma de
	claras hialinizante								células claras

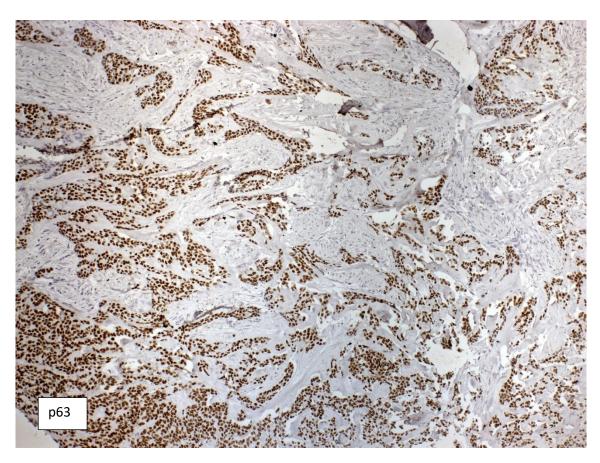
Figura 5.1- Aspectos histológicos em HE a aumento de 10x e 40x mostrando células claras em estroma hialino, PAS sem diástase, positividade de CK7, positividade de p63, negatividade de SMA, S-100 mostrando infiltração neural da lesão, área de necrose.

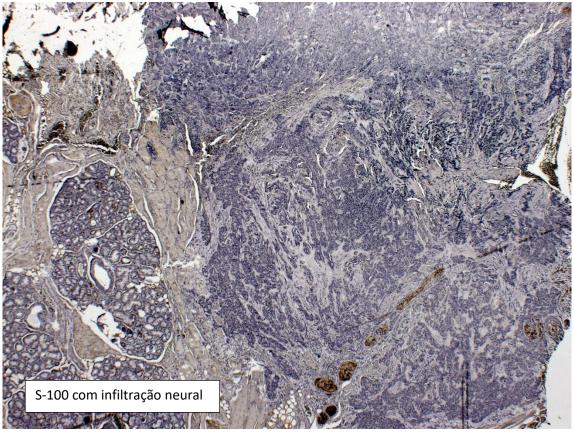


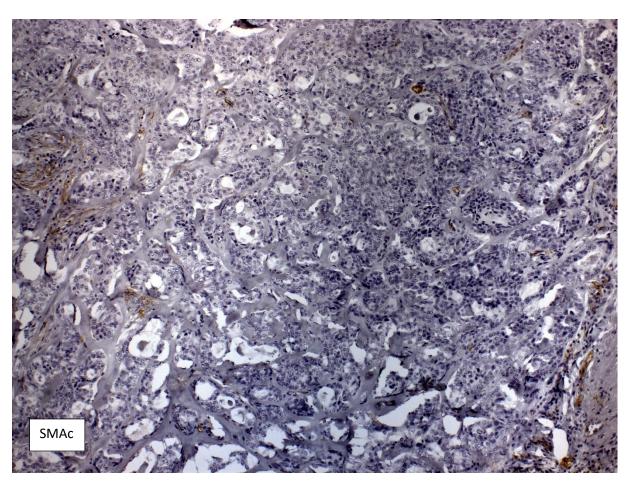












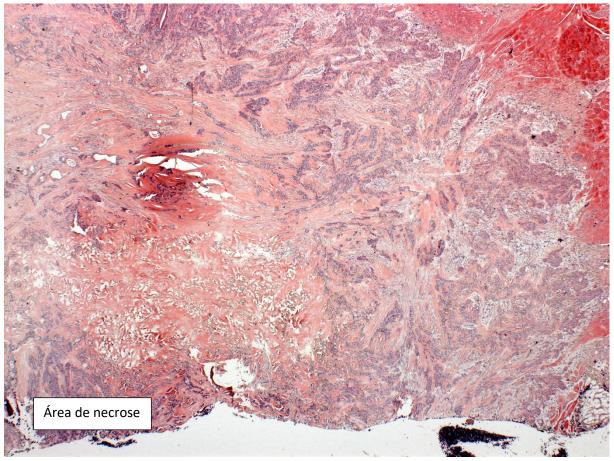
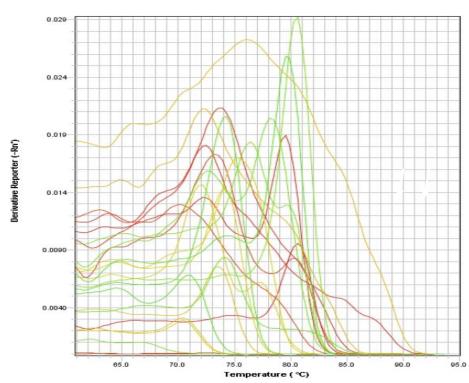


