



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

PIETRO MAINENTI

**IMUNOFENOTIPAGEM DE LESÕES OBTIDAS EM
CARCINOGENESE QUIMICAMENTE INDUZIDA POR DMBA
EM GLÂNDULAS SALIVARES SUBMANDIBULARES DE
RATOS (*Rattus norvegicus*)**



2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PIETRO MAINENTI

**IMUNOFENOTIPAGEM DE LESÕES OBTIDAS EM CARCINOGENESE
QUIMICAMENTE INDUZIDA POR DMBA EM GLÂNDULAS SALIVARES
SUBMANDIBULARES DE RATOS (*Rattus norvegicus*)**

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

Orientador: Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa
Co-orientadora: Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

São José dos Campos

2009

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para normalização de trabalhos acadêmicos da FOSJC. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2008.

M284i Mainenti, Pietro.
Imunofenotipagem de lesões obtidas em carcinogênese quimicamente induzida por DMBA em glândulas salivares submandibulares e ratos (*Rattus norvegicus*) / Pietro Mainenti. __São José dos Campos : [s.n.]; 2009.
126.f.: il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa

Co-orientador: Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

1. Carcinogênese. 2. DMBA. 3. Glândula salivar. 4. Neoplasia. 5. Imunoistoquímica. 6. Miofibroblastos. I. Rosa, Luiz Eduardo Blumer. II Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título.

tD79

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

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 10 de junho de 2009.

Assinatura:

E-mail: pietromainenti@terra.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho (Co-orientadora)
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Adjunta Rosilene Fernandes da Rocha
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Associado Fábio Daumas Nunes
Faculdade de Odontologia de São Paulo
Universidade de São Paulo - USP

Profa. Adjunta Maria das Graças Afonso Miranda Chaves
Faculdade de Odontologia de Juiz de Fora
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Profa. Doutora. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 10 de junho de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio e Gladys, às minhas irmãs Sandra e Luisella e à minha amada Patrícia, pelo incondicional suporte aos meus projetos de vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Adjunto Luiz Eduardo Blumer Rosa, pela orientação acadêmica mas, principalmente, pelos fortes laços de amizade que desenvolvemos desde 2004, época em que iniciei meu mestrado.

À Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho, por prontamente me acolher como seu co-orientado e pelas inestimáveis sugestões ao meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, representada pelo Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. José Roberto Rodrigues, pela oportunidade de realização de meu Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito.

À Profa. Adjunta Rosilene Fernandes da Rocha, pela confiança depositada em mim durante minha formação na UNESP.

À Profa. Dra Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, pela contribuição valiosa com sugestões e críticas à este trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lilian Faria de Oliveira Braga, pela atenção e disponibilidade.

Ao Prof. Adjunto Raul Fernando Binato Lamin, patologista do Serviço de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora (MG), pela gentileza em me deixar frequentar o laboratório.

À Bióloga Débora Tavares Grizendi, do Serviço de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora (MG), pelo apoio técnico dispensado a esta pesquisa, no âmbito da imunoistoquímica.

Ao técnico Aduino Regino Silva, do Serviço de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora (MG), pela ajuda no preparo de novo material histológico.

À secretaria do Serviço de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora (MG), representada por Sueli Conde Louzada, Maria Olinda Calzavara Wenzel, Feliciano Louzada Ribeiro e Rosângela Santana.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, em especial, Fernando Augusto Cervantes Garcia de Sousa, Rodrigo Dias Nascimento, Cristina Werkman, Giselle Segnini Senra e Angela Bolanho, pelo convívio e amizade.

Aos colegas Cirurgiões Bucomaxilofaciais Gustavo Saggiaro Oliveira, Herbert Mendes Moraes, Gladson de Souza Gurgel e Rodrigo Falci Santos, pelo suporte dispensado aos meus pacientes e aos meus plantões hospitalares, quando da minha ausência de Juiz de Fora (MG).

“Da mesma maneira que os mestres-arqueiros, os mestres da espada mostram-se imperturbáveis diante de qualquer objeção à sua convicção de que toda espada, forjada com um árduo esforço, assimila o espírito do espadachim. Por essa razão é que ele a forja vestido com ornamentos rituais. Suas experiências são por demais inequívocas, e eles, enriquecidos por experiências humanas, são capazes de ouvir a voz da espada”.

Eugen Herrigel

A Arte Cavalheiresca do Arqueiro Zen.

SUMÁRIO

RESUMO	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Carcinogênese.....	19
2.2 Carcinogênese química.....	22
2.3 Carcinogênese química em glândulas salivares animais.....	25
2.4 Imunoistoquímica.....	32
2.5 Neoplasias primárias de glândulas salivares.....	35
2.6 Imunoistoquímica em neoplasias primárias de glândulas salivares.....	41
2.6.1 Imunoistoquímica para células mioepiteliais.....	41
2.6.2 Imunoistoquímica para miofibroblastos.....	43
2.6.3 Imunoistoquímica em neoplasias.....	45
2.7 Imunoistoquímica em neoplasias induzidas em glândulas salivares.....	49
3 PROPOSIÇÃO	52
4 MATERIAL E MÉTODO.....	53
4.1 Material.....	53
4.1.1 Histoquímica.....	55
4.1.2 Imunoistoquímica.....	55

4.2 Método	56
4.2.1 Estudo histopatológico.....	56
4.2.2 Estudo imunoistoquímico	57
4.2.3 Critérios para avaliação imunoistoquímica.....	59
4.2.4 Documentação fotográfica	60
5 RESULTADOS	61
5.1 Histopatologia	61
5.1.1 Primeiro grupo	62
5.1.2 Segundo grupo	63
5.1.3 Terceiro grupo.....	67
5.1.4 Quarto grupo	71
5.2 Imunoistoquímica	76
5.2.1 Primeiro grupo	77
5.2.2 Segundo grupo	78
5.2.3 Terceiro grupo.....	82
5.2.4 Quarto grupo	86
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÃO	107
8 REFERÊNCIAS	109
APÊNDICE	123
ANEXO	124
ABSTRACT	125

Mainenti P. Imunofenotipagem de lesões obtidas em carcinogênese quimicamente induzida por DMBA em glândulas salivares submandibulares de ratos (*Rattus norvegicus*) [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2009.

RESUMO

A carcinogênese química em glândulas salivares animais não se apresenta como um modelo novo de pesquisa. O uso de DMBA em glândulas submandibulares de ratos produz carcinomas e sarcomas, associados ou não. Apesar de bem estudada a histopatologia deste tipo de carcinogênese, pouco se sabe em relação a imunoistoquímica das neoplasias. Este estudo se propõe a revisar pesquisa pregressa realizada por Mainenti (2006), na tentativa de melhor entender a formação de tumores induzidos por DMBA. O estudo original diagnosticou lesões não neoplásicas, principalmente sialadenites, e tumores como carcinomas, carcinossarcomas e um caso de sarcoma. O presente trabalho fez uso de lâminas e material de estoque em formol. Foram comparadas as lâminas originais com novas lâminas coradas em hematoxilina e eosina. Para a pesquisa de fibras colágenas utilizou-se a coloração pelo método do tricrômico de Gomori. A imunoistoquímica foi realizada utilizando os seguintes anticorpos: AE1/AE3, vimentina, α -SMA, calponina, desmina, miogenina, S-100, CerbB-2 e EMA. Certas lesões, previamente diagnosticadas como sialadenites, foram reclassificadas como carcinomas. A imunoistoquímica foi positiva para os seguintes anticorpos: AE1/AE3 para neoplasia epitelial, vimentina para tecido conjuntivo e tumores mesenquimais, α -SMA e calponina para poucas células fusiformes pleomórficas no estroma dos carcinomas e nas neoplasias mesenquimais. Concluiu-se que a imunoistoquímica revelou diferenciação muito sugestiva de miofibroblastos no estroma dos carcinomas e miofibroblastos compondo o fibrossarcoma e os

carcinosarcomas. Estas células produziram colágeno revelado pelo tricrômico de Gomori. O componente epitelial neoplásico foi sugerido como derivado de células luminiais.

Palavras-chave: Carcinogênese. DMBA. Glândula salivar. Neoplasia. Imunoistoquímica. Miofibroblastos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4NQO = 4-quinolina 1-óxido

AE1/AE3 = Anticorpo monoclonal denominado multi-citoqueratina

CEA = Do inglês “Carcinoembryonic Antigen”, traduzido como antígeno carcinoembriônico.

CerbB-2 = Proteína receptora do fator de crescimento epidérmico

COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CK = Citoqueratinas

c-kit = Receptor celular de citocina

CYP1A1 = Gene que codifica enzima homônima de detoxificação da família do citocromo CYP. Do inglês: (CY)tocrome (P)-450, family (1), subfamily (A), polypeptide (1)

CYP1A2 = Gene que codifica enzima homônima de detoxificação da família do citocromo CYP. Do inglês: (CY)tocrome (P)-450, family (1), subfamily (A), polypeptide (2)

CYP1B1 = Gene que codifica enzima homônima de detoxificação da família do citocromo CYP. Do inglês: (CY)tocrome (P)-450, family (1), subfamily (B), polypeptide (1)

CYP3A4 = Gene que codifica enzima homônima de detoxificação da família do citocromo CYP. Do inglês: (CY)tochrome (P)-450, family (3), subfamily (A), polypeptide (4)

DAB = Cromógeno diaminobenzidina

DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno ou 9,10-dimetil 1,2 benzantraceno

DNA = Do inglês “Desoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucléico

EGF = Do inglês “Epidermal Growth Factor”, traduzido como fator de crescimento epidérmico

EMA = Do inglês “Epithelial Membrane Antigen”, traduzido como anticorpo de membrana epitelial

FOSJC = Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

g = Gramas

H/E = Hematoxilina e Eosina

HHF-35 = Proteína actina músculo específica

HPA = Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

K 8.12 = Anti-citoqueratina 13 e 16

µm = Micrômetro

ml = Mililitros

mg = Miligramas

p53 = Gene p53

PAH = Do inglês “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, traduzido como hidrocarboneto policíclico aromático

PBS = Do inglês “Phosphate buffered saline”, traduzida por solução tamponada de fosfato

PCNA = Do inglês “Proliferating Cell Nuclear Antigen”, traduzido como antígeno nuclear de proliferação celular

pH = Medida de acidez de uma solução – p:potencial e h:hidrogênio

PLAG1 = Proto-oncogene para adenoma pleomórfico

S-100 = Proteína S-100, assim denominada por ser 100% solúvel em sulfato de amônia

UNESP = Universidade Estadual Paulista

α -actina = Proteína do citoesqueleto celular

α -SMA = Do inglês “ α -Smooth Muscle Actin”, traduzido como α -actina músculo liso ou somente actina músculo liso

β -actina = Proteína do citoesqueleto celular

γ -actina = Proteína do citoesqueleto celular

°C = Graus Celsius

% = Porcentagem

1 INTRODUÇÃO

A carcinogênese seja ela em humanos ou em animais é, conceitualmente, um processo complexo que se apresenta após várias etapas de transformação celular (Vainio et al., 1992). Estas alterações celulares têm início após subversões genéticas, seguidas de perda do controle mitótico e, por conseguinte, crescimento neoplásico desgovernado (Mainenti et al., 2008).

Os agentes carcinogênicos podem ser físicos (raios ultravioleta, radiação ionizante), biológicos (vírus) e químicos (metais pesados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) (Woolf, 1998; Fernandes Júnior, 2000). Os efeitos de produtos químicos figuram como tema de relevância em carcinogênese. Os seres humanos são expostos a uma miríade de substâncias químicas que podem, por exemplo, ser encontradas nos locais de trabalho e nas residências, seja na dieta, seja na forma de medicamentos (Farber, 1982). Hábitos como etilismo e tabagismo concorrem para subsidiar efeitos celulares nocivos (Fernandes Júnior, 2000; Serpi, 2003). A inter-relação entre formação neoplásica e fatores predisponentes individuais ou ambientais só foi explorada a partir da década de 60 (Farber, 1982).

Os modelos experimentais se prestam ao estudo da exposição animal às substâncias químicas, principalmente, com o

objetivo de responder questões relativas ao potencial carcinogênico dos vários agentes nas neoplasias humanas (Fassoni et al., 1993).

Os primeiros testes com animais de laboratório e agentes carcinogênicos químicos ocorreram no Japão entre 1917 e 1918 (Shklar, 1970; El-Mofty, 1977; Yamagiwa; Ichikawa, 1977; Bogovski, 1994; Mainenti; Rosa, 2008). As glândulas salivares foram objeto de estudo somente em 1939 (El-Mofty, 1977). Contudo, o marco da carcinogênese em glândulas salivares animais data de 1942, com Steiner. Este autor foi o pioneiro na padronização de metodologias de estudo para vários animais e substâncias carcinogênicas (Standish, 1957; Cataldo et al., 1964; Shklar, 1970; El-Mofty, 1977; Mainenti et al., 2008).

A substância DMBA (9,10-dimetil 1,2-benzantraceno) apresenta potencial carcinogênico bem conhecido (Fassoni et al, 1993; Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008). Nas glândulas salivares de ratos e hamsters, vários autores utilizaram metodologias diferentes de introdução de DMBA, conforme o levantamento bibliográfico de Mainenti e Rosa (2008). O DMBA foi utilizado, principalmente, por implantação na forma de *pellet* ou injetado na forma de solução, em diferentes veículos como vaselina e acetona (Chaudhry et al., 1966; Turbiner; Shklar, 1969; Hindy et al., 1995; Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008).

Existe uma marcada incongruência no que se refere aos resultados encontrados na literatura, sobre carcinogênese quimicamente induzida em glândulas salivares de ratos. Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008) foram capazes de identificar, por

histopatologia, a presença de neoplasias epidermóides, mesenquimais e mistas malignas.

Pouco se conhece em relação à histogênese das neoplasias induzidas em glândulas salivares animais e escassas são as pesquisas interessando a imunistoquímica destes tumores.

Pretende-se, então, estudar o trabalho realizado por Mainenti em 2006. Neste foram induzidos tumores em glândulas salivares de ratos, após injeção de DMBA. Os achados neoplásicos desta pesquisa revelaram carcinomas, carcinossarcomas e um caso de sarcoma.

A intenção da presente pesquisa é de contrastar os dados originais com novo processamento histológico e imunistoquímico. Desta maneira pretendemos diminuir a carência de dados no que concerne à identidade celular de neoplasias induzidas por injeção de DMBA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinogênese

A carcinogênese é entendida como um fenômeno no qual há interação entre um agente oncogênico e os genes celulares, culminando em alterações fenotípicas nas células (Woolf, 1998; Fernandes Júnior, 2000; Mainenti; Rosa, 2008; Mainenti et al., 2008). Os carcinógenos podem ser viróticos, físicos e, principalmente, químicos (Fernandes Júnior, 2000).

A exposição humana a agentes tóxicos e carcinogênicos é, atualmente, bem expressiva (Mainenti; Rosa, 2008). Os produtos químicos figuram como importantes componentes na gênese de muitas neoplasias no homem. As substâncias podem ser naturais ou produzidas pela indústria. Além da exposição em ambientes sociais como residências e locais de trabalho, o ser humano tem contato, por exemplo, com químicos ambientais como pesticidas e fungicidas utilizados nas lavouras, através de sua dieta (Farber, 1982). Hábitos nocivos modernos como o alcoolismo e o tabagismo se somam aos riscos já mencionados (Fernandes Júnior, 2000; Serpi, 2003). O interesse em se estudar as propriedades de substâncias químicas em pesquisas se dá pela necessidade de conhecimento de seus efeitos nefastos (Jussila, 2000). Desta maneira podem ser estudadas formas

de controle de produtos potencialmente carcinogênicos do ambiente (Farber, 1982). Segundo Bogovski (1994), os modelos de carcinogênese iniciais, realizados em pele de camundongos, desde 1917, contribuíram efetivamente para o conhecimento do câncer e de sua relação com agentes ambientais.

Conforme lembram Bogovski (1994) e Jussila (2000), em 1947, com Berenblum e Shubik e em 1954 com Berenblum, os estudos de carcinogênese em pele de camundongos elucidaram dois estágios na formação do câncer: iniciação e promoção. Atualmente, sabe-se que os conceitos de formação neoplásica passam por três eventos conhecidos como iniciação, promoção e progressão. Para que as neoplasias se desenvolvam é necessário que as três etapas ocorram de forma seqüencial (Woolf, 1998; Fernandes Júnior, 2000; Serpi, 2003).

A iniciação é entendida como uma exposição do genoma celular a um agente carcinogênico com uma conseqüente alteração genética. Fracos carcinógenos ou baixas doses dos mesmos podem não ser suficientes para danificar permanentemente uma linhagem celular, sem auxílio de outras substâncias. Entretanto, modificações do genoma são esperadas após contato celular com altas doses de carcinógeno, em evento isolado (Woolf, 1998). As alterações de DNA podem se traduzir em mutações ativando ou desativando genes que controlam funções da célula (Rodrigues; Camargo, 1999).

A carcinogênese pode interferir em mecanismos que mantém o equilíbrio das populações celulares. A inativação de um gen supressor de tumor, como o p53, se traduz em diminuição de mortes

programadas (apoptose), alterando o equilíbrio entre proliferação e morte celular em favor da primeira (Jussila, 2000). Os proto-oncogenes são os genes que, após ativação por mutações gênicas, aberrações cromossômicas ou amplificação, proporcionam a autonomia proliferativa celular (Cerqueira, 2000). Em resumo, genes supressores de tumor desativados trazem perda de função enquanto que, a ativação de um proto-oncogene em oncogene, se traduz em ganho funcional (Cerqueira, 2000; Jussila, 2000).

De forma experimental pode-se ativar, geneticamente, a proliferação celular. Um exemplo de ativação artificial de genes pode ser conferido a seguir. Declercq et al. (2005) produziram cepas de camundongos transgênicos em relação ao proto-oncogene para adenoma pleomórfico (PLAG1). Os genes ativados promoveram formação de neoplasias semelhantes às humanas. Todavia, os tumores inicialmente benignos, progrediram para malignização. Por este trabalho conclui-se que as alterações genéticas de neoplasias humanas, como o adenoma pleomórfico, são adquiridas acidentalmente, ao passo que, no experimento em questão, os animais foram geneticamente alterados. Desta maneira, os indivíduos expressaram, em suas células glandulares, de maneira inerente, as alterações genéticas. O crescimento tumoral, então, escapou dos mecanismos de controle de multiplicação.

A promoção é um evento que sucede a iniciação. A célula que sofreu iniciação tem contato com um agente promotor, seja ele iniciador ou não, e passa a se multiplicar, exibindo fenótipos malignos (Fernandes Júnior, 2000; Serpi, 2003). Conforme menção de

Woolf (1998), a promoção pode ser dividida em dois estágios. O estágio 1 da promoção é percebido nas experiências com carcinogênese química em pele. O agente promotor, em contato único com a célula, tem capacidade de estimular as divisões celulares. Todavia, em outros estudos, como na carcinogênese de bexiga, a sacarina e o ciclamato podem agir como promotores lentos, necessitando de exposição celular contínua e somatória. É neste processo lento, denominado estágio 2, que substâncias quimioprotetoras, como os retinóides, podem ser utilizadas.

A progressão, terceira fase da formação neoplásica, consiste na expansão dos clones celulares tumorais, seja locoregionalmente, seja à distância. São comuns invasões de estruturas e metástases (Fernandes Júnior, 2000). A interação entre neoplasia e hospedeiro é complexa. Para a disseminação de células cancerosas, estas devem produzir ou devem induzir o hospedeiro a produzir enzimas para a degradação da matriz extracelular (Jussila, 2000). Para Serpi (2003), nesta etapa podem ocorrer eventos genéticos adicionais aos da fase de iniciação. Com o crescimento tumoral a angiogênese também é esperada.

2.2 Carcinogênese química

Os carcinógenos químicos podem ser iniciadores, promotores ou podem ser ambos, dependendo de suas propriedades,

de seus subprodutos e do tipo de célula afetada (Fernandes Júnior, 2000). São representados por agentes naturais (aflatoxina B1), agentes sintéticos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aminas aromáticas), agentes alquilantes (quimioterápicos anticâncer) e fatores endógenos (hormônios e sais biliares) (Rodrigues; Camargo, 1999).

Do ponto de vista histórico, duas observações de médicos ingleses foram importantes no reconhecimento de neoplasias causadas por substâncias químicas. Hill, em 1761 relacionou o uso do tabaco aos cânceres de pulmão e Percival Pott, em 1775, compreendeu a relação entre carcinoma epidermóide da pele do escroto de limpadores de chaminé e resíduos da combustão de carvão. As substâncias carcinogênicas, em questão, são hoje reconhecidas como parte de um grupo de compostos denominados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Woolf, 1998; Rodrigues; Camargo, 1999; Fernandes Júnior, 2000; Mainenti; Rosa, 2008).