Tabela 5.2- Dados epidemiológicos e histológicos dos casos de carcinoma de células claras de glândula salivar

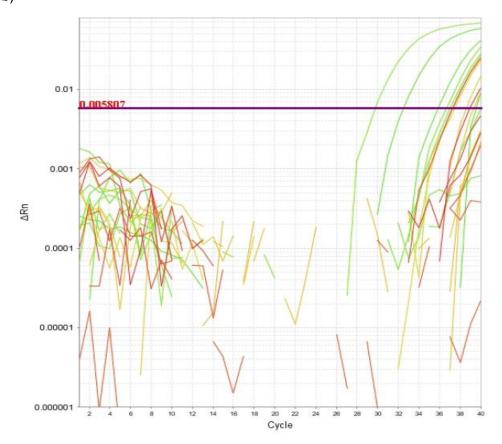
casos	sexo	Idade	raça	localização	hialinização	Invasão	necrose	Invasão
						neural		vascular
1	F	45	-	Língua	N	N	N	N
2	F	49	В	Assoalho	S	N	N	N
3	М	65	В	Palato	S	N	N	N
u4	F	55	В	Palato	S	S	S	N
5	F	63	N	Mucosa	S	S	N	N
6	F	55	-	Palato	S	S	N	N
7	F	34	Α	Palato	S	N	N	N
8	M	64	В	Orofaringe	N	N	N	N
9	F	-	В	Mucosa	S	S	S	N
10	F	-	В	Mucosa	S	S	N	N
11	F	75	В	mucosa	S	S	N	N

Figura 5.2 - PCR em tempo real, a) curva de *melting* mostrando o perfil de normalidade do PCR e b) gráfico de *plots* mostrando as amplificações

a)



b)



6. DISCUSSÃO

A maior parte das neoplasias de glândula salivar tem predileção pelo sexo feminino, assim como o carcinoma de células claras. Desde o primeiro relato, realizado por Chen (1) a prevalência pelo sexo feminino já era notada, mesmo com poucos trabalhos na época sobre essa neoplasia. Outro dado interessante é a média de idade entre a quinta e a sexta décadas de vida, também relatada desde aquela época, e enfatizada por Milchgrub et al. (4) em seu relato de série de casos quando padronizaram a lesão, dando a ela o nome de carcinoma de células claras hialinizante. Esses dados de prevalência foram semelhantes aos descritos posteriormente em vários artigos de séries de casos e nos artigos de revisão como o de Yang et al. (33). Estes autores revisaram 155 casos e mostraram média de idade de 57 anos, e maioria de mulheres. Nosso estudo a exemplo dos outros teve uma maioria de casos em mulheres, 81,81%, com idade média de 56,42 anos. Outro dado observado é a maior frequência da cor da pele branca em nossos casos, algo que não é muito discutido na literatura. (1, 4, 33)

Quanto à localização, essa neoplasia raramente ocorre em glândulas salivares maiores, é quase que exclusivo de glândulas salivares menores. A maioria dos autores de séries de casos relata o palato como a principal localização seguido pela base de língua, como observaram Bilodeau et al. (11) na sua série de casos e Solar, Schmidt e Jordan (17), mostrando que 50% das neoplasias ocorreram nessas regiões. No entanto, em algumas séries de casos isso não é observado, como na de Albergotti et al. (6) que não observaram predileção por região. Em nossa série tivemos o palato e a mucosa jugal com a mesma quantidade de neoplasias, não sendo esse segundo local um dos mais comuns na literatura. Outra observação é que nenhum dos nossos casos foi em glândulas salivares maiores, já que essa é uma região pouco comum, embora a casuística de nosso serviço de Patologia Oral tenha prevalência por neoplaisas de glândulas menores (dados não publicados) e o carcinoma de células claras foi 1,38% das lesões de glândulas salivares como já descrito na literatura. (6,11, 17, 33) Outras regiões do trato aerodigestivo também são acometidas por essa lesão como seio paranasal, descrito por Lan et al. (29), Alali et al. (30) e Zhao et al. (32).(29, 30, 32) Em nosso estudo, encontramos um caso em orofaringe como já observado por outros autores.(6, 16, 24, 29, 30, 33) Outra observação feita pelos autores é sobre a apresentação clínica da neoplasia, que em geral apresenta-se como uma massa indolor e firme a palpação, também observado na maioria dos nossos casos, e que muitas vezes faz com que os pacientes procurem tratamento tardiamente. (5, 6,17, 19, 33)

A recorrência dessa neoplasia é baixa variando de 12 a 19 % e a metástase linfonodal também é baixa, ocorrendo em cerca de 5 a 25% dos casos, mostrando ser uma lesão de baixa agressividade e com boa resposta à cirurgia. Nas revisões de casos da literatura observamos poucas mortes relacionadas a essa neoplasia, como mostrado por Hernandez et al. (8) que relataram uma sobrevida de 5 anos em 89% dos casos e em 10 anos de 83%. Levando-se em conta apenas as mortes causadas pela neoplasia, essa porcentagem sobe para 97%.(3, 5, 8, 17, 33) Em nosso trabalho não pudemos fazer essa relação por falta de dados já que somos um serviço só de diagnóstico, porém, temos a informação de que em um dos casos houve uma metástase linfonodal dois anos após a exérese da lesão inicial. Em nossa revisão observamos que os relatos de recidiva ou metástase da lesão ocorrem na maioria dos casos tardiamente, como descrevem Yang et al. (33), com tempo médio de recidiva de 47,7 meses, e Daniele et al. (3) que relataram 10 casos com recidiva após 5 anos e 1 caso após 24 anos. Com relação à metástase a distância o local mais comum é o pulmão.(3, 33)

Existe uma controvérsia sobre o quadro histológico dessa neoplasia, que é a presença da hialinização, como foi descrito por Milchgrub et al. (4).(1, 4) Ellis (15) já criticou essa nomenclatura por relatar que não era presente em todos os casos, e Bilodeau et al (11) também relataram a presença de hialinização em apenas 64,7% dos casos, ressaltando que por vezes havia apenas um fino cordão fibro-celular.(11, 15) Já Daniele et al. (3) e Hernandez et al. (8) consideraram que tudo era uma grande variação da hialinização, tendo desde pequenos septos fibrosos até grandes bandas escleróticas de material hialino. A hialinização estava bem clara em 81,81% dos nossos casos. Isso pode estar relacionado também à quantidade de material que foi enviado para análise, produto geralmente de biópsias incisionais, como o caso que estava com diagnóstico descritivo por se tratar de um tecido muito escasso. (3, 8)

A presença de células claras poligonais dispostas em cordões, ninhos e ilhas, com a presença variada de células eosinofílicas ao redor é a principal característica da neoplasia, sendo um consenso para todos os autores pesquisados; já a infiltração

neural foi o achado mais encontrado na lesão variando de 33,33 até 47% seguido da necrose com 6,66 até 18,75% (sabendo que se trata de diagnósticos de biopsias incisionais, podento então, esses dados estarem subestimados). Mitoses eram raras e invasão linfovascular também. Nossa foi concordante com a literatura, em que 54,54% apresentaram invasão neural e em 18,18% havia presença de necrose, porém vale ressaltar que se tratam de biopsias incisionais em sua maioria. Apesar de muito presente a invasão neural não tem nenhuma ligação com o prognóstico dessa neoplaisa. Todos os casos foram positivos para histoquímica de PAS mostrando ser uma lesão rica em glicogênio e justificando o porquê desta neoplasia já ter sido chamado de carcinoma de células claras rico em glicogênio. (1, 6, 9, 11, 12, 17, 19, 33)