Os experimentos com carcinógenos químicos foram tentados por vários autores. Yamagiwa e Ichikawa, em 1917, obtiveram sucesso em causar neoplasias benignas em orelhas de coelhos, após 30 a 100 dias pincelando alcatrão, um precursor dos HPA. Os carcinomas ocorreram entre 55 e 360 dias (Yamagiwa; Ichikawa, 1977).

Os HPA são carcinógenos indiretos de grande estabilidade no meio ambiente. São ubíquos e ocorrem pela combustão incompleta de combustíveis fósseis, estando presentes na fumaça dos automóveis, no fumo, no solo, na água e em alimentos, especialmente os defumados. Os principais exemplos de HPA são o

DMBA, o metilcolantreno, o benzopireno e o 4-quinolina 1-óxido (4NQO) (Serpi, 2003; Kumar et al., 2005; Mainenti; Rosa, 2008). O DMBA é considerado um carcinógeno químico completo por responder pela iniciação, promoção e progressão neoplásica (Fassoni et al., 1993; Sumitomo et al., 1996; Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008).

OS HPA são denominados pro ou pré-carcinógenos quando fora dos organismos e dependem de ativação metabólica para interagir com as macromoléculas celulares (Weisburger, 1994). Também podem ser chamados de carcinógenos remotos (Woolf, 1998). Após ativação endógena os metabólitos de potencial oncogênico passam a se chamar carcinógenos imediatos. Uma vez em interação com o DNA celular eles passam a ser conhecidos como carcinógenos definitivos (Woolf, 1998).

O sistema enzimático do citocromo P-450 pode agir nas substâncias xenobióticas, como os carcinógenos químicos, de duas maneiras. A oxidação do carcinógeno pode resultar em substâncias atóxicas ou pode formar subprodutos com potencial de união ao DNA celular. Ocorrendo este último processo, modificações genéticas são esperadas e, por conseguinte, células fenotipicamente alteradas podem expressar um perfil neoplásico (Weisburger, 1994; Ide et al., 2002). A substância ativada por oxidações dos HPA é denominada 3,4-diol-1,2-epóxido (Ide et al., 2004).

As enzimas que participam do metabolismo dos HPA, no sistema hepático do citocromo P-450, são a CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 e CYP3A4 (Serpi, 2003). Snyder e Hong (2004) comentam

que cada tipo de enzima do grupo CYP é própria deste ou daquele órgão, nos animais superiores. O mecanismo de resposta individual aos carcinógenos, segundo estes autores, parece estar vinculado às diferenças nas atividades enzimáticas dos órgãos-alvo e nas diferenças entre as substâncias tumorigênicas.

O metabolismo do DMBA segue o padrão exibido pelos outros componentes do grupo dos HPA. As isoformas de CYP responsáveis pela ativação do DMBA são CYP1A (fígado) e CYP1B (órgãos extra-hepáticos). Nos tumores induzidos por DMBA, parece que, em primeira instância, ocorre uma ativação hepática parcial seguida de completa ativação do carcinógeno no órgão-alvo (Girolami et al., 2008). Segundo Girolami et al. (2008), a utilização de fármacos inibidores de CYP1A poderia reduzir a incidência de neoplasias. A diminuição destas enzimas certamente alteraria a disponibilidade do receptor aril hidrocarboneto no fígado, principal ligante dos HPA.

2.3 Carcinogênese química em glândulas salivares animais

De uma maneira geral, os modelos animais se prestam favoravelmente ao estudo do câncer em suas variadas localizações anatômicas. Vantagens e desvantagens podem ser apontadas para as pesquisas *in vivo*. Como vantagens temos a possibilidade de acompanhamento da história natural das neoplasias, observando as interações da doença com o seu hospedeiro. Contudo, certos estudos

de carcinogênese trazem muitas diferenças anatômicas e de etiopatogênese quando são comparados os achados em homens e animais (Jussila, 2000). Do ponto de vista das glândulas salivares a carcinogênese se verifica com pertinência uma vez que neoplasias primitivas de glândulas salivares humanas são raras (Mainenti; Rosa, 2008).

As neoplasias espontâneas de glândulas salivares de camundongos e hamsters são extremamente infreqüentes (Frith; Heath, 1994; Takahashi; Okamiya, 1996). Conforme apontam Frith e Heath (1994), a observação de tumores em camundongos é praticamente atrelada à indução química.

Historicamente, os experimentos endereçados a carcinogênese química de glândulas salivares animais foram realizados com sucesso, em 1939, por Benecke e Schröder, após uso de benzopireno (Bauer; Byrne, 1950; El-Mofty, 1977b).

Em 1942, Steiner realizou um importante ensaio científico utilizando vários carcinógenos do grupo dos HPA e vários modelos animais para carcinogênese de glândulas salivares. Sua pesquisa foi importante no reconhecimento das variações de resultados entre espécies animais. (Bauer; Byrne, 1950; Cataldo et al., 1964; Shklar, 1970; El-Mofty, 1977b; Takahashi; Okamiya, 1996). Soube-se, então, que ratos, camundongos e porquinhos-da-índia são sensíveis aos carcinógenos químicos. Todavia, os coelhos não (Bauer; Byrne, 1950). Pesquisas clássicas foram realizadas, posteriormente, por muitos estudiosos, cada qual utilizando sua própria metodologia (Ebling et al., 1965).

Kim et al. (1974), El-Mofty (1977b), Hindy et al. (1995) e Ogawa et al. (2000) lembram que, o uso de roedores em carcinogênese de glândulas salivares é conveniente, seja pela facilidade de manipulação dos animais, seja pela susceptibilidade das glândulas submandibulares aos carcinógenos químicos.

O DMBA é considerado o carcinógeno de escolha em tumorigênese de glândulas salivares animais (Ebling et al., 1965; Hindy et al., 1995) por ser potente e de resultados rápidos (Ogawa et al., 2000). Esta substância é um carcinógeno completo, respondendo por todas as etapas da carcinogênese (Fassoni et al., 1993; Mainenti, 2006; Mainenti; Rosa, 2008; Mainenti et al., 2008).

Segundo a preferência de cada autor, o DMBA foi utilizado por meio de implantação nas glândulas salivares (Bauer; Byrne, 1950; Standish, 1957; Cataldo et al., 1964; Ebling et al., 1965; Chaudhry et al., 1966; Turbiner; Shklar, 1969; Sheehan; Shklar, 1972; El-Mofty, 1977b; El-Mofty, 1978; Hindy et al., 1995; Sumitomo et al., 1996) por meio de injeção (Schmutz; Chaudhry, 1969; Kim et al., 1974; Takeuchi et al., 1975; Wigley; Carbonell, 1976; Takai et al., 1984; Zaman et al., 1996; Tsujimoto et al., 1999; Ogawa et al., 2000; Ide et al., 2002; Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008) ou instilado, por canulação, diretamente nos ductos (Sela et al., 1974). Quando o DMBA foi utilizado via tubo intragástrico (Dias et al., 1999) ou oferecido na alimentação (Girolami et al., 2008), neoplasias mamárias se apresentam de forma expressiva, sendo os tumores de glândula salivar subsidiários a estas (Dias et al., 1999).

Os estudiosos que se interessam pela carcinogênese química induzida em glândulas salivares animais diagnosticaram, basicamente, carcinomas e sarcomas (Standish, 1957; Cataldo et al., 1964; Ebling et al., 1965; Chaudhry et al., 1966; Schmutz; Chaudhry, 1969; Turbiner; Shklar, 1969; Sheehan; Shklar, 1972; Sela et al., 1974; Takeuchi et al., 1975; Wigley; Carbonell, 1976; El-Mofty, 1977b; El-Mofty, 1978; Takai et al., 1984; Frith; Heath, 1994; Hindy et al., 1995; Sumitomo et al., 1996; Zaman et al., 1996; Ogawa et al., 2000; Ide et al., 2002; Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008). Estes tumores se mostraram isolados ou em associação. Autores como Sela et al. (1974), não encontraram carcinomas e, sim, exclusivamente sarcomas. Alguns poucos pesquisadores descreveram diagnósticos de adenomas (Frith; Heath, 1994) e adenocarcinomas (Bauer; Byrne, 1950; Cataldo et al., 1964; Frith; Heath, 1994; Ogawa et al., 2000; Zaman et al., 1996).

Apesar dos achados constantes de carcinomas amalgamados ou não a sarcomas, em muitos experimentos, pouco interesse sobre estas associações foi dado nas pesquisas. No entendimento de Takahashi e Okamiya (1996), por exemplo, não se verificou a ocorrência de neoplasias mistas verdadeiras em hamsters. Segundo Takai et al. (1986) as alterações sarcomatosas muitas vezes se associaram a carcinomas, recebendo a designação de “tumores de colisão”. Conforme Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008), as neoplasias denominadas “tumores de colisão” devem ser referidas por carcinossarcomas. Estes autores afirmaram que estas lesões constituem tumores mistos verdadeiros apresentando dois

parênquimas neoplásicos associados, ou seja, um sarcomatoso e outro carcinomatoso.

A metodologia para implantação de *pellet* de DMBA, em glândulas salivares de ratos, foi bem documentada por Cataldo et al. (1964). Estes autores descreveram os vários passos de sua técnica. Referiram o uso de uma incisão cervical, a exposição das glândulas salivares, a implantação de *pellets* e a história natural das neoplasias induzidas. Em relação à injeção de DMBA, o procedimento cirúrgico descrito por Zaman et al. (1996) constou de uma exposição glandular para penetração de uma agulha. A incisão, tanto para implantação de *pellet* de DMBA quanto para sua injeção foi referenciada de duas maneiras: 1) longitudinal ao pescoço do rato (Cataldo et al., 1964; Zaman et al., 1996); 2) oblíqua cervical (Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008). Esta última técnica, segundo Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008), ofereceu a vantagem de expor diretamente a glândula submandibular, com pouca necessidade de divulsão dos tecidos.

O implante de DMBA foi parcamente descrito na literatura. Ebling et al. (1965) e Hindy et al. (1995) reportaram a inoculação de DMBA em pó, utilizando uma agulha modificada. Um procedimento similar foi citado por El-Mofty (1977b). As soluções de DMBA foram utilizadas com veículos como vaselina líquida (Schmutz; Chaudhry, 1969; Kim et al., 1974) e acetona (Tsujimoto et al., 1999; Ide et al., 2002; Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008). As concentrações de DMBA variaram de 0,05 ml/ 0,1 % (0,05 mg) até 0,05 ml/ 4,0 % (2 mg) dependendo do animal de estudo (Hindy et al., 1995).

A história natural da formação de carcinomas em glândulas salivares de ratos, após uso de implantes de DMBA, foi caracterizada em quatro etapas (Cataldo et al., 1964; Turbiner; Shklar, 1969; El-Mofty, 1977b; Takeuchi et al., 1975; Takai et al., 1986). Inicialmente, houve uma fase degenerativa ocorrendo necrose por coagulação das células ao redor do *pellet*, associada à intensa reação inflamatória. Na segunda fase ocorreu proliferação de epitélios ductais, desenvolvimento de cistos e achados de displasias epiteliais. A terceira fase se caracterizou pela presença de metaplasia escamosa dos cistos, seguida por aposição de várias camadas de células epiteliais e profusa produção de queratina. A quarta fase foi marcada por uma formação de carcinomas na intimidade da parede cística nas áreas displásicas.

Os casos de carcinoma, induzidos em glândulas salivares de ratos por El-Mofty (1977a), foram avaliados como tumores com baixo índice mitótico e certo compromisso na formação de queratina intra-lesional.

Para Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008), em carcinogênese DMBA-induzida por injeção intraglandular, as fases da história natural dos carcinomas foram semelhantes aos autores que o precederam. Embora estes autores tenham verificado que a fase degenerativa fora compatível com quadro histopatológico de sialadenite, devendo ser assim denominada. As outras etapas (proliferativa, metaplásica e neoplásica maligna) foram, também, reconhecidas por estes autores. Contudo, seus achados apontaram para a ocorrência de campos histológicos de atipias celulares epiteliais,

neoplasias malignas epiteliais e pleomorfismo fibroblástico a partir da segunda fase, indicando uma ocorrência pré-neoplásica em etapa proliferativa. Devido a estas observações, os autores em questão foram capazes de reconhecer, além de neoplasias epiteliais e mesenquimais, neoplasias mistas malignas.

No que respeita a histogênese das neoplasias induzidas por DMBA, muitas são as especulações encontradas na literatura pertinente. Em 1950, Bauer e Byrne, sugeriram a ocorrência de células mioepiteliais com morfologia variada, se insinuando na interface de adenocarcinomas induzidos em parótidas e submandibulares de camundongos. Estes autores foram os primeiros a fazer alusão a uma identidade pluripotente de células da região dos ductos intercalares na gênese neoplásica induzida. Certos autores, contudo, apontaram somente as células ductais como envolvidas no processo de transformação neoplásica dos carcinomas (Turbiner; Shklar, 1969; Sumitomo et al., 1996; Takai et al., 1986; Ogawa et al., 2000). Outras possibilidades levantadas fizeram menção a metaplasia e transformação neoplásica de células ductais e acinares (El-Mofty, 1977b; El-Mofty, 1978). Segundo Kim et al. (1974), uma metaplasia confinada às células acinares as transformaria em células ductais e, a partir destas, surgiriam neoplasias por desdiferenciação. Somente em 2000, Ogawa et al. voltaram a cogitar a participação de células mioepiteliais, após induzirem a formação de adenocarcinomas submandibulares em filhotes de ratos.

A origem dos sarcomas foi, todavia, pobremente estudada. Referiram Ogawa et al. (2000) que os sarcomas podem se

formar a partir do tecido conjuntivo de reparação e de músculos estriados adjacentes às glândulas. Contudo, esta matéria não foi profundamente abordada por estes autores.

2.4 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica é um método de estudo, mas, principalmente, de auxílio em diagnóstico histopatológico (Alves et al., 2004; Rangel et al., 2008). Basicamente, é uma técnica que consiste na interação específica entre antígeno e anticorpo evidenciada por agente cromógeno detectável sob microscopia óptica. Em resumo, obrigatoriamente há a necessidade de três requisitos: 1) sistema de detecção; 2) presença de antígeno imunorreativo; 3) anticorpo específico. Outros componentes da imunoistoquímica são os controles positivos e negativos de reação (Matthews, 1987).

O esqueleto celular é formado por microtúbulos e filamentos. Os primeiros orientam as organelas e suas secreções no interior das células. Os filamentos se subdividem em microfilamentos e filamentos intermediários. Os microfilamentos conferem às células um poder de contração por meio das proteínas actina e miosina. Para a manutenção morfológica celular e contato intercelular, são de importância, as proteínas denominadas filamentos intermediários, como a vimentina (morfologia) e a citoqueratina (morfologia e adesão) (Ten Cate, 2001; Moll et al., 2008). As citoqueratinas são

importantes na estabilização estrutural das células epiteliais, pois estes filamentos se inserem em desmossomas e hemidesmossomas promovendo conexão célula-célula e célula-membrana basal, respectivamente (Moll et al., 2008). Os filamentos intermediários podem formar uma rede estrutural que conecta núcleo, organelas e membrana celular. Estes filamentos podem variar de célula para célula e em relação aos estágios de maturação das mesmas (Machado; Figueiredo, 1996).

O conhecimento da constituição filamentar das células indica a sua natureza (Palmer, 1986). Sendo assim, os filamentos que apontam para os diversos tipos celulares são: as citoqueratinas (tecido epitelial), vimentina (tecido mesenquimal), proteína glial fibrilar ácida (astrócitos) e neurofilamentos (neurônios). Os filamentos são constituídos por áreas de homologia e divergência no que interessa às suas seqüências de aminoácidos (Machado; Figueiredo, 1996).

Os filamentos foram pesquisados com sucesso por meio da imunistoquímica, principalmente para o diagnóstico e classificação de tumores humanos. Para os músculos estriados se identificou a desmina. As actinas, consideradas proteínas ubíquas do citoesqueleto, foram classificadas em α , β e γ -actinas. A primeira se relaciona aos músculos e as outras interessam células não-musculares. Como exemplo, as células mioepiteliais podem expressar β e γ -actinas (Miettinen, 1988).

As citoqueratinas, ou simplesmente queratinas, são filamentos encontrados, por exemplo, nos epitélios do trato gastrointestinal e gênito-urinário. Elas recebem seu nome de acordo

com seu peso molecular (Alves et al., 2004; Moll et al., 2008). Nos seres humanos, 54 tipos foram catalogados (Moll et al., 2008). Nas glândulas salivares as queratinas são evidentes nos ductos estriados e em neoplasias de origem ductal. Os anticorpos anti-citoqueratina podem ser utilizados no diagnóstico de neoplasias epiteliais (Takai et al., 1984), principalmente aquelas indiferenciadas (Alves et al., 2004). Para Palmer (1986), algumas queratinas podem ser úteis na marcação do componente epitelial das células mioepiteliais. Contudo, variações nas reações antígeno-anticorpo poderiam ocorrer como resultado de uso de clones específicos ou inespecíficos para o antígeno. De qualquer forma, o *pool* de queratinas, parece ser eficaz na evidênciação epitelial.

Segundo Rangel et al. (2008), cada vez mais aumenta o número de anticorpos disponíveis comercialmente, melhorando o reconhecimento de tumores e a caracterização de linhagens celulares. Para estes autores, a imunistoquímica é válida na diferenciação entre tumores benignos e malignos, no reconhecimento de neoplasias epiteliais e mesenquimais e, também, é útil na classificação de neoplasias sólidas sarcomatosas.

O papel do sistema imune na vigilância das alterações celulares é reconhecido no estudo imunológico das neoplasias. Sabe-se que células tumorais podem se mostrar com perfis antigênicos diferentes das células normais. Isso se deve pela exacerbação ou desaparecimento de certos antígenos. Em neoplasias induzidas quimicamente, por exemplo, a supressão experimental do sistema imunológico se traduz em anaplasia tumoral (El-Mofty, 1977a). Desta

feita, cabe o entendimento de que a imunistoquímica endereçada às células normais pode não ser efetiva em células tumorais.

2.5 Neoplasias primárias de glândulas salivares

O entendimento da histogênese dos tumores de glândulas salivares requer um conhecimento dos tipos celulares que constituem as glândulas normais (Dardick, 1996). Basicamente, a formação da saliva é de competência dos ácinos e, seu transporte e liberação, cabe ao sistema ductal (Ten Cate, 2001). As células das glândulas salivares podem ser luminais (ácinos e células de revestimento luminal de ductos) e não luminais (células mioepiteliais e basais). O tecido conjuntivo das glândulas salivares demonstra similaridade com outras regiões anatômicas. Basicamente é formado por uma matriz extracelular de fibras colágenas e uma substância fundamental de glicoproteínas e proteoglicanas nas quais se insinuam fibroblastos (Ten Cate, 2001).

Burgess et al. (1996) comentam que a variedade de lesões neoplásicas possíveis, em glândulas salivares, se dá pela interação entre as células do parênquima. As células mioepiteliais são tidas como importantes neste leque de lesões uma vez que, no pâncreas, não há mioepitélio, reduzindo a gama de tumores. Para Foschini e Eusebi (2004) as neoplasias glandulares são de difícil

diagnóstico pela raridade de muitos casos e pela exuberante variação entre tumores.

As células mioepiteliais são encontradas em muitas glândulas exócrinas dos mamíferos, estando entre a parte secretória e a lâmina basal (Ogawa et al., 1999; Eveson et al., 2005). Nas glândulas salivares a célula mioepitelial se associa aos ácinos e aos ductos intercalares (Ten Cate, 2001). Conforme indicações de Ogawa et al. (2000) as células mioepiteliais são híbridas, com características epiteliais e musculares. Ten Cate (2001) aponta uma origem epitelial para as células mioepiteliais e uma semelhança ultra-estrutural entre estas e as células musculares lisas. Morfologicamente, as células mioepiteliais são estreliformes na região secretória e fusiformes quando relativas aos ductos intercalares (Ten Cate, 2001).

Sobre a morfologia de células neoplásicas mioepiteliais são possíveis células alongadas, afiladas, fusiformes e plasmocitóides (Prasad et al., 1999).

Indicam Neville et al. (2004) que os tumores de glândula salivar contabilizam, mundialmente, 1 a 6,5 casos por 100.000 indivíduos. Na nosologia neoplásica de glândulas salivares humanas, são mais esperadas lesões primárias benignas como o adenoma pleomórfico e o tumor de Warthin (Carson et al., 1995; Neville et al., 2004; Eveson et al., 2005).