Como existem neoplasias de diversas origens que apresentam células claras existe a necessidade de se fazer um diagnóstico correto, já que o comportamento biológico é diferente entre elas. Entre as lesões que se originam em glândula salivar, podem apresentar células claras, o carcinoma mucoepidermoide, o carcinoma epitelial-mioepitelial, mioepitelioma, carcinoma mioepitelial, carcinoma de células acinares, entre outras. De origem não glândula salivar a metástase do carcinoma renal de células claras pode ocorrer inclusive próxima à glândula parótida, como foi em um dos casos que tivemos no nosso trabalho. Os carcinomas odontogênicos ricos em células claras também podem confundir o diagnóstico. No entanto, com a utilização de painéis imuno-histoquímicos é possível se fazer esse diagnóstico diferencial com segurança. Em nosso painel imuno-histoquímico todas as lesões de carcinoma de células claras de glândula salivar foram negativos para S-100 e SMA, como já é relatado na literatura, mostrando não se tratar de lesões com células mioepiteliais. Já os marcadores de citoqueratina 7 foi positivo na maioria das lesões e quando ela foi negativa a citoqueratina 14 foi positiva, mostrando serem células epiteliais, p63 foi positivo em todos as nossas neoplasias de células claras também mostrando a origem epitelial, e em especial para citoqueratina 7 que demonstra origem em epitélio ductal. Estes achados auxiliam para diferenciá-lo do carcinoma epitelial-mioepitelial, carcinoma mioepitelial de células claras ou mioepitelioma. A presença de mucina nos carcinomas mucoepidermoides geralmente é suficiente para diferenciá-lo de carcinoma de células claras que é PAS-diástase negativo, bem como do carcinoma de células acinares com predomínio de células claras. Quando há mucina nos carcinomas de células claras, é de maneira focal. (4, 9, 11, 12, 17, 19, 33)

Outro recurso reconhecido recentemente para ajudar no diagnóstico dessa neoplasia, são os testes moleculares de FISH e PCR. No primeiro observa-se o rearranjo dos genes ou gene de fusão e no segundo apenas o gene de fusão. Por exemplo, já foi descrito que no carcinoma mucoepidermoide o rearranjo do gene MAML2 é o mais comum e está relacionado a um melhor prognóstico dessa lesão. O gene de fusão EWSR1-ATF1 que está presente no carcinoma de células claras foi descoberto por Antonescu et al. (10), sendo que para isso eles fizeram o teste de FISH para o rearranjo dos genes EWSR1 e ATF1 encontrando-os em mais de 80% dos carcinomas de células claras, além de fazerem a contra prova com PCR em duas lesões que eram mais recentes, caracterizando o gene de fusão EWSR1-ATF1. Esse gene de fusão não é exclusivo dessa neoplasia, pois, ele também está presente em histiocitoma angio-fibroso, neoplasia mioepitelial do tecido mole, carcinoma de células claras pulmonar e carcinoma odontogênico de células claras, porém, nenhuma dessas lesões origina-se de glândula salivar.(8, 10, 13, 27)

Bilodeau et al. (20) fizeram o mesmo experimento com carcinoma de células claras de glândula salivar e carcinoma odontogênico de células claras, já que as duas lesões são iguais em seu quadro histológico e no perfil imuno-histoquímico., Observaram também a presença de gene de fusão EWSR1-ATF1 em mais de 90% dos carcinomas odontogênicos de células claras, o que justifica ainda o questionamento de alguns autores se essa lesão não seria um carcinoma de células claras central.(20) Entretanto, foi observado por Kujiraoka et al. (35), através de cultura de células do carcinoma de células claras de origem odontogênica e por Bilodeau et al. (11), que o carcinoma odontogênico de células claras tem células com núcleos dispostos em paliçada na sua periferia, o que fala a favor da origem odontogênica.(11, 35) Acredita-se que outros genes de fusão possam estar presentes no carcinoma de células claras como relatado por Chapman et. al (34) que mostraram a presença do EWSR1-CREW em três neoplasias diagnosticadas como carcinoma de células claras, porém mais estudos precisam ser realizados.(34)