Certos tumores produzidos experimentalmente em animais, como os carcinomas, os sarcomas e os carcinosarcomas são extremamente raros em humanos. Os carcinosarcomas, os sarcomas e os carcinomas são encontrados em 0,1 a 0,2%, 0,6% e menos de 1%

dos tumores de glândulas salivares, respectivamente (Auclair; Ellis, 1991; Alvarez-Cañas; Rodilla, 1996; Gnepp, 2005a; Lewis; Olsen, 2005; Capuano et al., 2007; Staffieri et al., 2007; Kim et al., 2008). Os carcinomas e sarcomas não se apresentam, morfológicamente, diferentes de outros sítios anatômicos. Normalmente não necessitam de estudo imunoistoquímico. Contudo, para o diagnóstico diferencial entre neoplasias indiferenciadas, pode existir a necessidade de uso de anticorpos específicos (Gnepp, 2005a; Lewis; Olsen, 2005). A ocorrência de carcinomas primitivos de glândulas salivares é um tema de importância diagnóstica principalmente quando se tem a necessidade de realizar diagnóstico diferencial com tumores metastáticos (Lewis; Olsen, 2005).

A histogênese dos sarcomas de glândulas salivares é questionada. Aventa-se a possibilidade de origem mioepitelial ou origem de células mesenquimais pluripotenciais. Esta última hipótese é defendida por Auclair e Ellis (1991). Segundo Thompson e Fanburg-Smith (2005), especula-se, para os sarcomas constituídos de células fusiformes, uma origem fibroblástica/miofibroblástica (Thompson; Fanburg-Smith, 2005). As células miofibroblásticas são tidas como fibroblastos que, sob estimulação, passam a expressar α -actinas e, às vezes, desmina e miosina (Fisher, 2004).

Segundo Gnepp (2005b), qualquer tipo de sarcoma pode ocorrer nas glândulas salivares, sendo os mais comuns, com incidência decrescente, os seguintes: hemangiopericitoma, schwannoma maligno, fibrossarcoma e histiocitoma fibroso maligno. Em relação a esta última lesão, Thompson e Fanburg-Smith (2005)

informam que seu diagnóstico somente ocorre após exclusão de outros sarcomas. Interessante, também, é a alusão ao fato deste tumor ser o mais prevalente em adultos. Woolf (1998) e Rosenberg (2000), comungam da idéia de ser esta lesão o sarcoma mais comum na idade adulta. Segundo Woolf (1998), apesar de sugerir no nome uma diferenciação monocítica-macrofágica, os histiocitomas fibrosos malignos parecem ser relacionados somente a fibroblastos pleomórficos. Rosenberg (2000) acredita na possibilidade destes tumores serem variantes pleomórficas de lesões de tecido gorduroso e de musculatura lisa ou estriada. Aduzem, ainda, a ocorrência de fundo colágeno nos campos histológicos e a ocasionais macrófagos espumosos.

Segundo Guillou (2008), os histiocitomas fibrosos malignos não passam de um padrão histológico que compreende a existência de muitas células sarcomatosas pleomórficas. Recentes estudos de imunoistoquímica e microscopia eletrônica teriam sido decisivos na caracterização de pleomorfismo em lipossarcomas, leiomiossarcomas e rabdomiossarcomas.

Dos possíveis sarcomas, os miofibrossarcomas ou também denominados sarcomas miofibroblásticos de baixo grau, parecem ser os mais raros em cavidade bucal e em glândulas salivares (Mentzel; Fletcher, 2002). Conforme Jay et al. (2007), estas lesões podem ser mais comuns do que se imagina. Todavia, existe uma marcada falta de consenso entre autores, dificultando o reconhecimento e classificação destas neoplasias.

Conforme Kwon e Gu (2001) e Kim et al. (2008), em 1951 achava-se que os carcinossarcomas apresentavam um componente maligno epitelial e que o estroma do tumor fosse sarcomatóide, ou seja, de origem epitelial. Em 1967, os carcinossarcomas foram reconhecidos como tumores verdadeiramente compostos por dois padrões celulares (Kwon; Gu, 2001; Kim et al., 2008). Desde aquela época os carcinossarcomas são compreendidos como neoplasias mistas verdadeiras, constituídas por elementos carcinomatosos e sarcomatosos associados em proporções variadas (Gnepp; Wenig, 1991; Bildirici; Eren, 2003; Neville et al., 2004; Gnepp, 2005a; Staffieri et al., 2007; Völker et al, 2007; Kim et al., 2008). Götte et al. (2000) afirmaram que os carcinossarcomas se mostram como tumores desafiadores, pois: 1) nada se sabe sobre as alterações moleculares durante a gênese tumoral; 2) a origem clonal é um assunto controverso; 3) a origem mioepitelial é discutida.

Stojadinovic et al. (2001) consignaram três possibilidades para a formação de carcinossarcomas. Segundo eles os estudiosos da matéria sugerem uma origem monoclonal ou policlonal ou neoplasias epiteliais e mesenquimais em colisão.

Os defensores da teoria monoclonal identificam a célula mioepitelial, fenotipicamente alterada, como responsável pela diferenciação tumoral em carcinoma e sarcoma (Carson et al., 1995; Dardick, 1996). De forma coincidente, Götte et al. (2000) sugeriram a mesma teoria. Seus estudos apontaram para uma diferenciação mioepitelial rudimentar. Gnepp e Wenig (1991) também confirmaram a possibilidade de existência de regiões focais com características

mioepiteliais nas lesões por eles avaliadas. Para Völker et al. (2007), os campos histológicos dos carcinossarcomas seriam advindos de um clone celular pluripotente. Kim et al. (2008) são partidários da idéia de uma única célula progenitora em carcinossarcomas.

No que respeita as dúvidas sobre formação dos carcinossarcomas, Kwon e Gu (2001) entenderam que uma origem mioepitelial poderia ser aventada em caso de neoplasia ocorrendo em adenoma pleomórfico. No caso de carcinossarcomas primários, a teoria monoclonal seria de difícil explicação. Outros pesquisadores discutem a participação estritamente mioepitelial nos carcinossarcomas. Alvarez-Cañas e Rodilla (1996) defenderam, em um estudo de caso, a teoria policlonal. Para os mesmos, os campos carcinomatosos apontaram para uma origem ductal e os sarcomas seriam mioepiteliais. Stojadinovic et al. (2001) reconheceram, por imunohistoquímica, uma real identidade bifásica em um raro carcinossarcoma de mucosa bucal, sem a participação de estruturas de glândulas salivares.

O componente epitelial dos carcinossarcomas pode ser um moderado ou pouco diferenciado carcinoma ductal (Gnepp; Wenig, 1991; Carson et al., 1999; Gnepp, 2005a), um adenocarcinoma pouco diferenciado (Kwon; Gu, 2001; Neville et al., 2004, Gnepp, 2005a; Staffieri et al., 2007; Kim et al., 2008), um carcinoma diferenciado (Capuano et al., 2007) ou um carcinoma indiferenciado (Gnepp; Wenig, 1991; Carson et al., 1995; Kwon; Gu, 2001; Neville et al., 2004; Gnepp, 2005a; Kim et al., 2008). A porção mesenquimal do tumor pode se mostrar com aparência variada. Os osteossarcomas

(Gnepp, 2005a), e condrossarcomas parecem dominar os elementos carcinomatosos (Kwon; Gu, 2001; Gnepp, 2005a; Staffieri et al., 2007). Contudo, outros padrões também são reconhecidos como: lipossarcoma (Neville et al., 2004; Kim et al., 2008), fibrossarcoma (Neville et al., 2004; Capuano et al., 2007; Kim et al., 2008) ou histiocitoma fibroso maligno (Neville et al., 2004). Carson et al. (1995), todavia, apontaram como raros os achados de sarcoma indiferenciado, osteossarcoma, lipossarcoma e histiocitoma fibroso maligno. São infreqüentes, em neoplasias mistas malignas de glândulas salivares, os rhabdomyosarcomas (Kwon; Gu, 2001; Staffieri et al., 2007).

2.6 Imunoistoquímica em neoplasias primárias de glândulas salivares.

2.6.1 Imunoistoquímica para células mioepiteliais

Os marcadores imunoistoquímicos para células mioepiteliais normais e tumorais foram pesquisados por Araújo et al. (2000). Estes autores mostraram que dos primeiros estudos imunoistoquímicos, no início da década de 1980, até o ano de 2000, os marcadores, sempre tidos como os mais importantes para cada época, foram o S-100, a vimentina, a miosina, a actina músculo específica (α -

SMA) e, por último, a calponina. Por meio de um painel constituído por vimentina, α -SMA, e citoqueratinas, os autores afirmaram poder diagnosticar, com efetividade, 114 neoplasias de glândulas salivares. Suas deduções mostraram que das células neoplásicas, somente as mioepiteliais exibem perfis imunoistoquímicos fortemente variados.

O perfil imunoistoquímico das células mioepiteliais neoplásicas pode ser difícil de ser traçado. Esta matéria foi investigada por estudos com adenomas pleomórficos e mioepiteliomas (Araújo et al., 2000). Prasad et al. (1999) afirmaram que mesmo em tecidos normais certos anticorpos não podem ser pensados como específicos para células mioepiteliais. Segundo os mesmos, o anticorpo S-100 não seria exclusivo destas células, por exemplo. O painel ideal para células mioepiteliais deveria incluir α -SMA, miosina e calponina.

Autores recentes afirmaram que as células mioepiteliais são tidas como de natureza híbrida, ou seja, expressando proteínas epiteliais e musculares (Eveson et al., 2005). Partindo destas considerações alguns anticorpos foram sugeridos para o estudo de células mioepiteliais como as citoqueratina 14 (Ihrler et al., 2002; Eveson et al., 2005) e 17 (Foschini; Eusebi, 2004), α -SMA (Ihrler et al., 2002; Eveson et al., 2005), S-100 (Ihrler et al., 2002; Foschini; Eusebi, 2004), miosina (Eveson et al., 2005), calponina e caldesmona (Foschini; Eusebi, 2004).

Para Bravo et al. (2007), as células mioepiteliais podem ser testadas para muitos anticorpos como citoqueratinas 7, 8, 14, EMA (anticorpo de membrana epitelial), actina músculo específico (HHF-35), calponina, miosina, vimentina, S-100, caldesmona, miosina entre

outros. Contudo, parece que os resultados podem ser extremamente variados, indicando uma identidade imunorreativa muito singular. Dardick (1996) asseverou que, muitas vezes, as células mioepiteliais somente apresentarão imunorreatividade para vimentina devido às subversões de fenótipo.

2.6.2 Imunoistoquímica para miofibroblastos

No estudo de neoplasias de mama, Polyak e Hu (2005) traçaram várias considerações sobre as células mioepiteliais. Segundo os mesmos, as células mioepiteliais pareceram funcionar como barreiras físicas na progressão de tumores. Estes autores consideram que muitas neoplasias mamárias têm a participação de células mioepiteliais. Todavia, quando da marcação imunoistoquímica, a falta de positividade para queratinas indicaria a presença de outra célula denominada miofibroblasto. Esta célula parece ser proveniente de uma célula mesenquimal de reserva com expressão imunoistoquímica semelhante à célula mioepitelial.

A célula miofibroblástica foi estudada por Soma et al. (2001) em neoplasias de glândulas salivares humanas benignas e malignas. Os autores fizeram importantes observações. Para os mesmos, a interação entre conjuntivo e células epiteliais não cessa após a embriogênese, sendo mantida na vida adulta. Dúvidas existem em relação à participação de células miofibroblásticas na regulação do

crescimento neoplásico. Segundo seus achados, as células miofibroblásticas, foram positivas para α -SMA e se encontraram margeando neoplasias benignas e malignas em 75% e 39% dos casos, respectivamente. A diminuição destas células estaria intimamente relacionada à invasão tumoral. A ocorrência de colágeno como produto destas células foi sugerida como um mecanismo de contenção tumoral.

Segundo Jay et al. (2007), os miofibroblastos podem apresentar morfologia bipolar, tripolar ou estreliforme com longos prolongamentos citoplasmáticos. Seus núcleos se mostram pálidos, contendo pequeno nucléolo. Podem ser ovóides ou apresentar irregularidades. Sob o ponto de vista da imunistoquímica, são positivos para α -SMA, calponina, variavelmente positivos para c-kit e não reativos para desmina.

De Wever et al. (2008), esclareceram que as células miofibroblásticas são muito importantes, participando da cicatrização de feridas, por meio de contração das mesmas. As populações de miofibroblastos podem ser originadas de duas fontes. A primeira e menos expressiva, se refere às células mesenquimais de reserva provenientes da medula óssea. A segunda fonte ocorre após efeito parácrino de fibroblastos em tecidos inflamados ou em reparação. Em processos patológicos os miofibroblastos são mantidos e acabam por revelar produção colágena em excesso. Em neoplasias parece que os miofibroblastos podem não funcionar adequadamente ou podem favorecer invasão tumoral pela produção de proteinases. Este último mecanismo ocorre quando uma população de fibroblastos α -SMA

negativos passa a apresentar células miofibroblásticas α -SMA positivas. Ainda, segundo De Wever et al. (2008), os miofibroblastos formariam uma rede conjuntiva funcionando como guia para invasão de carcinomas.

2.6.3 Imunoistoquímica em neoplasias

A imunoistoquímica para neoplasias de glândulas salivares deu seus primeiros passos por volta de 1980, por meio do estudo dos filamentos de queratina, vimentina e desmina. Desde esta época, vários estudos se concentraram na busca, por meio de imunoistoquímica, de células mioepiteliais nos tumores (Araújo et al., 2000). Esta procura se deveu ao fato de se creditar às células mioepiteliais a origem para algumas neoplasias mais comuns de glândulas salivares. Apesar das suspeitas em relação à participação de células mioepiteliais em tumores, até por volta de 1989 muitas dúvidas pairavam sobre o seu envolvimento em oncogênese. Acreditava-se, até esta época, que as células mioepiteliais seriam células com diferenciação definitiva, uma vez que expressavam baixíssimo índice mitótico (Burgess et al., 1996).

Para a procura de diferenciação luminal ou acinar nas glândulas, preconizou-se a utilização de EMA e CEA (antígeno carcinoembrionário). Entretanto, Araújo et al. (2000) sugeriram o uso de marcação para produtos das células acinares, uma vez que os dois

aludidos anticorpos poderiam ser pouco expressivos. No que interessa ao estudo de componentes epiteliais estes autores indicaram citoqueratinas específicas ou em *pool*. Segundo Foschini e Eusebi (2004), algumas citoqueratinas específicas poderiam ser úteis na diferenciação entre células luminiais e ductais.

Em estudo de duas neoplasias salivares humanas (adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico), um painel para células mioepiteliais foi sugerido. As conclusões do trabalho apontaram a calponina como marcador de células mioepiteliais, principalmente quando outros anticorpos fossem ineficazes (Ogawa et al., 2000). Conforme afirmaram Cavalcante et al. (2007), a calponina e a vimentina são marcadores muito sensíveis na detecção de células mioepiteliais.

Segundo a Sociedade Brasileira de Patologia (1995) (SBP), os carcinomas e sarcomas devem ser estudados, de uma maneira geral, por meio de certos painéis de anticorpos. Os carcinomas se mostram positivos para citoqueratinas e apresentam expressividade variada dependendo de sua diferenciação para EMA e CEA. Os carcinomas são usualmente negativos para vimentina, podendo ser positivos em caso de indiferenciação. Conforme menção de Alves et al. (2004), o uso de painéis para marcação de queratinas pode ser considerado desnecessário, uma vez que o anticorpo AE1/AE3 (multi-citoqueratina) figura como marcador específico e eficaz para as proteínas em questão.

Os sarcomas se apresentam positivos para a vimentina. Para se classificar os padrões neoplásicos é indicado o uso de

anticorpos específicos para cada perfil celular (SBP, 1995). Todavia, o diagnóstico diferencial entre lesões fusiformes, muitas vezes, é dificultado pela morfologia neoplásica semelhante. Tumores como os leiomiossarcomas, miofibrossarcomas e fibrossarcomas devem ser cogitados e submetidos ao mesmo painel imunoistoquímico. Este painel deve conter anticorpos contra proteínas musculares e epiteliais. Os fibrossarcomas são negativos para desmina, α -SMA, S-100, calponina, EMA e citoqueratinas. Os leiomiossarcomas são positivos para desmina, α -SMA, calponina e variavelmente positivos para S-100, EMA e citoqueratinas. Os miofibrossarcomas expressam reação positiva para α -SMA e calponina e variável imunorreatividade para desmina (Fisher, 2004). Conforme verificações de Mentzel e Fletcher (2002), os miofibrossarcomas apresentam um imunofenótipo variável podendo ser: 1) positivos para actinas e negativos para desmina: 2) negativos para actinas e positivos para desmina: 3) positivos para os dois anticorpos. Contudo são sempre negativos para marcadores epiteliais e S-100. Para casos em que se suscite uma possibilidade de diferenciação rabdomiossarcomatosa, o uso da miogenina se faz necessário por ser específico para estas neoplasias (Parham; Barr, 2002a; Parham; Barr, 2002b).

Os carcinossarcomas podem ser estudados por meio de vários painéis, cada qual preconizado por estes ou aqueles autores. Basicamente pode-se utilizar anticorpos para queratinas, vimentina, proteína S-100 (Carson et al., 1995; Alvarez-Cañas; Rodilla, 1996; Götte et al., 2000; Kwon; Gu, 2001; Capuano et al, 2007; Staffieri et al., 2007; Völker et al., 2007), EMA (Carson at al., 1995; Alvarez-

Cañas; Rodilla, 1996; Capuano et al, 2007; Völker et al., 2007), CEA (Carson et al., 1995; Alvarez-Cañas; Rodilla, 1996; Völker et al., 2007), actina músculo liso (SMA) (Carson et al., 1995; Götte et al., 2000; Kwon; Gu, 2001; Völker et al., 2007), desmina (Carson et al., 1995; Kwon; Gu, 2001; Völker et al., 2007), CerbB-2 (Capuano et al., 2007). Todavia, conforme refere Dardick (1996), os carcinossarcomas podem expressar positividade para citoqueratinas e EMA em sua porção carcinomatosa e estritamente vimentina para o componente sarcomatoso. O mesmo foi verificado por Völker et al. (2007). Estes autores descreveram vários padrões histológicos em um único caso de carcinossarcoma de glândula submandibular. Segundo eles a neoplasia maligna se sobrepôs a um adenoma pleomórfico. Os campos carcinomatosos reconhecidos foram adenocarcinoma, carcinoma de ducto salivar e carcinoma sarcomatóide. O padrão sarcomatoso constou de um fibrossarcoma. A imunoistoquímica do caso revelou, para os carcinomas, uma positividade para AE1/AE3 e EMA e negatividade para vimentina, actina, desmina e S-100. O fibrossarcoma apresentou positividade somente para vimentina.

De maneira coincidente com o exposto sobre fibrossarcomas em carcinossarcomas, Kwon e Gu (2001) expuseram a única positividade destas lesões para vimentina. Aduziram, também, que a desmina se mostrou própria para elucidar casos de envolvimento muscular estriado. Desta feita, estes autores diagnosticaram um carcinossarcoma composto por campos de fibrossarcoma e rabdomiossarcoma.

Para Carson et al., (1995), em avaliações imunoistoquímicas de dois casos de carcinossarcomas com achados diferentes e conflitantes, as marcações positivas e concorrentes nos campos de neoplasia epitelial e mesenquimal indicariam uma origem celular comum, sendo especulada a origem mioepitelial. Todavia, os anticorpos usados por estes autores, nos casos comparados, não foram os mesmos.

2.7 Imunoistoquímica em neoplasias induzidas em glândulas salivares.

A imunoistoquímica, relacionada a carcinogênese de animais, se apresenta com uma grande lacuna uma vez que escassos trabalhos figuram na literatura pertinente.

Em 1986, Takai et al. realizaram um estudo imunoistoquímico na intenção de detectar a presença de queratina, em células de neoplasias induzidas por DMBA, em glândulas salivares de camundongos. Concluíram que a queratina não pode ser demonstrada em células ductais e mioepiteliais após a fixação das glândulas em Carnoy. Segundo os autores, cortes após congelação devem ser utilizados, pois a fixação e a parafinização poderiam diminuir a expressão antigênica celular.