Desde a descoberta desse gene muitos autores tem realizado o teste de FISH para o rearranjo do gene EWSR1 para ajudar no diagnóstico, por ser um teste simples de se realizar e de não depender tanto do tempo em que o material foi armazenado. Como desvantagem, esse teste tem um custo mais elevado. Hsieh et al. (31) relatou que 3 neoplasias com diagnóstico inicial de carcinoma mucoepidermoide foram reclassificados para carcinoma de células claras após o teste de FISH ser positivo

para o rearranjo do gene EWSR1. Essa reclassificação leva em conta também os aspectos histológico e imuno-histoquímico. Em nossos casos tivemos também uma reclassificação revisando os aspectos histológico e imuno-histoquímico, sem a necessidade do teste molecular, já que esse oncogene é muito comum em outras lesões e foi encontrado em outras neoplasias de glândula como carcinoma mucoepidermoide e carcinoma epitelial-mioepitelial. Então, apenas o teste de FISH para esse rearranjo de EWSR1 não pode ser considerado definitivo para o diagnóstico dessa lesão, devendo ser realizado em conjunto o teste de FISH para o gene ATF1 ou o perfil imuno-histoquímico que deve ser característico para esse diagnóstico. (26, 31)

Outra possibilidade é se fazer o PCR para se detectar o gene de fusão EWSR1-ATF1, que, apesar de não ter sido utilizado na maioria dos trabalhos e, quando utilizado foi para pequeno número de casos, 2 ou 3, mas é uma reação de menor custo. No entanto, para material parafinado e com algum tempo de armazenamento não se sabe se o teste se apresenta fiel. Em nosso trabalho buscamos avaliar, por PCR a possível detecção do gene EWSR1-ATF1 em tecido incluído em parafina, em tempos superiores a 10 anos. Os testes de PCR em tempo real mostraram que 66,66% dos nossos casos de carcinoma de células claras apresentam o gene de fusão EWSR1-ATF1, isso se assemelha com o descrito na literatura que a maioria dos carcinomas de células claras apresentam esse gene, porém não chega a 100%. Esses casos eram os mais recentes, comprovando a dificuldade do teste em tecidos incluídos em parafina por longos períodos.(17, 25) Por isso, mais recentemente alguns autores começam a recomendar que o diagnóstico deve ser feito apenas com os exames histológico e imuno-histoquímico e que os testes moleculares devem ser feitos apenas quando se tem alguma dúvida do diagnóstico. (10, 28, 36)

7. CONCLUSÃO (em tópicos)

- Carcinoma de células claras é mais prevalente em mulheres com idade entre 50 e 60 anos, em glândulas salivares menores e com predileção pelo palato, na nossa amostra.
- Os aspectos histológicos associados à expressão imuno-histoquímica especialmente da citoqueratina 7 e p63, associados à negatividade para S100 e actina de músculo liso, na maioria dos casos podem ser considerados suficientes para se fechar esse diagnóstico, por se tratar de uma lesão com um só tipo celular.
- A hialinização nem sempre está presente na lesão e a invasão neural é muito comum para o carcinoma de células claras.
- Os testes moleculares podem auxiliar o diagnóstico, entretanto o aspecto imuno-histoquímico não podem ser ignorados, já que o gene não está presente em 100% dos casos. Em nosso estudo o resultado do PCR para o gene EWSR1-ATF1 foi positivo em 66,66% dos casos.
- Os aspectos clínicos e radiográficos são essenciais para o diagnóstico já que não se diferencia morfologicamente o COCC do CCC

REFERÊNCIAS

- 1 Chen KT. Clear cell carcinoma of the salivary gland. Human pathol. 1983;14(1):91-3.
- 2 Kauzman A, Tabet JC, Stiharu TI. Hyalinizing clear cell carcinoma: a case report and review of the literature. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, and Endod. 2011;112(1):e26-34. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.02.041.
- 3 Daniele L, Nikolarakos D, Keenan J, Schaefer N, Lam AK. Clear cell carcinoma, not otherwise specified/hyalinising clear cell carcinoma of the salivary gland: The current nomenclature, clinical/pathological characteristics and management. Crit Rev Oncol Hematol. 2016;102:55-64. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.03.018.
- 4 Milchgrub S, Gnepp DR, Vuitch F, Delgado R, Albores-Saavedra J. Hyalinizing clear cell carcinoma of salivary gland. Am J of Surg Pathol. 1994;18(1):74-82.
- 5 Felix A, Rosa JC, Nunes JF, Fonseca I, Cidadao A, Soares J. Hyalinizing clear cell carcinoma of salivary glands: a study of extracellular matrix. Oral Oncol. 2002;38(4):364-8.
- 6 Albergotti WG, Bilodeau EA, Byrd JK, Mims MM, Lee S, Kim S. Hyalinizing clear cell carcinoma of the head and neck: Case series and update. Head Neck. 2016;38(3):426-33. doi: 10.1002/hed.23902.
- 7 Weinreb I. Hyalinizing clear cell carcinoma of salivary gland: a review and update. Head Neck pathol. 2013;7 Suppl 1:S20-9. doi: 10.1007/s12105-013-0466-8.
- 8 Hernandez-Prera JC, Kwan R, Tripodi J, Chiosea S, Cordon-Cardo C, Najfeld V, et al. Reappraising hyalinizing clear cell carcinoma: A population-based study with molecular confirmation. Head Neck. 2017;39(3):503-11. doi: 10.1002/hed.24637.
- 9 Seethala RR, Stenman G. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumors of the Salivary Gland. Head Neck Pathol. 2017;11(1):55-67. doi: 10.1007/s12105-017-0795-0.
- 10 Antonescu CR, Katabi N, Zhang L, Sung YS, Seethala RR, Jordan RC, et al. EWSR1-ATF1 fusion is a novel and consistent finding in hyalinizing clear-cell carcinoma of salivary gland. Genes Chromosomes Cancer. 2011;50(7):559-70. doi: 10.1002/gcc.20881.
- 11 Bilodeau EA, Hoschar AP, Barnes EL, Hunt JL, Seethala RR. Clear cell carcinoma and clear cell odontogenic carcinoma: a comparative clinicopathologic and immunohistochemical study. Head Neck Pathol. 2011;5(2):101-7. doi: 10.1007/s12105-011-0244-4.