Em 1996, Sumitomo et al., pretendendo estudar as etapas da carcinogênese em glândulas submandibulares de ratos, após

inserção de esponja embebida em DMBA, utilizaram os seguintes anticorpos: K 8.12 (anti-queratina 13 e 16), EGF (fator de crescimento epidérmico), S-100, laminina, e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular). Seus resultados evidenciaram uma maior marcação para queratina e para proliferação nuclear diretamente proporcional ao aparecimento de carcinomas. As células PCNA positivas foram apontadas como células ductais basais em proliferação. Estas células foram consideradas células de reserva intimamente relacionadas à formação de carcinomas. A diminuição progressiva de imunorreações para EGF e S-100, nas fases da carcinogênese, foi considerada como relativa às perdas das unidades acinares e à modificação fenotípica de células ductais. A marcação para laminina foi suficiente para apontar locais de invasão neoplásica. Os autores lembraram que a proliferação de células basais modificadas poderia seguir o mesmo mecanismo de aparecimento de células mioepiteliais em adenomas pleomórficos humanos.

Segundo Ogawa et al. (1999), a imunorreatividade de células mioepiteliais para as proteínas α -SMA e calponina, ocorre com expressão forte e é comum às várias glândulas humanas e de ratos. Em estudo endereçado às glândulas salivares de ratos, estes autores verificaram que células mioepiteliais, em sua formação e diferenciação, expressaram positivamente marcação para as proteínas acima citadas. Uma fraca marcação epitelial também pôde ser verificada (CK 14). Os autores sugeriram a possibilidade de ocorrência de células mioepiteliais de origem epitelial (positivas para CK 14) e células de origem mesenquimal (negativas para CK 14).

Outros autores afirmam que, em neoplasias humanas, a CK 14 pode marcar células mioepiteliais. Contudo, a CK 14 é mais esperada em regiões luminais. No caso de células mioepiteliais humanas em proliferação, a CK 14 é considerada negativa contrariando os achados em animais (Araújo et al., 2000).

Em 2000, Ogawa et al., objetivaram o estudo de adenocarcinomas em filhotes de ratos machos e de fêmeas submetidos a duas injeções de DMBA, a 1%. Os anticorpos para imunistoquímica utilizados por estes pesquisadores foram o α -SMA, queratina 19 e PCNA. As células ductais se revelaram positivas para queratina 19 e as mioepiteliais para α -SMA. Os achados demonstraram a ocorrência de neoplasias epiteliais e mesenquimais associadas ou não. Os machos foram acometidos de carcinomas e as fêmeas de adenocarcinomas. No grupo de uma injeção, os autores diagnosticaram além de neoplasias epiteliais, fibrossarcomas e rabdomiossarcomas. Após uma segunda injeção, os componentes mesenquimais pareceram dominar os elementos epiteliais. Ainda, segundo a pesquisa, os achados de adenocarcinomas com a participação de células mioepiteliais somente ocorreram após duas injeções de DMBA. Os autores também concluíram que os adenocarcinomas induzidos em fêmeas foram semelhantes àqueles diagnosticados em humanos. Contudo pouco referiram sobre os tumores mesenquimais.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) revisão da pesquisa de Mainenti (2006) e dos casos resultantes de carcinogênese química por DMBA endereçados às glândulas salivares submandibulares de ratos;
- b) contrastar os novos achados histopatológicos com os diagnósticos de Mainenti (2006);
- c) por meio de histoquímica e imunoistoquímica discutir o fenótipo das células neoplásicas;

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, segundo protocolo n° 20/2007-PA/CEP de 11 de junho de 2007 (Anexo A).

4.1 Material

A pesquisa se valeu do uso de material referente aos trabalhos realizados, em 2006, por Mainenti. Naquela época o estudo fora submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, recebendo aprovação sob número 038/2004.

No aludido estudo foram utilizados 28 ratos machos, com três meses de idade e peso aproximado de 300 g cada. Os animais foram divididos em quatro grupos de sete ratos e mantidos em gaiolas, sob condições ambientais apropriadas e alimentados com ração comercial e água *ad libitum* (Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP). O manuseio dos indivíduos atendeu

às exigências do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O carcinógeno escolhido foi o 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno, DMBA (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA). Uma solução foi manipulada contendo 2% de DMBA e acetona como veículo. Todos os animais foram operados no mesmo dia. A solução anestésica continha um relaxante muscular (Rompum®, Bayer S.A., Brasil) e um anestésico geral dissociativo (Dopalen injetável, AgribRANDS do Brasil LTDA, Brasil) na proporção de 1: 0,5 ml. Por via intramuscular, na dose de 0,1 ml/ 100 g de peso, os animais foram anestesiados. Por meio de uma incisão oblíqua cervical e discreta divulsão, os ratos receberam injeção de 0,1 ml de solução de DMBA, nas glândulas submandibulares esquerdas. Ao final da quinta, décima, décima quinta e vigésima semanas, sete animais foram sacrificados configurando o primeiro, segundo, terceiro e quarto grupos, respectivamente.

As peças cirúrgicas referentes às glândulas salivares foram fixadas em solução tamponada de formol a 10%. Parte do material foi mantido em estoque na solução fixadora. A outra metade foi submetida ao processamento histotécnico sendo corada em hematoxilina e eosina. Seguiu-se a avaliação dos quadros histológicos e seus diagnósticos.

4.1.1 Histoquímica

Na atual pesquisa, fez-se uso das peças cirúrgicas do estudo inicial, mantidas em formol, para processamento e coloração histoquímica.

Foram coradas novas lâminas de todos os casos em hematoxilina e eosina para estudo e comparação com os diagnósticos histopatológicos da pesquisa original. Realizou-se uma coloração pelo método tricrômico de Gomori para os casos diagnosticados como neoplásicos por Mainenti (2006), ou seja, referentes ao segundo, terceiro e quarto grupos da pesquisa original.

4.1.2 Imunoistoquímica

Para a análise imunoistoquímica foram utilizadas lâminas de vidro, desengorduradas, que receberam os cortes histológicos do material embocado em parafina em 2006, referente às glândulas salivares submandibulares. Por meio de microtomia, cortes padronizados de 3 μm de espessura, foram distendidos em lâminas previamente tratadas com organossilano.

Para a otimização da reação de imunoistoquímica fez-se uso de um sistema de detecção denominado NovoLink™ Polymer Detection System (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle Upon

Tyne, United Kingdom). O referido sistema, baseia-se em uma reação polimérica e é composto por bloqueadores de peroxidase, de biotina e de reação primária. Também é constituído pelo cromógeno diaminobenzidina (DAB), por um polímero e pela hematoxilina.

Um painel imunoistoquímico foi selecionado, contemplando nove anticorpos: multi-citoqueratina, vimentina, α -actina músculo liso, EMA, CerbB-2 (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom), calponina, desmina, miogenina e S-100 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). A relevância da escolha levou em consideração a literatura atinente às neoplasias humanas e animais e suas respectivas composições histológicas.

4.2 Método

4.2.1 Estudo histopatológico

Foram reavaliadas as lâminas originais, coradas em hematoxilina e eosina, do estudo de Mainenti (2006). Novas lâminas foram confeccionadas a partir dos blocos em parafina. Fez-se a avaliação dos casos após recorte sob coloração pelo método da hematoxilina e eosina e pelo tricrômico de Gomori. Este último método histoquímico foi direcionado somente para os casos

neoplásicos da pesquisa original, ou seja, segundo, terceiro e quarto grupos. A intenção de seu uso foi a procura de colágeno nos tumores.

Todos os recursos histológicos serviram para a condução de análises comparativas entre os achados atuais e os diagnósticos da primeira pesquisa.

4.2.2 Estudo imunoistoquímico

Pretendeu-se avaliar, por meio de imunoistoquímica, os casos diagnosticados por histopatologia relativos à pesquisa de Mainenti (2006). O uso da imunoistoquímica objetivou, também, o reconhecimento dos tipos celulares relacionados ao processo de carcinogênese. Para este intento, cortes histológicos de blocos de parafina foram submetidos, nas dependências do Laboratório de Patologia da Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora (MG), ao processamento imunoistoquímico.

As lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação, seguindo-se, então, a recuperação antigênica. Esta foi realizada por meio de panela a vapor a temperatura de 95° C, por 20 minutos, em solução de citrato (pH 6,0). Após resfriamento, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada após 3 banhos de 5 minutos em água oxigenada 10 volumes. Seguindo-se um banho em água corrente por 5 minutos, foi realizado o bloqueio da biotina endógena, por 10 minutos. Após lavar as lâminas por 5 minutos em

água corrente e por 2 minutos em água destilada, os cortes foram submetidos a dois banhos consecutivos em solução tamponada de fosfato (PBS). Foram utilizados nove anticorpos diluídos em solução de PBS/ soro albumina bovina. Abaixo são apresentados os clones de anticorpos e suas respectivas diluições (Quadro 1):

Quadro 1 – Anticorpos e suas diluições

Anticorpo	Diluição
Multi-queratina (clone NCL-AE1/AE3)	1:100
Vimentina (clone NCL-VIM-V9)	1:80
α -actina músculo liso (Clone NCL-SMA)	1:60
Cerb-B2 (Clone NCL-CB 11)	1:80
EMA (Clone NCL-EMA)	1:150
Calponina (Clone CALP)	1:150
Desmina (Clone D33)	1:50
Miogenina (Clone F5D)	1:30
S-100	1:5000

Após a aplicação do anticorpo sobre os cortes, os mesmos foram colocados em estufa por 30 minutos a 30° C. Retiradas as lâminas e após 5 minutos em temperatura ambiente seguiram-se dois banhos em PBS por 5 minutos. Fez-se a remoção do excesso de líquido dos cortes e emprego do bloqueador primário. Após 20 minutos em estufa a uma temperatura de 30 °C, os cortes foram deixados em temperatura ambiente por 5 minutos. Dois banhos em PBS por 5 minutos foram realizados previamente à aplicação do polímero. Este permaneceu por 5 minutos em contato com os cortes

em temperatura ambiente. Foram realizados dois banhos em PBS por 5 minutos. Após a remoção do excesso líquido dos cortes, foi utilizado o cromógeno DAB, seguindo-se um banho de 5 minutos em água corrente. Para a contra-coloração utilizou-se um minuto de hematoxilina de Harris. Para finalizar a coloração pela hematoxilina, após um minuto, os cortes foram lavados, seguindo-se 3 banhos em álcool e 3 banhos em xilol. Por fim, as lâminas foram montadas após colocação de lamínula.

Os controles positivos foram realizados em recortes de tecidos humanos normais e neoplásicos, segundo indicações dos fabricantes dos anticorpos. Foram utilizadas lâminas de intestino (AE1/AE3, vimentina e S-100), apêndice (α -SMA, desmina), glândula salivar (calponina), neoplasia de mama (EMA, CerbB-2) e rabdomyossarcoma (miogenina).

4.2.3 Critérios para avaliação imunoistoquímica

Para a avaliação imunoistoquímica alguns critérios foram seguidos na intenção de padronização dos achados. Foram consideradas as reações conforme sua negatividade (-) e sua positividade. Em relação à positividade, as reações foram valorizadas como fracas (+), moderadas (++) e fortes (+++) (Quadro 2).

Quadro 2 – Expressão imunoistoquímica e sua interpretação

Símbolo	Interpretação
-	Sem marcação
+	Fraca marcação
++	Moderada marcação
+++	Forte marcação

4.2.4 Documentação fotográfica

As lâminas histológicas foram fotografadas com câmera digital Sony DSC-S85 Cybershot (Sony Inc., Japan), adaptada em fotomicroscópio (Axiophot Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

5 RESULTADOS

A identificação dos resultados histopatológicos de cada indivíduo manteve a ordenação original. O mesmo ocorreu com os grupos de sacrifício da pesquisa de Mainenti (2006). Entretanto, uma vez que se fez uma revisão histológica, além do estudo imunohistoquímico, preferiu-se o termo caso ao invés da denominação animal. Assim sendo, os casos foram numerados de 1 a 28, seguindo a divisão em quatro grupos de sete animais, conforme os quatro eventos de sacrifício.

5.1 Histopatologia

O exame histológico de todos os casos foi realizado avaliando-se as lâminas da pesquisa de Mainenti (2006), o material recortado dos blocos originais e o material processado das peças em estoque. A rotina de coloração para todas as lâminas baseou-se no método da hematoxilina e eosina.

Em relação ao tricrômico de Gomori, somente o primeiro grupo não foi testado para esta coloração. A intenção desta histoquímica foi a análise de formação de colágeno pelas neoplasias.

5.1.1 Primeiro grupo

Hematoxilina e eosina: a revisão das lâminas e o novo estudo microscópico não alteraram o diagnóstico inicial da pesquisa de Mainenti (2006).

O primeiro grupo da pesquisa original, sacrificado na quinta semana do experimento, apresentou uniformidade de diagnóstico. Os sete casos revelaram aspectos de sialadenite.

Na reavaliação histopatológica, de forma geral, foi possível notar a manutenção dos parênquimas glandulares parotídeos e sublinguais. Contudo, com pouca variação entre os casos, ficou evidente a perda das unidades acinares associada à dilatação dos ductos nas glândulas submandibulares. Estes ductos se mostraram preenchidos por polimorfonucleares e células epiteliais. Em dois casos (caso 4 e 6), pôde-se perceber a ocorrência de conjunto de células epiteliais revelando diferenciação ductal. Completaram os casos a presença de fibroblastos com discreto pleomorfismo, células inflamatórias dispersas no estroma glandular submandibular, figuras de necrose e nódulos linfáticos com hipertrofia inflamatória adjacentes às glândulas (Figura 1).

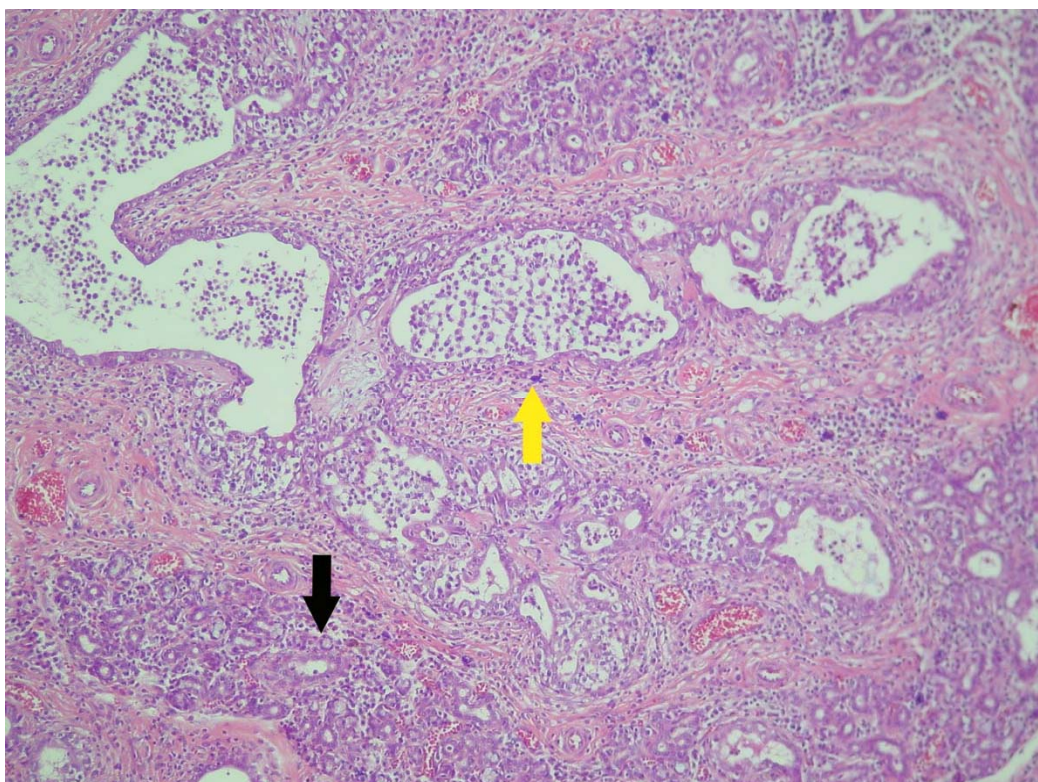


Figura 1 – Imagem de um caso típico de sialadenite apresentando dilatação ductal (seta amarela) e perda das unidades acinares (seta preta). H/E, 100x.

5.1.2 Segundo grupo

Hematoxilina e eosina: o segundo grupo pesquisado por Mainenti (2006) foi sacrificado após dez semanas. Os resultados daquela pesquisa apontaram para um caso de atipia celular ductal, dois casos de carcinoma e quatro casos de sialadenite. À luz da revisão dos aspectos histológicos os casos foram diagnosticados como um caso de sialadenite e seis casos de carcinoma.

O caso de sialadenite (caso 14) foi composto por extensa área de necrose associada aos planos musculares. Estes se

mostraram em localização limítrofe ao parênquima glandular seroso. Não foi evidente a presença de parênquima glandular mucoso. Percebeu-se, também, presença de células inflamatórias polimorfonucleares arranjadas na forma de abscesso.

Os casos outrora não diagnosticados como neoplásicos, foram classificados como carcinomas uma vez que o aprofundamento dos cortes evidenciou campos histológicos com neoplasia epitelial. Os carcinomas se apresentaram sob forma de lesão ou lesões císticas revelando campos ora atróficos, ora hipertróficos, com presença de células pleomórficas, raras mitoses e formação de queratina (Figura 2a). Em associação aos cistos pôde-se perceber a ocorrência de massas epiteliais sólidas (Figura 2b) ou estruturas pseudo-ductais preenchidas por polimorfonucleares, se insinuando no tecido conjuntivo (Figura 2c). Este, por vezes, revelou a presença de células fibroblásticas com discreto pleomorfismo e campos com imagens de hialinização e necrose. Completando os casos, verificou-se a presença de infiltrado inflamatório mononuclear peri-tumoral, remanescentes de parênquima glandular e nódulos linfáticos com hipertrofia inflamatória e sem evidências de invasão neoplásica.

Tricrômico de Gomori: as fibras colágenas foram reveladas em verde, interessando a região mesenquimal, com alternância entre fraca e forte celularização, ao redor dos cistos e das massas epiteliais (Figura 2d e 2e) (casos 8, 10, 12 e 13). Em um caso (caso 11) identificou-se profusa colagenização, pouco celularizada, ao redor de ductos neoformados (Figura 2f). Os padrões celulares muitas

vezes apresentaram-se sólidos ou mixóides na mesma lâmina (casos 9, 10 e 11). Completaram os casos figuras de necrose (caso 13) e coloração positiva para vasos calibrosos (casos 9, 13).

O caso 14, não neoplásico, revelou vasos corados na intimidade das glândulas e em estruturas peri-glandulares.

O quadro abaixo identifica os antigos e os novos diagnósticos (Quadro 3).

Quadro 3 – Diagnósticos referentes ao segundo grupo após revisão

	Diagnóstico inicial	Diagnóstico final
Caso 8	Sialadenite	Carcinoma
Caso 9	Sialadenite	Carcinoma
Caso 10	Carcinoma	Carcinoma
Caso 11	Carcinoma	Carcinoma
Caso 12	Sialadenite	Carcinoma
Caso 13	Atipia celular ductal	Carcinoma
Caso 14	Sialadenite	Sialadenite

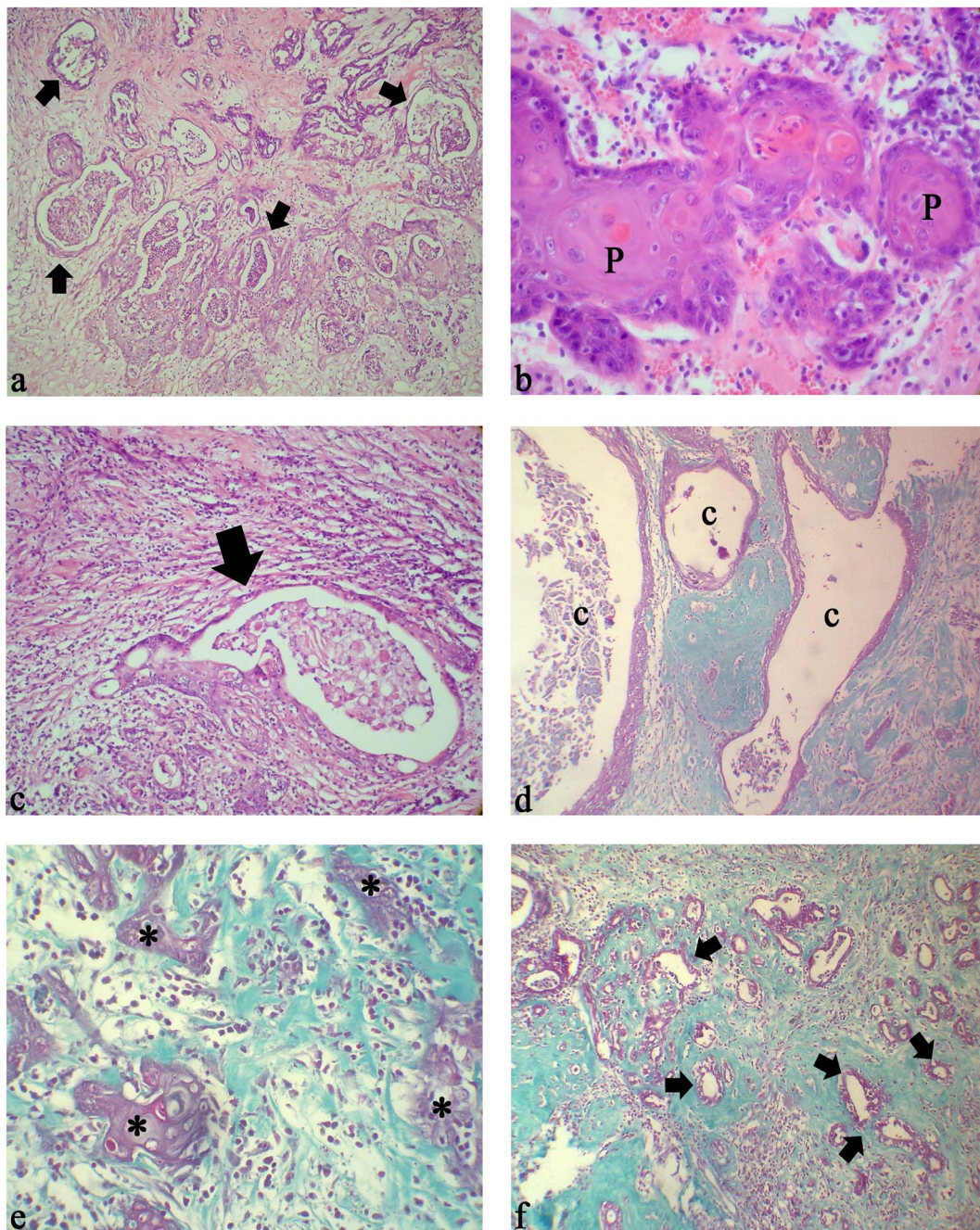


Figura 2 - a) Carcinoma. Proliferação de neoplasia epitelial revelando pseudo-ductos preenchidos por polimorfonucleares e queratina (setas). H/E, 100x.
 b) Carcinoma. Imagens de pérolas (P) de queratina. H/E, 400x.
 c) Carcinoma. Formação pseudo-ductal preenchida por polimorfonucleares (seta). H/E, 200x.
 d) Carcinoma. Fibras colágenas (verde) entre espaços císticos (C). Tricrômico de Gomori, 100x.
 e) Carcinoma. Fibras colágenas (verde) ao redor de estruturas epiteliais (*). Tricrômico de Gomori, 400x.
 f) Carcinoma. Colágeno (verde) circundando estruturas pseudo-ductais (setas). Tricrômico de Gomori, 100x.

5.1.3 Terceiro grupo

Hematoxilina e eosina: o terceiro grupo pesquisado por Mainenti (2006) foi sacrificado após quinze semanas. Os diagnósticos do presente estudo mantiveram os achados anteriormente apontados por Mainenti (2006). As lâminas foram reconhecidas como um caso de hiperemia tecidual, dois casos de carcinoma e quatro casos de carcinossarcoma.

A hiperemia (caso 16) seguiu os padrões descritos no trabalho pregresso de 2006, revelando manutenção aparente de parênquimas glandulares sem evidência de atipias celulares. Associado a estes campos percebeu-se arranjo conjuntivo frouxo e profusos, pequenos e ectásicos vasos sanguíneos.

Nos casos de carcinoma (casos 18 e 20), observou-se neoplasia formada por lesão cística epitelial com predominância de hiperplasia celular, exibindo celularidade pleomórfica, alto índice mitótico, hipercromasia nuclear e formação de queratina (Figura 3a). Insinuando-se ao redor da lesão pôde-se perceber importante hialinização, moderadamente celularizada (Figura 3b). Massas celulares, ora formando pseudo-ductos, ora preenchidas por queratina ocorreram profusamente no caso 18 e discretamente no caso 20. Infiltrado inflamatório mononuclear difuso, no estroma, completou os campos dos dois casos.

Os carcinossarcomas (casos 15, 17, 19 e 21) revelaram uma associação tumoral epitelial e mesenquimal. Na neoplasia

epitelial, observou-se a ocorrência de lesão cística epitelial (Figura 3c), com revestimento se alternando entre atrofia e hiperplasia. As células neoplásicas, por vezes, exibiram considerável pleomorfismo, hipercromasia e mitoses atípicas. Na luz da lesão puderam-se verificar inúmeras projeções papilares com íntima relação à produção de queratina abundante. Completaram os quadros carcinomatosos figuras variadas de massas epiteliais invadindo o conjuntivo, com aspecto pseudo-ductal ou aspecto sólido, de ocorrência escassa (casos 15, 21) ou abundante (casos 17, 19).

Em todos os casos, com discreta variação entre eles, a porção sarcomatosa revelou a presença de importante celularidade, com diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear, exibindo morfologia predominantemente afilada (Figura 3d). Certos campos apresentaram-se hialinizados, sugerindo colagenização. Células inflamatórias mononucleares ora profusas, ora escassas se apresentaram no conjuntivo tumoral. Padrões mixóides foram evidenciados no caso 17, bem como campos sólidos formados por células pleomórficas e células gigantes. Vasos sanguíneos peritumorais, de fina parede e ectásicos, foram observados nos casos 15, 17 e 19.

Figuras de remanescentes glandulares à distância ou associados ao tumor foram também diagnosticadas.

Tricrômico de Gomori: a intensidade de coloração esverdeada variou de fraca (casos 17), moderada (casos 19, 21) a forte (caso 15, 18, 20), sempre interessando o conjuntivo adjacente às

estruturas epiteliais malignas (Figura 3e). O colágeno se revelou associado a celularização distinta entre campos e entre casos. Basicamente, as lâminas 15, 19 e 21 foram identificadas com padrões variáveis de celularização relacionados ao colágeno (Figura 3f). Nos casos 18 e 20 (carcinomas), foi evidente a presença de colágeno associado a poucas células. A lâmina 17, mais mixóide, revelou pouca celularidade em relação ao colágeno.

O caso 16 (hiperemia) se corou para estruturas vasculares e conjuntivas sem outras particularidades.

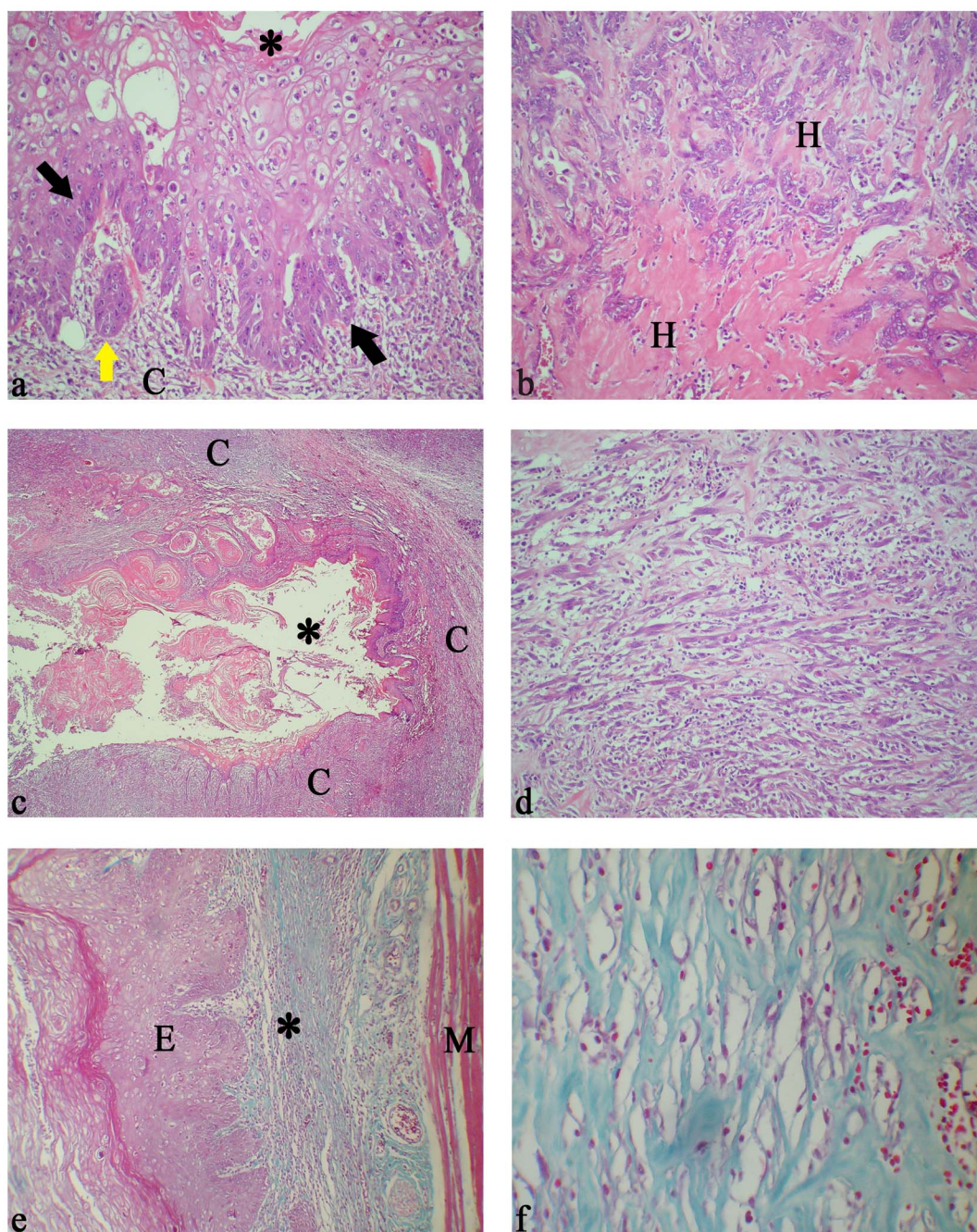


Figura 3 - a) Carcinoma. Neoplasia epitelial exibindo pleomorfismo celular (setas pretas), invasão (seta amarela) do conjuntivo (C) e queratinização (*). H/E, 200x.
 b) Carcinoma. Figuras de hialinização (H) se insinuando em ilhas de neoplasia epitelial. H/E, 200x.
 c) Carcinossarcoma. Neoplasia cística epitelial (*) circundada por conjuntivo tumoral (C). H/E, 25x.
 d) Carcinossarcoma. Células fusiformes exibindo pleomorfismo celular e nuclear. H/E, 200x.
 e) Carcinoma. Presença de fibras colágenas (*) na lâmina própria da neoplasia epitelial (E). Fibras musculares (M) são vistas na profundidade. Tricrômico de Gomori, 100x
 f) Fibras colágenas (verde) em detalhe. Tricrômico de Gomori, 400x.

5.1.4 Quarto grupo

Nos estudos de Mainenti (2006), o quarto e último grupo foi constituído por sete animais, sendo dois sacrificados antes da vigésima semana. Um animal foi sacrificado na décima oitava semana e outro na décima nona devido a problemas de respiração e deambulação dos mesmos. A necropsia que se seguiu ao sacrifício foi capaz de diagnosticar pneumonia nos animais.

Hematoxilina e eosina: os diagnósticos do primeiro estudo incluíram um caso de sarcoma, um caso de carcinoma, dois casos sem neoplasia e três casos de carcinosarcoma. Os diagnósticos iniciais foram mantidos. Percebeu-se, entretanto, que o caso 25, outrora diagnosticado como sem qualquer alteração histológica, revelou um campo circunscrito no parênquima glandular submandibular, marcado por dois hemisférios distintos. Um deles mostrou presença maciça de células inflamatórias mononucleares. A outra região expressou celularidade fibroblástica com importante formação de colágeno. Raríssimas células fibroblásticas com moderado aumento volumétrico citoplasmático e nuclear foram percebidas. Contudo, o diagnóstico de ausência de neoplasia foi preservado. O caso 28 foi observado mantendo as descrições iniciais de hiperemia, com evidência de conjuntivo frouxamente organizado e manutenção dos parênquimas glandulares associado à moderada ectasia de vasos sanguíneos.

O carcinoma (caso 27) se mostrou conforme descrição pregressa. Ficou patente a presença de uma estrutura cística, apresentando revestimento epitelial escamoso estratificado de espessura variável, se insinuando para o lúmen por meio de projeções papilares, associadas à profusa produção de queratina. Outros campos revelaram invasão do conjuntivo por células epidermóides individuais ou agrupadas, com ocasional formação de pérolas córneas. Estas células, ao formar massas epiteliais, apresentaram-se com mitoses atípicas e subversão da relação núcleo-plasmática (Figura 4a). Na cápsula notou-se a ocorrência de intensa hialinização. Completando o caso foram revelados traços de parênquimas glandulares, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e presença de vasos congestos e dilatados.

O sarcoma (caso 23) se manteve formado por células fusiformes pleomórficas dispostas em padrões sólidos monótonos, por vezes associado à invasão de planos musculares e, por vezes, relacionado a células gigantes. Certos campos evidenciaram células atípicas e anaplásicas com núcleos hipercromáticos (Figura 4b).

Os carcinossarcomas (casos 22, 24, 26) se mostraram constituídos por duas neoplasias síncronas de acordo com a avaliação inicial. A porção carcinomatosa se mostrou constituída por formação cística, com epitélio escamoso estratificado ora atrófico, ora hiperplásico, projetando-se em papilas para a luz e exibindo células pleomórficas, com perda da relação núcleo-plasmática (Figura 4c). Algumas áreas foram marcadas pela ocorrência de células epiteliais solitárias, pérolas córneas, arranjos sólidos ou formação de pseudo-

ductos. A neoplasia conjuntiva se apresentou dominando quantitativamente os campos histológicos. Ela revelou células em padrões sólidos fasciculados, exibindo atipias celulares (Figura 4d) e padrões mixóides. Áreas de hialinização adjacente aos carcinomas foram evidentes, com alternância, nos casos, de áreas celulares e acelulares. Em outros campos reconheceu-se a presença de vasos sanguíneos congestos. Remanescentes glandulares e infiltrado inflamatório mononuclear completaram os achados histológicos. Alguns casos particulares apresentaram linfonodo com hipertrofia inflamatória (caso 22), hemorragia extensa (caso 24), profusa queratinização intra-luminal e presença de tecido nervoso associado às glândulas (caso 26).

Tricrômico de Gomori: o carcinoma (caso 27) revelou coloração esverdeada para todo o conjuntivo relacionado à neoplasia epitelial. As fibras colágenas e as células mesenquimais se postaram entre papilas epiteliais e as massas epidermóides. Dispuseram-se, também, associadas aos vasos sanguíneos.

O sarcoma (caso 23) foi corado por completo pelo tricrômico, exibindo padrões colágenos delicados e difusos entre feixes celulares (Figura 4e).

Os carcinosarcomas revelaram coloração mesenquimal fraca (caso 22) e moderada (caso 24 e 26) ao redor do carcinoma. Na maioria dos campos e dos casos se verificou presença de pouca produção colágena focal (Figura 4f). Foram verificadas regiões com predomínio de células mesenquimais associadas a fibras de colágeno e

campos acelulares isolados, compostos por feixes colágenos (casos 24 e 26).

Os casos não neoplásicos foram descritos como se segue: a lâmina 25 revelou intensa presença de fibras colágenas com pouca a moderada celularidade. O caso 28 (hiperemia) exibiu coloração para estruturas vasculares e conjuntivas sem outras particularidades.

Os diagnósticos iniciais e os revisados podem ser consultados na seção de apêndices (Apêndice A).

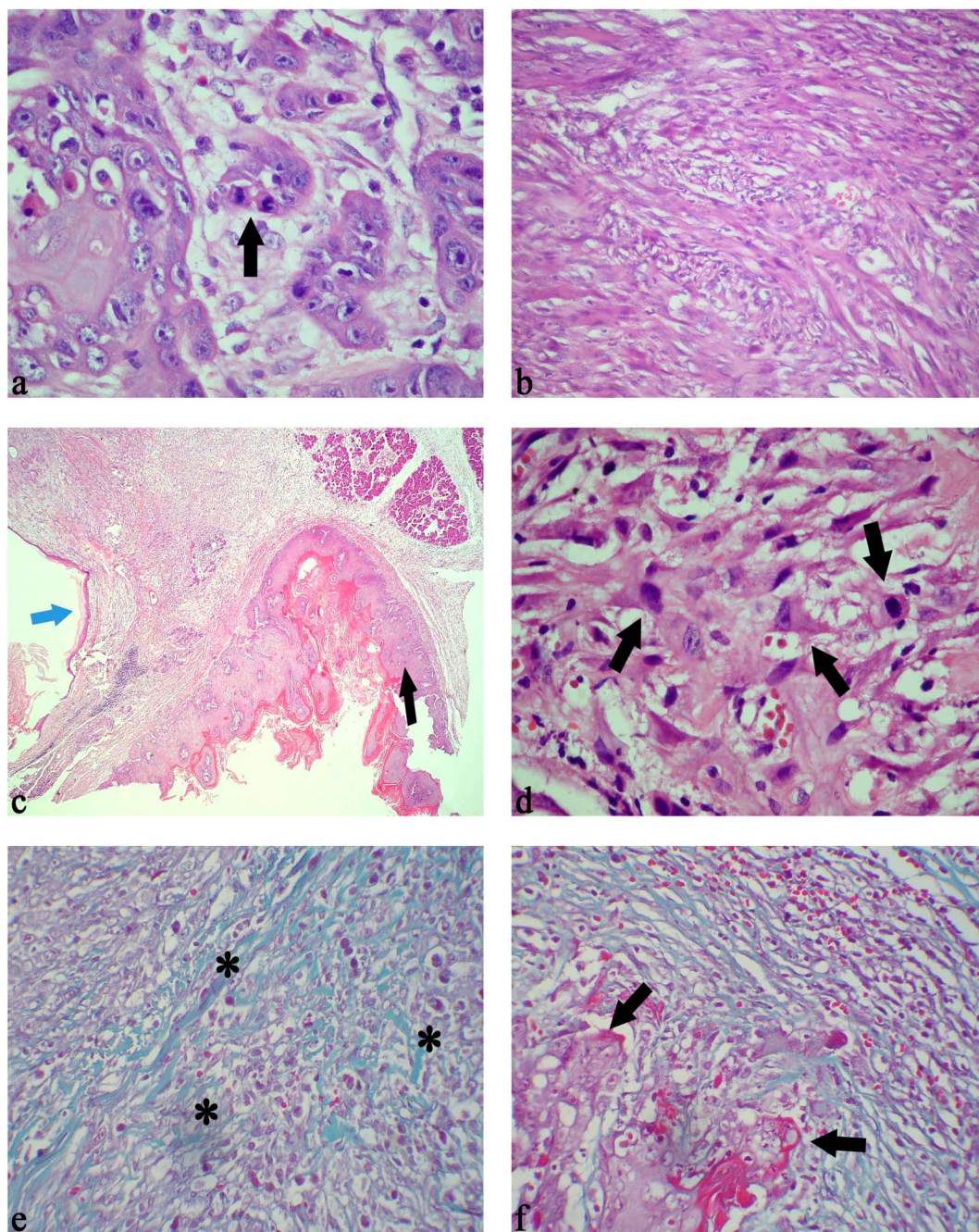


Figura 4 - a) Carcinoma. Células com núcleos hiper Cromáticos e presença de mitoses (seta). H/E, 630x.
 b) Sarcoma. Padrão fasciculado sólido revelando pleomorfismo celular. H/E, 200x.
 c) Carcinossarcoma. Componente epitelial exibindo atrofia (seta azul) e hiperplasia (seta preta). H/E, 25x.
 d) Carcinossarcoma. Componente mesenquimal revelando pleomorfismo celular e nuclear (setas). H/E, 630x.
 e) Sarcoma. Delicados feixes colágenos em evidência (*). Tricrômico de Gomori, 400x.
 f) Carcinossarcoma. Fibras colágenas (azul) associadas às figuras de neoplasia epitelial (setas). Tricrômico de Gomori, 400x.

5.2 Imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram valorizadas segundo a marcação dos anticorpos. É importante lembrar que a expressão dos anticorpos variou sobremaneira entre estruturas e em relação aos grupos. Certos anticorpos se revelaram absolutamente negativos para o material avaliado (Quadro 4). Desta feita, serão descritos somente os marcadores com reação positiva.