- 12 Pujary K, Rangarajan S, Nayak DR, Balakrishnan R, Ramakrishnan V. Hyalinizing clear cell carcinoma of the base of tongue. Int J Oral and Maxillofac Surg. 2008;37(1):93-6.
- 13 Brandwein-Gensler M, Wei S. Envisioning the next WHO head and neck classification. Head Neck Pathol. 2014;8(1):1-15. doi: 10.1007/s12105-014-0529-5.
- 14 Shah AA, LeGallo RD, van Zante A, Frierson HF, Jr., Mills SE, Berean KW, et al. EWSR1 genetic rearrangements in salivary gland tumors: a specific and very common feature of hyalinizing clear cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 2013 Apr;37(4):571-8. doi: 10.1097/PAS.0b013e3182772a15.
- 15 Ellis GL. Clear cell neoplasms in salivary glands: clearly a diagnostic challenge. Annals of diagnostic pathology. Ann Diagn Pathol. 1998 Feb;2(1):61-78.
- 16 Sun Z. J. ZYF, Zhang L., Zhang W. F., Chen X. M., He S. G. Hyalinizing clear cell carcinoma in minor salivary glands of maxillary tuberosity. Oral Oncology EXTRA. 2005:306-10.
- 17 Solar AA, Schmidt BL, Jordan RC. Hyalinizing clear cell carcinoma: case series and comprehensive review of the literature. Cancer. 2009 Jan 1;115(1):75-83. doi: 10.1002/cncr.23974.
- 18 O'Sullivan-Mejia ED, Massey HD, Faquin WC, Powers CN. Hyalinizing clear cell carcinoma: report of eight cases and a review of literature. Head Neck Pathol. 2009 Sep;3(3):179-85. doi: 10.1007/s12105-009-0124-3.
- 19 Thway K, Fisher C. Tumors with EWSR1-CREB1 and EWSR1-ATF1 fusions: the current status. Am J Surg Pathol. 2012 Jul;36(7):e1-e11. doi: 10.1097/PAS.0b013e31825485c5.
- 20 Bilodeau EA, Weinreb I, Antonescu CR, Zhang L, Dacic S, Muller S, et al. Clear cell odontogenic carcinomas show EWSR1 rearrangements: a novel finding and a biological link to salivary clear cell carcinomas. Am J Surg Pathol. 2013 Jul;37(7):1001-5. doi: 10.1097/PAS.0b013e31828a6727.
- 21 Weinreb I. Translocation-associated salivary gland tumors: a review and update. Adv Anat Pathol. 2013 Nov;20(6):367-77. doi: 10.1097/PAP.0b013e3182a92cc3.
- 22 Tanguay J, Weinreb I. What the EWSR1-ATF1 fusion has taught us about hyalinizing clear cell carcinoma. Head Neck Pathol. 2013 Mar;7(1):28-34. doi: 10.1007/s12105-013-0427-2.
- 23 Simpson RH, Skalova A, Di Palma S, Leivo I. Recent advances in the diagnostic pathology of salivary carcinomas. Virchows Arch. 2014 Oct;465(4):371-84. doi: 10.1007/s00428-014-1639-x.
- 24 Zhao W, Yang L, Wang L, Zuo W, Yuan S, Yu J, et al. Primary clear cell carcinoma of nasal cavity: report of six cases and review of literature. Int J Clin Exp Med. 2014 Dec 15;7(12):5469-76. eCollection 2014.