Quadro 4 – Anticorpos e seus resultados

Anticorpo	Marcação
Multi-queratina (clone NCL-AE1/AE3)	Positiva
Vimentina (clone NCL-VIM-V9)	Positiva
α -actina músculo liso (Clone NCL-SMA)	Positiva
Calponina (Clone CALP)	Positiva
Cerb-B2 (Clone NCL-CB 11)	Negativa
EMA (Clone NCL-EMA)	Negativa
Desmina (Clone D33)	Negativa
Miogenina (Clone F5D)	Negativa
S-100	Negativa

5.2.1 Primeiro grupo

O primeiro grupo não apresentou qualquer sinal de neoplasia. Deve-se salientar, também, que as reações imunoistoquímicas deste grupo revelaram-se fracas, ou seja, pouco expressivas. Mesmo assim, os aspectos imunoistoquímicos de cada anticorpo são descritos a seguir:

AE1/AE3: Todos os casos avaliados se mostraram monótonos com marcação muito fraca para ácinos serosos submandibulares e, eventualmente, marcação fraca para infiltrado mononuclear e parênquima linfático.

Vimentina: Este anticorpo se apresentou fortemente expresso, interessando estruturas variadas, como vasos, nervos, células fusiformes, células inflamatórias e parênquimas de glândulas salivares e linfáticos. Foram verificadas células mioepiteliais relacionadas aos ácinos.

SMA: A marcação intensa se concentrou em vasos sanguíneos e em células mioepiteliais periacinares, nas regiões glandulares sem evidência de sialadenite. Alguns casos (2, 3 e 4) revelaram, moderadamente, células fusiformes ao redor de ductos intercalares, em campos de sialadenite.

Calponina: Notou-se expressão moderada em vasos sanguíneos. De forma eventual e fraca revelou infiltrado mononuclear e células mioepiteliais dos parênquimas glandulares normais e dos com sialadenite. Nestes últimos percebeu-se que estas células se apresentavam ao redor de ductos intercalares.

Não foram evidenciadas quaisquer alterações que sugerissem alteração do diagnóstico por hematoxilina e eosina. Assim, os diagnósticos de sialadenite foram mantidos.

5.2.2 Segundo grupo

As descrições imunoistoquímicas atinentes aos casos são apresentadas a seguir. Vale lembrar que o caso 14, uma sialadenite, não apresentou positividade para quadros neoplásicos.

AE1/AE3: Algumas células foram marcadas fracamente nos nódulos linfáticos. A neoplasia epitelial e a queratina foram intensamente evidenciadas pelo anticorpo (Figura 5a). O caso 13 apresentou marcação fraca em ácinos serosos das submandibulares. Nenhuma outra estrutura foi positiva.

Vimentina: marcação forte para estruturas fora das regiões neoplásicas como linfáticos, vasos, nervos e células mioepiteliais. Nas neoplasias: imunorreação forte para células

fusiformes, com pleomorfismo celular e nuclear moderado, se insinuando na intimidade dos carcinomas (Figura 5b) e em regiões pouco celularizadas como áreas de necrose e de desmoplasia. Estas células exibiram padrões fasciculados ou sem orientação evidente. Verificou-se, também, reação positiva intensa para diferenciação vascular simples. O caso 14 (sialadenite), apontou para estruturas normais em reação positiva.

SMA: a imunorreação evidenciou forte positividade nos tecidos normais para vasos e células mioepiteliais. No estroma associado ao tumor perceberam-se células esparsas (Figura 5c), revelando imunorreação variando de fraca a forte, na intimidade da interface conjuntivo-carcinoma. Uma marcação moderada evidenciou a presença de células fusiformes em três padrões distintos: em diferenciação vascular delgada (Figura 5d), de forma isolada ou em pequenos grupos associadas a imagens de hialinização. De forma geral, poucas células foram positivas. A lâmina 14 (sialadenite) revelou positividade para tecidos não neoplásicos (vasos e células mioepiteliais).

Calponina: foi evidente uma marcação fraca para células inflamatórias mononucleares e forte para células mioepiteliais e formações vasculares ocasionais nos tecidos normais. Nos casos de carcinoma percebeu-se uma reação moderada para células esparsas, fusiformes, revelando boa relação núcleo-plasmática e baixo grau de pleomorfismo, com ou sem associação à neoplasia epitelial (casos 10

e 11) (Figura 5e). As células associadas aos quadros de hialinização foram fracamente positivas e revelaram aparência fusiforme ou estreliforme (Figura 5f). Por vezes notou-se positividade fraca para diferenciação vascular. Houve coincidência com a marcação por SMA, entretanto, o número de células marcadas foi menor. A sialadenite (caso 14) evidenciou positividade para vasos e células mioepiteliais.

Os achados referentes aos casos do segundo grupo se encontram resumidos no quadro abaixo (Quadro 5).

Quadro 5 – Identificação dos casos do segundo grupo quanto ao resultado histológico e imunoistoquímico.

	8	9	10	11	12	13	14
HE F	CA	CA	CA	CA	CA	CA	SIAL
AE1/AE3 N	+	+	+	+	+	+	-
AE1/AE3 T	++	+++	++	+++	++	+++	-
VIM N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VIM T	++	+++	+++	+++	+++	+++	-
SMA N	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SMA T	+	+	++	+++	++	++	-
CALP N	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
CALP T	-	+++	+++	++	++	+	-

HE F: diagnóstico final AE1/AE3 N: citoqueratinas em tecido normal AE1/AE3 T: citoqueratinas em células neoplásicas VIM N: vimentina em tecido normal VIM T: vimentina em células neoplásicas SMA N: actina músculo liso em tecido normal SMA T: actina músculo liso em células neoplásicas CALP N: calponina em tecido normal CALP T: calponina em células neoplásicas CA: carcinoma SIAL: sialadenite: (+) marcação fraca (++) : marcação moderada (+++) : marcação forte (-) : sem marcação.

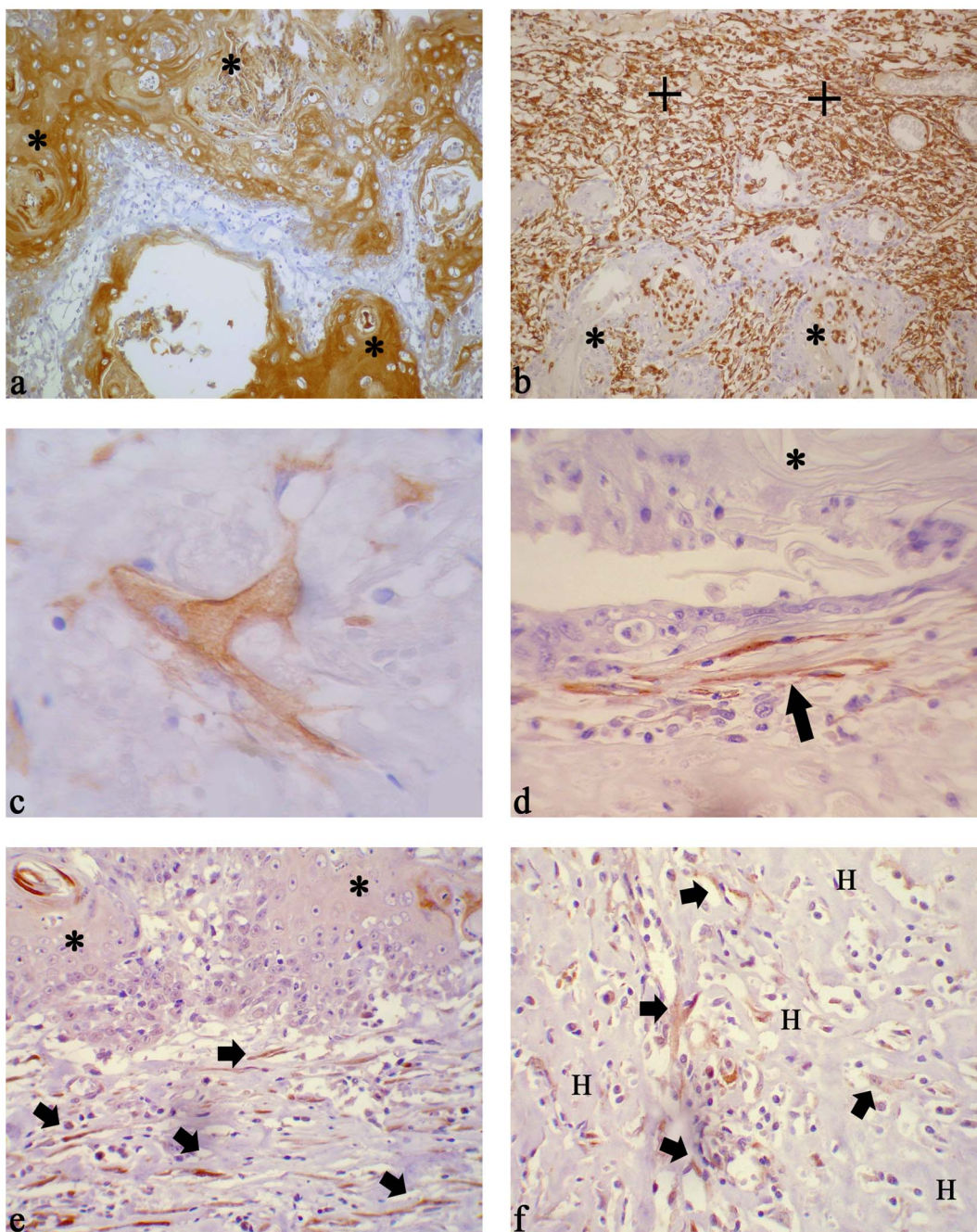


Figura 5 - a) Carcinoma. Marcação para células neoplásicas epiteliais (*). AE1/AE3, 200x.
 b) Carcinoma. Células fusiformes (+) evidentes ao redor da neoplasia epitelial (*).
 Vimentina, 200x.
 c) Célula mesenquimal não neoplásica. SMA, 1000x.
 d) Feixe de células conjuntivas (seta) adjacentes ao carcinoma (*). SMA, 630x.
 e) Células conjuntivas (setas) em evidência, nos limites da neoplasia epitelial (*).
 Calponina, 400x.
 f) Células positivas (setas) em associação aos campos hialinizados (H).
 Calponina, 400x.

5.2.3 Terceiro grupo

A seguir as descrições imunoistoquímicas do terceiro grupo:

AE1/AE3: as marcações foram fortes para a neoplasia epitelial e queratina. Percebeu-se, com clareza, a não marcação das células da camada basal, apontando para uma adequada reação do anticorpo (Figura 6a). Campos neoplásicos epiteliais, com mitoses atípicas, foram frequentemente notados (Figura 6b). Relacionado aos casos, mas não nas imediações dos tumores, foram percebidas marcações fracas para ácinos e ocasionalmente para tecido linfóide. Não foram evidentes marcações para a lâmina 16 (hiperemia).

Vimentina: foram percebidas reações fortes para estruturas adjacentes às neoplasias (vasos, linfáticos, nervos, células mioepiteliais). Nos tumores: células, de morfologia e volumes variados, se mostraram intensamente imunorreativas (Figura 6c) e foram evidentes na interface entre carcinoma e estroma (Figura 6d). O mesmo se verificou em áreas de necrose e desmoplasia. As células fusiformes exibiram padrões mixóides, fasciculados e, por vezes, se apresentaram em diferenciação vascular de paredes delicadas ou mal formadas. A lâmina 16 revelou estruturas conjuntivas sem neoplasia.

SMA: fora das regiões neoplásicas pôde-se perceber positividade forte para vasos sanguíneos e para células mioepiteliais. Nos carcinomas (casos 18 e 20) foram evidenciadas células fusiformes

intensamente marcadas, com boa relação núcleo-plasmática, dispostas em faixa e, ocasionalmente, associadas a vasos sanguíneos. Feixes profundos de células fusiformes moderadamente evidenciados, com morfologia convencional, se relacionaram aos campos de hialinização.

Na intimidade dos carcinossarcomas (casos 15, 17, 19 e 21) perceberam-se células fusiformes em moderada apresentação imunorreativa, com boa relação núcleo-plasmática, formando vasos de parede delicada ou em disposição solitária. As células solitárias se apresentaram, muitas vezes, associadas a imagens de hialinização. Na intimidade do tumor epitelial, células fusiformes, com núcleos aumentados, foram expressivamente marcadas (caso 15) (Figura 6e). No caso 19, contudo, estas mesmas células relacionadas à neoplasia epitelial, mantiveram forma fibroblástica típica, apesar de fraca marcação. O caso 21 apresentou a maior variedade de células pleomórficas positivas. De maneira geral, muitas células atípicas foram contra-coradas pela hematoxilina somente.

O caso 16, não neoplásico, apresentou estruturas normais como vasos e células mioepiteliais fortemente evidenciadas.

Calponina: reveladas por forte reação, fora da região das lesões, foram as células mioepiteliais e vasos. Os carcinomas (casos 18 e 20) apresentaram, em seu conjuntivo, reação moderadamente positiva para células fusiformes relacionadas à interface carcinoma-estroma, dispostas em faixa sólida ou diferenciando-se em vasos delgados, sem particularidades morfológicas. Na profundidade se percebeu a associação de células fusiformes, bem marcadas (Figura 6f), por vezes exibindo

pleomorfismo em estroma hialino e ocorrência distante de vasos mais calibrosos fortemente positivos. Desta maneira, os carcinomas se apresentaram muito coincidentes com os resultados do anticorpo SMA. Os carcinossarcomas (casos 15, 17, 19 e 21) exibiram células conjuntivas moderadamente marcadas, apresentando pleomorfismo celular moderado, em associação a campos de hialinização (caso 15) ou a padrões sólidos ou mixóides (caso 17, 19 e 21). As marcações destes casos se alternaram entre convergentes e divergentes no que interessa ao anticorpo SMA.

A lâmina não neoplásica (16) constou de células bem marcadas (mioepiteliais e vasos) sem outras particularidades. O quadro abaixo (Quadro 6) resume os achados neoplásicos dos casos.

Quadro 6 – Identificação dos casos do terceiro grupo quanto ao resultado histológico e imunoistoquímico.

	15	16	17	18	19	20	21
HE F	CS	NN	CS	CA	CS	CA	CS
AE1/AE3 N	+	-	+	+	+	+	+
AE1/AE3 T	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VIM N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VIM T	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
SMA N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SMA T	+++	-	++	++/+++	++	++/+++	++
CALP N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CALP T	++	-	+	++/+++	+	++/+++	++

HE F: diagnóstico final AE1/AE3 N: citoqueratinas em tecido normal AE1/AE3 T: citoqueratinas em células neoplásicas VIM N: vimentina em tecido normal VIM T: vimentina em células neoplásicas SMA N: actina músculo liso em tecido normal SMA T: actina músculo liso em células neoplásicas CALP N: calponina em tecido normal CALP T: calponina em células neoplásicas CA: carcinoma: CS: carcinossarcoma: NN não neoplásico (+): marcação fraca (++) : marcação moderada (+++): marcação forte (-): sem marcação.

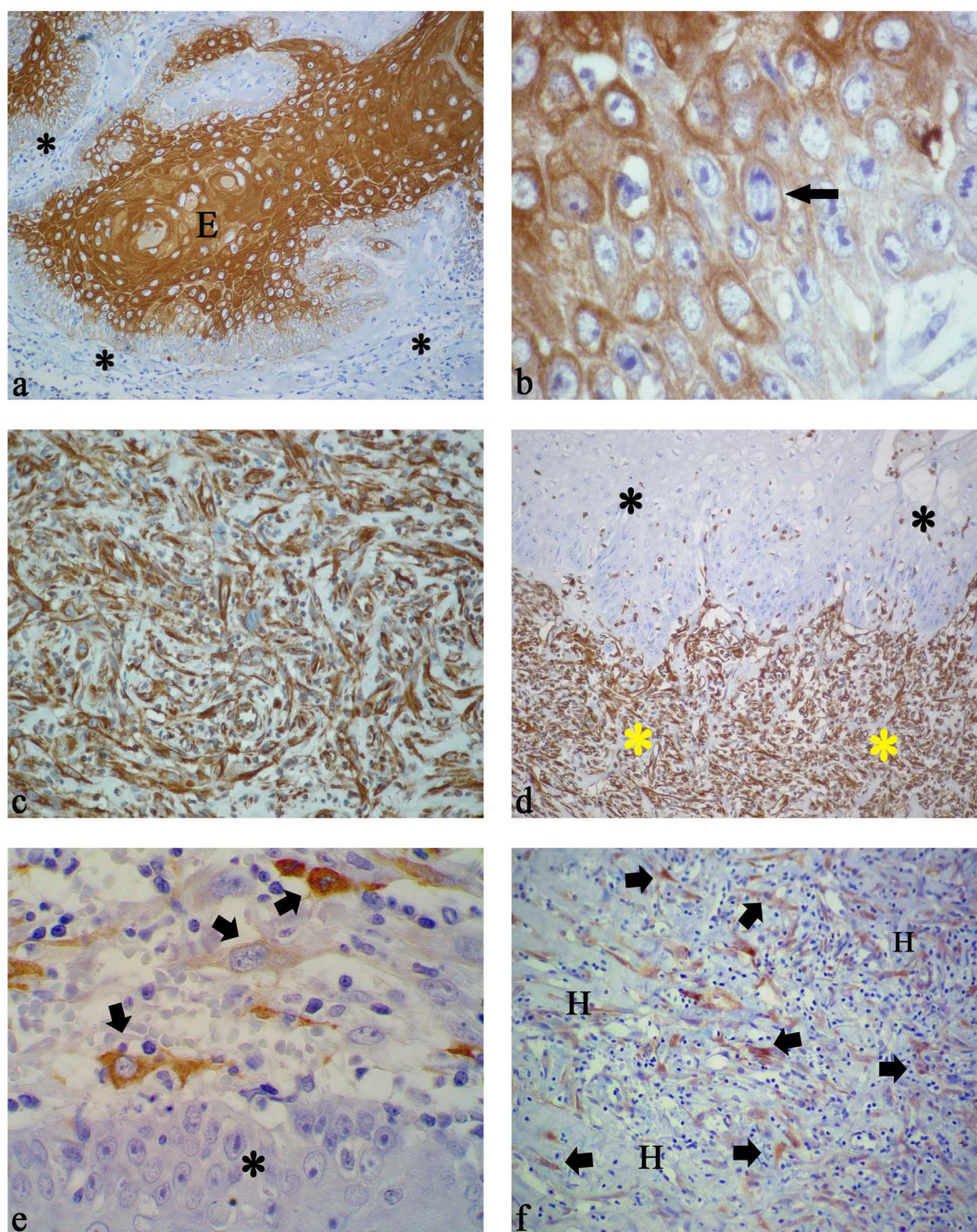


Figura 6 - a) Carcinoma. Reação positiva para células neoplásicas epiteliais (E) se insinuando no conjuntivo (*). AE1/AE3, 200x.

b) Carcinoma. Figura de mitose (seta). AE1/AE3, 1000x.

c) Carcinosarcoma. Células mesenquimais pleomórficas positivas. Vimentina, 400x.

d) Carcinoma. Células mesenquimais (*) marcadas na intimidade da neoplasia (*). Vimentina, 200x.

e) Carcinosarcoma. Imunorreação para células mesenquimais pleomórficas (setas) próximas ao carcinoma (*). SMA, 1000x.

f) Carcinosarcoma. Células conjuntivas pleomórficas (setas) em estroma hialino (H). Calponina, 200x.

5.2.4 Quarto grupo

Seguem, abaixo, as descrições concernentes ao quarto grupo:

AE1/AE3: reações fortes para a neoplasia epitelial e para queratina foram percebidas. Não foram aparentes marcações na camada basal dos carcinomas (Figura 7a). Mitoses atípicas foram diagnosticadas frequentemente (Figura 7b). Os remanescentes de glândula submandibular se apresentaram discretamente evidentes. Os casos 23 (sarcoma), 25 e 28 (não neoplásicos), não demonstraram positividade.

Vimentina: fora das neoplasias, foram muito marcadas as células mioepiteliais nas glândulas salivares. Os casos de carcinosarcoma (22, 24 e 26) revelaram células intensamente positivas, com pleomorfismo forte, celular e nuclear, dominando as figuras de carcinoma (Figura 7c) e os remanescentes glandulares (caso 22 e 24).

O sarcoma (caso 23) foi fortemente evidenciado, apresentando células mesenquimais exibindo intenso pleomorfismo, perda evidente da relação núcleo-plasmática e orientação fascicular variada (Figura 7d).

O carcinoma (caso 27) foi representado por células pleomórficas intensamente positivas, por vezes fusiformes e por vezes achatadas com núcleos exuberantes. Os casos 25 e 28 (não neoplásicos) revelaram estruturas mesenquimais sem desvios de normalidade. Na lâmina 25 ficou aparente a reação forte para células

fusiformes com aspecto de normalidade associadas a raríssimas células com aumento de tamanho, relacionadas a desmoplasia, em lobo de glândula submandibular.

SMA: nas regiões não tumorais foram percebidas reações positivas para vasos e células mioepiteliais. Os carcinossarcomas (casos 22, 24 e 26) foram representados por celularidade fortemente expressa, em faixa contínua (caso 22) ou interrompida (casos 24 e 26), com morfologia fibroblástica sem aparência neoplásica, marginando o componente carcinomatoso (Figura 7e). Notou-se, também, evidência forte de células fusiformes na profundidade, com diferenciação vascular delicada ou com apresentação isolada (caso 22). O caso 24 evidenciou células achatadas ou fusiformes, fracamente marcadas, com alteração na relação núcleo-plasmática e dispersas pela lesão.

O sarcoma (caso 23) foi fortemente marcado. Neste percebeu-se grande pleomorfismo de células isoladas ou agrupadas, que guardaram ou não sua relação núcleo-plasmática. Alguns campos mostraram positividade para vasos de fina parede. Certos campos da lesão não expressaram qualquer evidência de positividade.

O carcinoma (caso 27) apresentou estroma composto por células fusiformes intensamente positivas, sem desvios na relação núcleo-plasmática, marginando a formação cística neoplásica em forma de feixe. Abaixo desta região em fascículo, percebeu-se uma diferenciação vascular sem evidências de alteração neoplásica.

Os casos sem neoplasia (caso 25 e 28) foram descritos conforme se segue. O caso 25 foi composto por poucas células, de fraca evidência, com morfologia usual, associadas a outras com discreta alteração em volume celular e nuclear. Percebeu-se, por contra-coloração a presença de material hialino relacionado a algumas destas células. O caso 28 evidenciou estruturas sem alterações sarcomatosas.

Calponina: Uma reação intensa para estruturas não neoplásicas do caso, como vasos e células mioepiteliais, foi patente. Os carcinossarcomas (caso 22, 24 e 26) apresentaram marcação expressiva para célula fusiformes em faixa, fazendo intersecção com a porção carcinomatosa da lesão (caso 22) ou células moderadamente reveladas e dispersas no conjuntivo (casos 24 e 26) (Figura 7f). Outros campos revelaram fortemente células pleomórficas, com núcleos e citoplasmas achatados. Por vezes os núcleos destas preencheram quase todo o citoplasma (caso 22). A coincidência em relação ao anticorpo SMA foi patente.

O sarcoma (caso 23) revelou marcação fraca e ocasional para células fusiformes dispersas, sem outras particularidades.

O carcinoma (27) foi representado por marcação focal de células fusiformes com morfologia usual associadas à neoplasia. Na profundidade, ocasionais vasos delicados foram moderadamente evidenciados.

Abordaremos individualmente os casos não neoplásicos. O de número 25 foi formado por células fracamente

positivas, com aparência fusiforme normal ou raramente exibindo aumento de tamanho, interessando regiões de hialinização. O caso 28 revelou células vasculares e células mioepiteliais sem outras particularidades.

O quadro abaixo resume os achados neoplásicos dos casos (Quadro 7).

Quadro 7 – Identificação dos casos do quarto grupo quanto ao resultado histológico e imunoistoquímico.

	22	23	24	25	26	27	28
HE F	CS	SA	CS	NN	CS	CA	NN
AE1/AE3 N	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++
AE1/AE3 T	+++	-	+++	-	+++	+++	-
VIM N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VIM T	+++	+++	+++	-	+++	+++	-
SMA N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SMA T	+++	+++	+	+	+++	+++	-
CALP N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CALP T	+++	+	++/+++	+	++/+++	+	-

HE F: diagnóstico final AE1/AE3 N: citoqueratinas em tecido normal AE1/AE3 T: citoqueratinas em células neoplásicas VIM N: vimentina em tecido normal VIM T: vimentina em células neoplásicas SMA N: actina músculo liso em tecido normal SMA T: actina músculo liso em células neoplásicas CALP N: calponina em tecido normal CALP T: calponina em células neoplásicas CA: carcinoma: CS: carcinossarcoma: SA: Sarcoma: NN não neoplásico (+): marcação fraca (++) : marcação moderada (+++): marcação forte (-): sem marcação: (+*) pleomorfismo celular discreto.

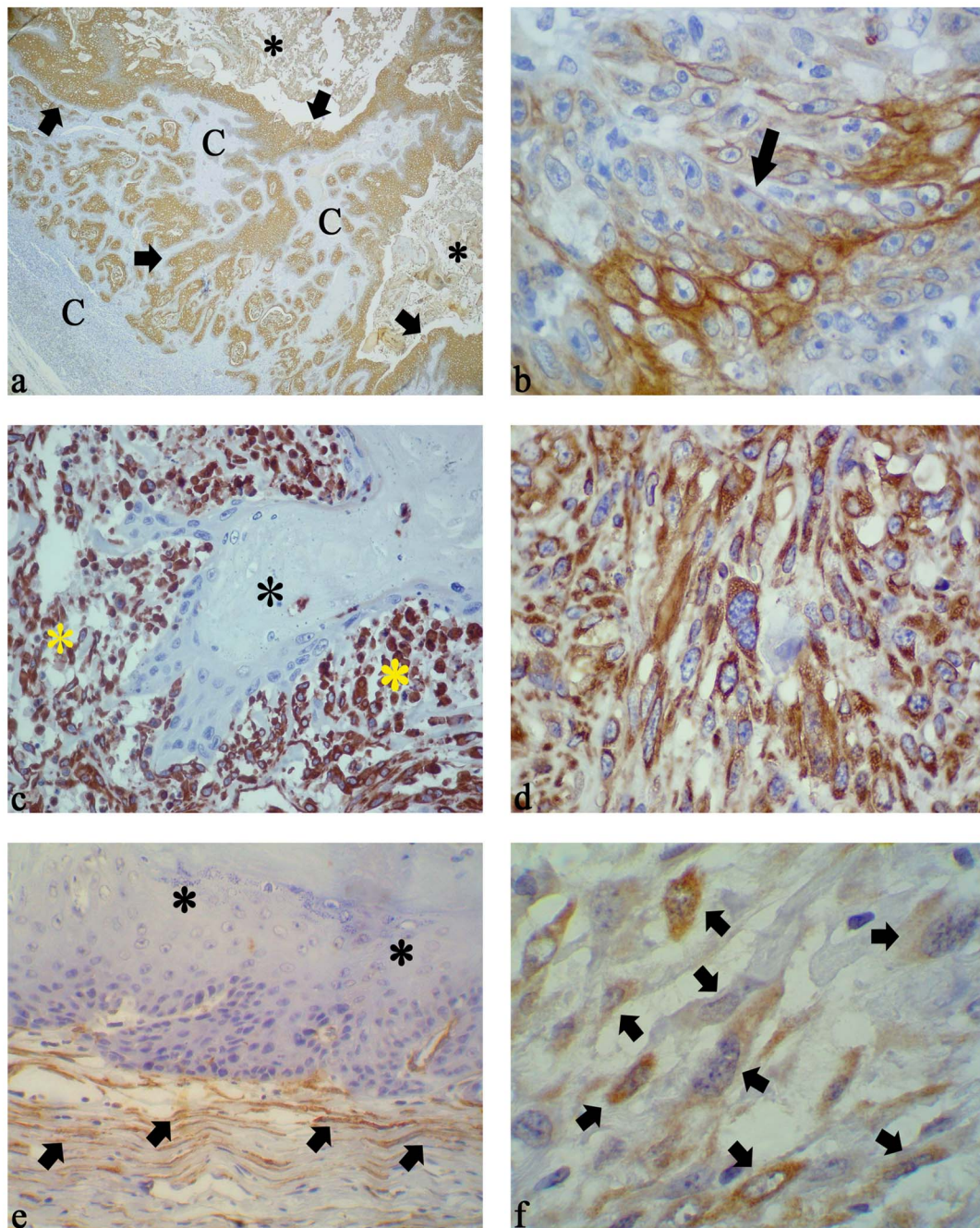


Figura 7- a) Carcinoma. Marcação para células neoplásicas epiteliais (setas) e queratina (*). O conjuntivo não foi revelado pelo anticorpo (C). AE1/AE3, 25x.
 b) Carcinoma. Figura evidente de mitose (seta). AE1/AE3, 1000x.
 c) Carcinosarcoma. Neoplasia mesenquimal (*) ao redor de campo de carcinoma (*). Vimentina, 400x.
 d) Sarcoma. Células mesenquimais pleomórficas em todo o campo. Vimentina, 1000x.
 e) Carcinosarcoma. Imunorreação positiva para células mesenquimais, em faixa (setas), na intimidade da neoplasia epitelial (*). SMA, 400x.
 f) Carcinosarcoma. Células pleomórficas isoladas (setas). Calponina, 1000x.

6 DISCUSSÃO

A carcinogênese, de forma simplista, ocorre quando um agente físico, biológico ou químico interage com material genético celular, alterando-o e, por conseguinte, modificando o fenótipo de uma célula. A concepção atual sobre a carcinogênese é um produto de observações e experimentos que vêm se somando ao longo dos anos (Woolf, 1998; Fernandes Júnior, 2000; Mainenti; Rosa, 2008; Mainenti et al., 2008).

A carcinogênese química é estudada, desde a época em que foram sugeridas as primeiras reflexões sobre a relação entre certas substâncias com o corpo humano. Hill e Percival Pott, no século XVIII, foram cientistas pioneiros reconhecendo, respectivamente, os cânceres de pulmão e pele. Iniciava nesta época a busca pelas substâncias implicadas na carcinogênese química. As pesquisas culminaram no descobrimento dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Woolf, 1998; Rodrigues; Camargo, 1999; Fernandes Júnior, 2000; Mainenti; Rosa, 2008).

De maneira experimental, as neoplasias foram induzidas quimicamente, com sucesso, por Yamagiwa e Ichikawa, em 1917. Estes autores utilizaram alcatrão em orelhas de coelho. Estudando suas anotações, percebe-se que a substância empregada era de baixo poder oncogênico dado o longo tempo de exposição dos

animais ao carcinógeno (um ano). Todavia, não fosse esta pesquisa e o afínco destes autores, outros pesquisadores poderiam não repetir o experimento ou não se buscaria um carcinógeno mais efetivo.

No século XX, por volta da década de 50, Berenblum e Shubik reconheceram os primeiros eventos da carcinogênese química em pele de camundongos: iniciação e promoção. A primeira etapa foi entendida como o contato genético com uma substância oncogênica. A segunda foi apontada como a estimulação de divisões celulares (Bogovski, 1994; Jussila, 2000). A progressão, ou seja, expansão clonal de células neoplásicas, somente foi compreendida após aquelas considerações (Woolf, 1998; Fernandes Júnior, 2000; Serpi, 2003). O entendimento destas fases da carcinogênese é crucial para estudo da matéria em tela. Substâncias que não são capazes de responder por estas fases isoladamente ou em conjunto, não são acompanhadas de potencial carcinogênico.

O alcatrão é um fraco carcinógeno, conforme já visto. Os carcinógenos químicos utilizados atualmente são membros do grupo dos HPA. Deste grupo o DMBA (9,10-dimetil 1,2-benzantraceno) é considerado uma substância que responde por todas as fases da carcinogênese, ou seja, iniciação, promoção e progressão (Fassoni et al., 1993; Sumitomo et al., 1996; Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008). Entendemos que não poderia ser diferente uma vez que não importa o veículo ou a maneira como o DMBA entra em contato com as células animais. Os autores pesquisados por nós sempre apontaram para a formação de neoplasias.

A carcinogênese, particularizada para as glândulas salivares, remonta o ano de 1939 com Benecke e Schröder (Bauer; Byrne, 1950; El-Mofty, 1977b). Portanto, não é um assunto novo. O que torna a matéria intrigante é o fato de serem pouco coincidentes os resultados constantes na literatura. Os estudiosos de carcinogênese de glândulas salivares divergem sobre os modelos animais, sobre as concentrações dos carcinógenos e sobre a maneira de utilizá-los (Mainenti; Rosa, 2008). A título de exemplo, lembramos que o DMBA em glândulas salivares de animais foi utilizado na forma de implante (*pellet*) (Bauer; Byrne, 1950; Standish, 1957; Cataldo et al., 1964; Ebling et al., 1965; Chaudhry et al., 1966; Turbiner; Shklar, 1969; Sheehan; Shklar, 1972; El-Mofty, 1977b; El-Mofty, 1978; Hindy et al., 1995; Sumitomo et al., 1996), após injeção na glândula (Schmutz; Chaudhry, 1969; Kim et al., 1974; Takeuchi et al., 1975; Wigley; Carbonell, 1976; Takai et al., 1984; Zaman et al., 1996; Tsujimoto et al., 1999; Ogawa et al., 2000; Ide et al., 2002; Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008), por canulação no ducto glandular (Sela et al., 1974), oferecido na alimentação ou via tubo intragástrico (Girolami et al., 2008).

O nosso referencial teórico também apontou para divergências nos achados histopatológicos. Os pesquisadores não são unânimes em descrever os padrões neoplásicos das lesões em glândulas salivares. Desde Standish (1957), que forneceu as primeiras descrições histológicas, até Mainenti et al. (2008), os estudiosos da matéria reportaram diagnósticos de carcinomas e sarcomas associados ou não. Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008), entenderam que,

quando associados, estes tumores se apresentaram como neoplasias mistas verdadeiras. Tal conceito se mostrou correto na atual pesquisa.

É interessante notar que certos tópicos, como o procedimento cirúrgico para inserção de *pellet* ou injeção de carcinógeno, foram descritos por poucos autores como Cataldo et al. (1964), Zaman et al. (1996), Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008). O acesso por incisão retilínea (Cataldo et al., 1964; Zaman et al., 1996) pareceu ser mais trabalhoso do que a abordagem oblíqua cervical que evitou extensas divulsões e proporcionou exploração glandular submandibular direta, segundo o relato dos autores (Mainenti, 2006; Mainenti et al., 2008).

Quanto à história natural dos carcinomas induzidos em glândulas salivares de ratos, as primeiras descrições completas foram publicadas por Cataldo et al. (1964). Outros autores como Turbiner e Shklar (1969), Takeuchi et al. (1975), El-Mofty (1977b) e Takai et al. (1986) não aduziram qualquer nova informação. Todos entenderam que ocorrem quatro eventos: fase degenerativa, fase proliferativa, fase metaplásica e fase neoplásica. Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008) foram capazes de contrastar seus achados com os dos estudiosos que os precederam e apresentar novas conclusões. Para estes autores, a fase degenerativa foi interpretada como quadros de sialadenite. A etapa proliferativa foi reconhecida, não só como um evento marcado pela proliferação ductal, mas, também, como acompanhada da formação de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas epiteliais. A terceira e quarta fases foram diagnosticadas como eminentemente neoplásicas e, não, como metaplásica e neoplásica,

conforme outras citações. Apesar disto, certos animais não desenvolveram neoplasias. Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008) diagnosticaram os seguintes tumores nas glândulas salivares: carcinomas, carcinossarcomas e um sarcoma.

A atual pesquisa fez uso dos blocos de parafina originais para processamento imunohistoquímico. Para a histoquímica fez-se uso de material em formol. A avaliação dos achados de Mainenti (2006), à luz da revisão dos recortes do material em estoque, nos permitiu modificar certos diagnósticos. O primeiro grupo permaneceu inalterado e composto por sete casos de sialadenite. O segundo grupo foi revisto e casos de sialadenite e atipia ductal, após aprofundamento dos blocos, apontaram para seis casos de carcinomas incipientes e somente uma sialadenite. O terceiro e quarto grupos mantiveram os achados originais, ou seja, três casos não neoplásicos, um sarcoma, três carcinomas e sete carcinossarcomas. Vale lembrar que revisões de casos sempre podem esclarecer dúvidas diagnósticas na rotina da anatomia patológica. Entendemos que nossos achados reforçaram as conclusões das experiências de Mainenti (2006). Este autor pretendeu produzir neoplasias glandulares e assim o fez, provando ser o modelo eficiente para oncogênese experimental.

O processamento de novo material histológico permitiu, ainda, a tomada de novas impressões sobre os casos neoplásicos. A histoquímica realizada contemplou novas lâminas em hematoxilina e eosina e em tricrômico de Gomori. Este último recurso histoquímico é endereçado à revelação, em verde, das fibras colágenas (Mainenti, 1999). Estas estruturas foram constantes nos tumores, a partir do

segundo grupo, denotando formação de colágeno. Os seis carcinomas, reclassificados no segundo grupo, foram representados por neoplasias epiteliais bem diferenciadas, acompanhadas de células fusiformes, discretamente pleomórficas e figuras conjuntivas de hialinização, reveladas em verde pelo tricrômico. No terceiro grupo os carcinomas se mostraram com elevação do índice mitótico, hipercromasia nuclear e pleomorfismo celular. Percebemos formação colágena, moderadamente associada às células mesenquimais, nas proximidades dos tumores. No quarto grupo, um único caso de carcinoma foi diagnosticado. Neste, ficou clara a invasão de massas epiteliais em direção ao conjuntivo e a ocorrência de intensa colagenização. O achado de colágeno nas imediações de carcinomas é alvo de discussões. Soma et al. (2001) referiram ser o colágeno uma possível barreira à penetração tumoral no conjuntivo. Entretanto, De Wever et al. (2008) indicaram exatamente o oposto, ou seja, que o colágeno orientaria uma invasão neoplásica. O assunto merece estudos futuros. Conforme descrevemos, os casos de carcinoma foram envolvidos por colagenização em associação aos quadros de invasão. Estes achados estariam em conformidade com De Wever et al. (2008). Contudo, nos carcinossarcomas, o comportamento mesenquimal diminuiu o avanço carcinomatoso, comprometendo o entendimento deste conceito.

Os quadros de carcinossarcomas somente foram reconhecidos a partir do terceiro grupo. As lesões exibiram importante pleomorfismo epitelial e mesenquimal. Os casos foram acompanhados de colagenização evidente pela coloração esverdeada do tricrômico de Gomori. O quarto grupo nos chamou atenção pela ocorrência de

células pleomórficas epiteliais e mesenquimais em flagrante diferença em relação aos casos do terceiro grupo. Ficou patente a dominância dos elementos sarcomatosos sobre os carcinomatosos.

Nossos achados encontraram reforço no que interessa a carcinogênese animal. Apesar dos autores consultados não reconhecerem a ocorrência de carcinossarcomas, alguns foram capazes de diagnosticar fibrossarcomas como o elemento conjuntivo (Schmutz; Chaudhry, 1969; Wigley; Carbonell, 1976; Takai et al., 1984; Sumitomo et al., 1996; Zaman et al., 1996). Também encontramos coincidência no que versa a literatura neoplásica humana. Os carcinomas epidermóides não foram reportados como as neoplasias epiteliais mais comuns. Todavia, foram mencionadas por Capuano et al. (2007). Quanto à porção mesenquimal concordamos com Neville et al. (2004), Capuano et al. (2007) e Kim et al. (2008) ao reconhecermos padrões de fibrossarcomas. Também entendemos que este componente não é o mais comum em carcinossarcomas. Estas interpretações elevaram ainda mais o estudo em questão, dada a raridade das lesões em nosologia humana.

Quanto aos sarcomas, pareceu-nos tratar de neoplasia sólida, do tipo fibroblástica, com diferenciação miofibroblástica e importante formação de colágeno. Oportunamente apresentaremos nossas considerações sobre os miofibroblastos.

A histogênese das neoplasias induzidas quimicamente foi especulada por muitos autores. Com relação aos carcinomas discutiu-se a participação de uma gama de células. Bauer e Byrne (1950) e Ogawa et al. (2000) sugeriram células pluripotentes da região

do ducto intercalar associadas às células mioepiteliais. Turbiner et al. (1969), Takai et al. (1986) e Sumitomo et al. (1996) indicaram somente células de ducto, sem outras informações. Para Kim et al. (1974), El-Mofty (1977b) e El-Mofty (1978) os carcinomas seriam advindos de metaplasia de células acinares e ductais.

Após observações histopatológicas, acreditamos na possibilidade de origem epitelial ductal. Os casos de sialadenite, diagnosticados por Mainenti (2006) e revistos na atual pesquisa, apontaram para perda acinar imediatamente após a injeção de DMBA. Contudo, ductos de tamanhos variados permaneceram como remanescentes glandulares. O total desaparecimento dos ácinos, a partir do primeiro grupo, é incoerente com a hipótese de origem acinar. Sendo assim, o componente epitelial dos carcinomas e carcinossarcomas estaria relacionado a uma gênese ductal. Ihrler et al. (2002), indicaram uma possibilidade de metaplasia em células luminais. Estas, então, apresentariam alteração fenotípica escamosa, com perfil imunohistoquímico semelhante às células basais. Dardick (1991) atestou que se encontra sedimentado o conceito de origem ductal luminal para neoplasias mistas malignas humanas.