- 25 Nakano T, Yamamoto H, Nishijima T, Tamiya S, Shiratsuchi H, Nakashima T, et al. Hyalinizing clear cell carcinoma with EWSR1-ATF1 fusion gene: report of three cases with molecular analyses. Virchows Arch. 2015 Jan;466(1):37-43. doi: 10.1007/s00428-014-1676-5.
- 26 Skalova A, Weinreb I, Hyrcza M, Simpson RH, Laco J, Agaimy A, et al. Clear cell myoepithelial carcinoma of salivary glands showing EWSR1 rearrangement: molecular analysis of 94 salivary gland carcinomas with prominent clear cell component. Am J Surg Pathol. 2015 Mar;39(3):338-48. doi: 10.1097/PAS.0000000000000364.
- 27 Fonseca FP, Sena Filho M, Altemani A, Speight PM, Vargas PA. Molecular signature of salivary gland tumors: potential use as diagnostic and prognostic marker. J Oral Pathol Med. 2016 Feb;45(2):101-10. doi: 10.1111/jop.12329.
- 28 Yin LX, Ha PK. Genetic alterations in salivary gland cancers. Cancer. 2016 Jun 15;122(12):1822-31. doi: 10.1002/cncr.29890.
- 29 Lan J, Huang SC, Chen YH, Chen WC, Jin YT, Lu YC, et al. Primary paranasal sinus clear cell carcinoma with EWSR1-ATF1 fusion: report of 2 molecularly confirmed cases exhibiting unique histopathology. Hum Pathol. 2017 May;63:139-143. doi: 10.1016/j.humpath.2016.09.036. Epub 2016 Dec 1
- 30 AlAli BM, Alyousef MJ, Kamel AS, Al Hamad MA, Al-Bar MH, Algowiez RM. Primary paranasal sinus hyalinizing clear cell carcinoma: a case report. Diagn Pathol. 2017 Sep 25;12(1):70. doi: 10.1186/s13000-017-0659-7.
- 31 Hsieh MS, Wang H, Lee YH, Ko JY, Chang YL. Reevaluation of MAML2 fusion-negative mucoepidermoid carcinoma: a subgroup being actually hyalinizing clear cell carcinoma of the salivary gland with EWSR1 translocation. Human Pathol. 2017 Mar;61:9-18. doi: 10.1016/j.humpath.2016.06.029.
- 32 Zhao YN, Wang X, Liang FH, Zhang WJ, Song XT. Hyalinizing clear cell carcinoma of salivary glands: A retrospective study focused on uncommon morphology, immunohistochemistry, and detection of gene fusion using fluorescence in situ hybridization. Pathol Res Pract. 2018 Mar;214(3):380-384. doi: 10.1016/j.prp.2017.12.021.
- 33 Yang XH, Liu L, Shi YY, Hu YJ, Hu QG, Zhang P. Hyalinizing clear cell carcinoma of salivary gland origin in the head and neck: clinical and histopathological analysis. Int J Oral Maxillofac Surg. 2018 Jun;47(6):692-698. doi: 10.1016/j.ijom.2017.11.004.
- 34 Chapman E, Skalova A, Ptakova N, Martinek P, Goytain A, Tucker T, et al. Molecular Profiling of Hyalinizing Clear Cell Carcinomas Revealed a Subset of Tumors Harboring a Novel EWSR1-CREM Fusion: Report of 3 Cases. Am J Surg Pathol. 2018 Sep;42(9):1182-1189. doi: 10.1097/PAS.000000000001114.
- 35 Kujiraoka S, Tsunematsu T, Sato Y, Yoshida M, Ishikawa A, Tohyama R, et al. Establishment and characterization of a clear cell odontogenic carcinoma cell line

with EWSR1-ATF1 fusion gene. Oral Oncol. 2017 Jun;69:46-55. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.04.003.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo clínico-patológico de carcinomas de células claras de glândula salivar

Pesquisador: Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

Área Temática: Versão: 3

CAAE: 76751617.5.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.375.405

Apresentação do Projeto:

Avaliar os casos de carcinomas de células claras de glândula salivar diagnosticados no serviço de Patologia oral e maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo nos últimos dez anos e comparar as alterações encontradas no histológico com o comportamento clínico da lesão, através da avaliação das fichas dos pedidos de exame anatomopatológico em que há descrição da situação do paciente no momento da biópsia.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os aspectos histopatológicos e imunohistoquímicos dos casos carcinomas de células claras de glândula salivar, diagnosticados serviço de Patologia oral e maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo nos últimos dez anos, procurando correlacionar dados clínicos descritos no pedido de exame anatomopatológico e aspectos histopatológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ambos mensurados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as ressalvas feitas anteriormente foram contempladas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Folha de Rosto, Plataforma Brasil, Projeto Detalhado, Autorização do arquivo de exames anátomo-patológicos pertencente ao Serviço de Patologia Bucal da FOUSP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 2.375.405

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÖES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 976119.pdf	07/11/2017 16:44:31		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	prontuarios.docx	07/11/2017 16:44:09	GLAUBER BAREIA LIBERATO DA ROCHA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	07/11/2017 16:34:07	GLAUBER BAREIA LIBERATO DA ROCHA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Autorizacao.pdf	07/11/2017 16:33:21	GLAUBER BAREIA LIBERATO DA ROCHA	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	07/11/2017 10:53:03	GLAUBER BAREIA LIBERATO DA ROCHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa.pdf	07/11/2017 09:44:00	GLAUBER BAREIA LIBERATO DA ROCHA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	15/09/2017 16:39:46	Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não



FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 2.375.405

SAO PAULO, 10 de Novembro de 2017

Assinado por: Maria Gabriela Haye Biazevic (Coordenador)