No que tange ao entendimento da histogênese dos sarcomas pouco se apresentou até o momento. Ogawa et al. (2000) referiram a possibilidade de transformações neoplásicas a partir do tecido conjuntivo de reparação e de músculos adjacentes às glândulas salivares. Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008) comentaram a participação de fibroblastos atípicos em suas descrições histológicas pré-neoplásicas. Contudo, não discutiram mais sobre a matéria. Em

nosso entendimento, a imunohistoquímica vem ao encontro destas questões descortinando certas dúvidas.

A imunohistoquímica foi um recurso pouco utilizado em neoplasias induzidas em animais. Procurou-se, por exemplo, a evidência de queratina em neoplasias epiteliais (Takai et al., 1986) e a demonstração de queratinas e α -SMA em células mioepiteliais (Ogawa et al., 1999). Em relação à histogênese das neoplasias induzidas, Sumitomo et al. (1996) discutiram a possibilidade de origem ductal basal em carcinomas, após uso de anticorpos contra queratina 13 e 16, EGF, S-100 e PCNA. Ainda para eles, uma diferenciação destas células em mioepiteliais poderia explicar a presença destas em adenomas pleomórficos de seres humanos. Todavia, para Ihrler et al. (2002), pareceu improvável a possibilidade de alteração fenotípica entre células basais e mioepiteliais no que interessa as glândulas salivares humanas.

Em 2000, Ogawa et al., utilizando DMBA em glândulas salivares de filhotes de ratos colocaram em evidência importantes informações após imunohistoquímica das lesões. Estes autores fizeram uso de α -SMA, queratina 19 e PCNA. Foram capazes de diagnosticar carcinomas, adenocarcinomas, fibrossarcomas e rabiomiossarcomas. Suas conclusões indicaram marcações para células ductais (queratina 19) e células mioepiteliais (α -SMA). Citaram, ainda, que os adenocarcinomas seriam próprios de ratas estando, as células mioepiteliais, sempre associadas a estas neoplasias. Contudo, pouco refletiram sobre a histogênese das lesões. Por ser uma metodologia

diferente da utilizada por Mainenti (2006), o trabalho tornou-se de difícil discussão.

Fazendo uma consideração crítica sobre os trabalhos disponíveis em relação a imunohistoquímica em animais, ficou clara a grande carência de estudos em carcinogênese química de glândulas salivares. Por este motivo, nos ocorreu, como alternativa, valorizar a literatura que versa sobre imunohistoquímica em humanos.

As neoplasias primárias de glândulas salivares humanas são raras, segundo Neville et al. (2004). Figuras como mais improváveis certos tumores produzidos experimentalmente como os sarcomas, carcinomas e carcinosarcomas (Auclair; Ellis, 1991; Alvarez-Cañas; Rodilla, 1996; Gnepp, 2005a; Lewis; Olsen, 2005; Capuano et al., 2007; Kim et al., 2008). Talvez, esta raridade explique a gama de anticorpos citada na literatura pertinente ao assunto. Os estudiosos do tema sugerem, de forma pouco coincidente, uma vasta possibilidade de marcadores. Notadamente, existe dificuldade em se uniformizar o estudo imunohistoquímico visto que os trabalhos são relatos de casos clínicos espalhados pelo mundo. Assim sendo, os painéis se mostram extremamente variáveis entre autores.

Os anticorpos utilizados por nós apresentaram resultados negativos (EMA, CerbB-2, miogenina, desmina e S-100) e positivos (AE1/AE3, vimentina, α -SMA e calponina). Faz-se necessário informar que os controles imunohistoquímicos para EMA, CerbB-2, miogenina, desmina e S-100 foram positivos. A negatividade dos marcadores para nossas lâminas pode ser especulada como inespecificidade dos clones para uso em ratos.

Conforme Eveson et al. (2005), uma expressão forte de CerbB-2 se relaciona a prognóstico desfavorável, em se tratando de carcinoma de ducto salivar e carcinoma mucoepidermóide. Isto ocorre porque a proteína CerbB-2 se encontra intimamente relacionada ao crescimento celular. Entretanto, segundo estes autores, o anticorpo não teria sido explorado em outros tumores. Por este motivo, fizemos uma tentativa com nossas neoplasias, na intenção de avaliar seu uso em carcinogênese de ratos. Infelizmente, como já informado, não obtivemos resultados com este marcador.

Em relação ao AE1/AE3 e ao EMA, nossas reações foram positivas para o primeiro e negativas para o segundo em todos os casos avaliados. O anticorpo AE1/AE3, formado por um conjunto de citoqueratinas, foi suficiente para revelar os carcinomas e os elementos epiteliais nos carcinossarcomas, conforme apontamentos de Araújo et al. (2000) e Alves et al. (2004). Outros autores mencionaram achados positivos para EMA em carcinossarcomas (Carson et al., 1995; Bildirici; Eren, 2003; Völker et al., 2007; Kim et al., 2008). Conforme já mencionado entendemos que o clone não demonstrou identidade com o material examinado.

As células fusiformes das neoplasias avaliadas não apresentaram imunorreação positiva para AE1/AE3, EMA ou para S-100. Conforme a opinião de alguns autores, o perfil duplo das células mioepiteliais evidenciaria positividade para S-100 (Prasad et al., 1999; Araújo et al., 2000; Ihrler et al., 2002; Foschini; Eusebi, 2004; Bravo et al., 2007), citoqueratinas (Araújo et al., 2000; Ihrler et al., 2002; Foschini; Eusebi, 2004; Eveson et al., 2005) e EMA (Bravo et al.,

2007), entre outros. Contudo, para os que citaram o uso de S-100, parece que este resultado pode ser variável. À luz de nossa pesquisa, as células fusiformes estudadas certamente não apresentaram filamentos epiteliais em sua constituição. Também não foram evidentes as reações para EMA e S-100. Pelo exposto nos pareceu que as células fusiformes não se apresentaram com fenótipo mioepitelial.

A positividade para vimentina, α -SMA e calponina poderia apontar para a presença de células mioepiteliais, conforme as indicações de Araújo et al. (2000), que mencionaram ser estas imputadas na formação de tumores glandulares salivares. A calponina, para Ogawa et al. (2000), seria o único marcador para células mioepiteliais, quando outros se mostrassem negativos. Espinosa de Los Monteros et al. (2002) referiram que a calponina apresentaria imunorreação superior ao α -SMA em células mioepiteliais. Todavia, nossos resultados indicaram justamente o contrário, ou seja, marcação positiva para α -SMA e calponina, sendo a última mais fraca. Ainda segundo Espinosa de Los Monteros et al. (2002), as células mioepiteliais somente se confundem com miofibroblastos, dada a imunorreação coincidente. Tal fato também foi reportado por Jay et al. (2007).

Sob a óptica de Mentzel e Fletcher (2002) e Jay et al. (2007), nossas lesões de células mesenquimais poderiam ser consideradas miofibrossarcomas visto que ocorreu positividade para α -SMA e negatividade para desmina, S-100 e anticorpos para epitélio. Contudo, nossos estudos nos levaram a crer que o sarcoma e os componentes mesenquimais dos carcinossarcomas avaliados, se

trataram de fibrossarcomas com diferenciação miofibroblástica, em coincidência com Thompson e Fanburg (2005). Interpretamos que as células positivas para α -SMA ocorreram de forma agrupada ou esparsa no sarcoma e nos carcinossarcomas. Desta maneira, nos pareceu coerente concordar com Soma et al. (2001), que perceberam células margeando neoplasias malignas intimamente relacionadas à produção colágena, conforme abordado anteriormente. Para De Wever et al. (2008), células fusiformes neoplásicas, por efeito parácrino, alterariam o fenótipo para células α -SMA positivas do tipo miofibroblastos. Ainda, os miofibroblastos se diferenciariam imunistoquimicamente dos fibroblastos, pois expressariam proteínas musculares ausentes nestes últimos. Os fibroblastos seriam positivos somente para vimentina. (Dardick, 1996; Fisher, 2004). Este fato foi observado em nossas lâminas. Muitas células fusiformes somente se evidenciaram pela contra-coloração imunistoquímica da hematoxilina quando o anticorpo utilizado foi diferente de vimentina.

Segundo Vered et al. (2007) e De Wever et al. (2008), os miofibroblastos poderiam ser implicados não na contenção neoplásica conforme Soma et al. (2001), mas na invasão de carcinomas. Para Vered et al. (2007), que estudaram a carcinogênese de língua de ratos usando o 4NQO, os miofibroblastos estariam presentes quando do aparecimento de neoplasias epiteliais e secretariam metaloproteinases, contribuindo para a disseminação da lesão. Segundo Kellermann et al. (2008), os miofibroblastos seriam fibroblastos fenotipicamente alterados e nunca encontrados em lesões benignas bucais. Estariam relacionados à ocorrência de angiogênese e

com a produção de inúmeras substâncias como citocinas, hormônios, mediadores da inflamação, proteínas da matriz extracelular, entre outras. Ainda conforme os mesmos, o achado destas células, em carcinomas epidermóides bucais, estaria relacionado a um pior prognóstico. As considerações destes autores certamente merecem investigação. Lembramos que muitas vezes diagnosticamos células fusiformes, sem alterações morfológicas, em diferenciação vascular delicada. Tal fato pode estar relacionado com o aludido efeito angiogênico.

Ainda sobre imunoistoquímica para células mesenquimais, realizamos certos diagnósticos diferenciais para fibrossarcomas. Excluimos a possibilidade de ocorrência de rabdomyosarcomas dada à especificidade da miogenina para estes casos, conforme Parham e Barr (2002a) e Parham e Barr (2002b). Outros tumores contemplados e excluídos foram os leiomyosarcomas. Os mesmos são, segundo Fisher (2004), positivos para desmina, fato não ocorrido em nossos casos.

Do ponto de vista da formação de nossas neoplasias parece lógico que a interação entre certas variáveis possa responder pela ocorrência de lesões neoplásicas e não neoplásicas. Imaginamos que qualquer diferença no procedimento cirúrgico para deposição do carcinógeno, em associação à susceptibilidade ou não dos animais, possa culminar em resultados diferentes. Certos sujeitos não foram acometidos de neoplasia, mesmo após vinte semanas de experimento. No entanto, ficou claro que as células epiteliais responderam precocemente ao DMBA em relação ao tecido conjuntivo. Os

carcinomas se mostraram incipientes, mas presentes no segundo grupo de pesquisa, ou seja, após dez semanas de injeção do carcinógeno. Nesta fase o conjuntivo exibiu algum pleomorfismo. Vale referir que as células conjuntivas margeavam as lesões epiteliais em conformidade com Vered et al. (2007). Após quinze e vinte semanas, as lesões se mostraram mais malignas e o conjuntivo passou a apresentar pleomorfismo celular e nuclear evidente. Também é importante ressaltar que nos carcinossarcomas o componente mesenquimal se apresentou com crescimento mais exuberante ao passo que os componentes epiteliais malignos revelaram presença de queratina em camadas e em pérolas. Estas composições epiteliais claramente nos ajudaram a classificar os carcinomas como moderadamente diferenciados.

A origem dos carcinossarcomas é acompanhada de muita especulação. Segundo Stojadinovic et al (2001), três são as teorias para explicar a formação destas neoplasias, ou seja, origem monoclonal, origem policlonal e lesões em colisão. Sobre os tumores de colisão, concordamos com Mainenti (2006) e Mainenti et al. (2008) e acreditamos que as neoplasias diagnosticadas são verdadeiramente mistas malignas e, não, o encontro de tumores. Esta idéia parece ter respaldo nos estudos de Mainenti (2006), uma vez que os carcinomas e o caso de sarcoma ocorreram de maneira independente, sugerindo, conforme já apontado, uma resposta celular individual de cada animal.

A idéia de neoplasia de origem monoclonal é referenciada por Carson et al. (1995), Dardick (1996), Götte et al. (2000), Völker et al. (2007) e Kim et al. (2008). Todavia, acreditamos

que esta teoria não encontra sustentação imunoistoquímica, visto que a vimentina não se relacionou ao epitélio e as citoqueratinas não marcaram o conjuntivo. Assim sendo, excluimos a participação de uma única linhagem em acordo com Alvarez-Cañas e Rodilla (1996) e Stojadinovic et al (2001). Estes últimos autores verificaram uma origem policlonal em um caso de carcinossarcoma raro de mucosa bucal, sem a participação glandular. Somando-se as explicações anteriores, percebemos ser possível uma origem policlonal, ou seja, gênese de células ductais e de células fibroblásticas/ miofibroblásticas.

7 CONCLUSÃO

Interpretando-se todos os achados histoquímicos e imunoistoquímicos, à luz do referencial teórico, concluiu-se que:

- a) a alta incidência de neoplasias malignas valorizou sobremaneira o modelo de carcinogênese em glândulas salivares de ratos;
- b) as células envolvidas na formação de neoplasias epiteliais foram entendidas como células ductais luminais;
- c) o estroma dos carcinomas apresentou células com aspecto miofibroblástico relacionadas à produção de colágeno;
- d) o sarcoma exibiu padrão de células fusiformes, compatível com fibrossarcoma, apresentando diferenciação ocasional de células com características miofibroblásticas, associadas à produção de colágeno;

e) os carcinossarcomas se apresentaram como neoplasias mistas malignas em conformidade com a teoria de origem policlonal. O componente epitelial foi tido como de origem ductal luminal. O elemento mesenquimal foi interpretado como originário de fibrossarcoma, composto por ocasionais células com aspecto miofibroblástico, relacionadas à produção colágena.

5 REFERÊNCIAS*

Alvarez-Cañas C, Rodilla IG. True malignant mixed tumor (carcinosarcoma) of the parotid gland. Report of a case with immunohistochemical study. *Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 Apr;81(4):454-8.

Alves VAF, Leandro LO, Vassallo J, Pereira EM, Kanamura CT, Wakamatsu A, Santos RTM, Nonogaki S et al. Controle de qualidade interlaboratorial em imuno-histoquímica: citoceratinas e receptor de estrógeno como modelos. *J Bras Med Lab.* 2004 Jun;40(3):175-83.

Araújo VC, Sousa SOM, Carvalho YR, Araújo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000 Sep;8(3):195-202.

Auclair PL, Ellis GL. Nonlymphoid sarcomas of the major salivary glands. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR. *Surgical pathology of the salivary glands.* Philadelphia: W.B. Saunders; 1991. Cap. 29, p.514-27.

Bauer WH, Byrne JJ. Induced tumors of the parotid gland. *Cancer Res.* 1950 Dec;10(12):755-61.

Baseado em:

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

Bildirici K, Eren Ö, Carcinosarcoma (true malignant mixed tumor) of the submandibular gland. *T Klin Bilimleri*. 2003;23:146-49.

Bogovski P. Tumours of the skin. In: Turusov V, Mohr U, editors. *Pathology of tumours in laboratory animals, volume II - tumors of the mouse*. Lyon: IARC Scientific Publications; 1994. Cap. 1, p.1-45.

Bravo SP, Montes CL, Becerril UL, Sánchez IM. Myoepithelial cells are the main component in pleomorphic adenomas? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007 Mar 1;12(2):E110-5.

Burgess KL, Dardick I, Cummins MM, Burford-Mason AP, Bassett R, Brown DH. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Dec;82(6):674-80.

Capuano ACT, Júnior DCP, Carvalhosa AA, Araújo VC. Immunoprofile of a carcinosarcoma of the submandibular gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Mar; 103(3):398-402.

Carson JH, Tojo DP, Chow JM, Hammadeh R, Raslam WF. Carcinosarcoma of salivary glands with unusual stromal components. Report of two cases and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Jun;79(6):738-46.

Cataldo E, Shklar G, Chauncey HH. Experimental submaxillary gland tumors in rats. *Arch Pathol*. 1964 Mar;77:305-16.

Cavalcante RB, Lopes FF, Ferreira AS, Freitas RA, Souza LB. Immunohistochemical expression of vimentin, calponin and HHF-35 in salivary gland tumors. *Braz Dent J*. 2007;18(3):192-97.

Cerqueira EMM. Câncer e genética. In: Baracat FF, Júnior HJF, da Silva MJ, editores. *Cancerologia atual, um enfoque multidisciplinar*. São Paulo: Editora Roca; 2000. p.507-15.

Chaudhry AP, Liposky R, Jones J. Dose-response of submandibular glands to carcinogen pellets in rats and hamsters. *J Dent Res*. 1966 Sept/Oct;45(5):1548-50.

Dardick I, Histogenesis and morphogenesis of salivary gland neoplasms. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR. *Surgical pathology of the salivary glands*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1991. Cap. 7, p.108-28.

Dardick I. *Color atlas/text of salivary gland tumor pathology*. New York: Igaku-Shoin; 1996. 274p.

Declercq J et al. Salivary gland tumors in transgenic mice with targeted PLAG1 proto-oncogene overexpression. *Cancer Res*. 2005 Jun 1;65(11):4544-53.

De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*. 2008 Nov 15;123(10):2229-38

Dias M, Cabrita S, Sousa E, França B, Patrício J, Oliveira C. Benign and malignant mammary tumors induced by DMBA in female Wistar rats. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1999;20(4):285-8.

Ebling H, Louro LM, Brito JHM, Wagner EM. Produção de tumores em salivares de rato com DMBA. *R Fac Odont PA*. 1965;(7):31-4.

El-Mofty S. Immunological studies of induced tumors of the rat submandibular gland. *Oncology*. 1977;34(2):53-7.

El-Mofty S. Chemical carcinogenesis in the rat submandibular gland. *Egypt Dent J*. 1977 Apr;23(2):65-75.

El-Mofty S. Spontaneous regression of induced parotid gland tumors in rats. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1978 Mar;45(3):431-9.

Espinosa de Los Monteros A, Millán MY, Ordás J, Carrasco L, Reymundo C, Martín Las de Mulas J. Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Vet Pathol*. 2002 Mar;39(2):247-56

Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR, El-Naggar AK. Tumors of the salivary gland: introduction. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (editors). *Pathology and genetics, head and neck Tumours*. Lyon: IARC Press; 2005. p.212-15.

Farber E. Chemical carcinogenesis: a biologic perspective. *Am J Pathol*. 1982 Feb;106(2):371-96.

Fassoni AA, Salles CLF, Consolaro A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. *Rev Odontol USP*. 1993;7(4):285-91.

Fernandes Júnior HJ. Introdução ao estudo das neoplasias. In: Baracat FF, Fernandes Júnior HJ, Silva MJ, editores. *Cancerologia atual, um enfoque multidisciplinar*. São Paulo: Editora Roca; 2000. p.3-10.

Fisher C. Myofibroblastic malignancies. *Adv Anat Pathol*. 2004 Jul;11(4):190-201

Foschini MP, Eusebi V. Value of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Salivary Gland Tumors. *Pathol Case Rev*. 2004 Nov./Dec.;9(6):270-5.

Frith CH, Heath JE. Tumours of the salivary gland. In: Turusov V, Mohr U, editors. *Pathology of tumours in laboratory animals, volume II - tumors of the mouse*. Lyon: IARC Scientific Publications; 1994. Cap. 4, p.115-139.

Girolami F, Abbadessa G, Racca S, Spaccamiglio A, Piccione F, Dacasto M et al. Time-dependent acetylsalicylic acid effects on liver CYP1A and antioxidant enzymes in a rat model of 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis. *Toxicol Lett*. 2008 Sep 26;181(2):87-92.

Gnepp DR. Carcinosarcoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (editors). *Pathology and genetics, head and neck tumours*. Lyon: IARC Press; 2005. p.244.

Gnepp DR. Soft tissue tumors. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (editors). *Pathology and genetics, head and neck tumours*. Lyon: IARC Press; 2005. p.275.

Gnepp DR, Wenig BM. Malignant mixed tumors. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR. *Surgical pathology of the salivary gland*, editores. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1991. p.350-368.

Götte K, Reidel F, Coy JF, Spahn V, Hörmann K. Salivary gland carcinossarcoma: imunohistoquimical, molecular genetic and electron microscopic findings. *Oral Oncology*. 2000;36(4):360-4.

Guillou L. Pleomorphic sarcomas: subclassification, myogenic differentiation and prognosis. *Diagnostic Histopathology*. 2008 Nov;14(11):527-537.

Hindy AM, Shaker MA, Mounir R.M. Carcinogenesis of mouse submandibular salivary gland using DMBA implant. *Egypt Dent J*. 1995;41(2):1195-202.

Ide F. et al. Reduction of p53 dosage renders mice hypersensitive to 7, 12-dimethylbenz(α)anthracene-induced salivary gland tumorigenesis. *Anticancer Res*. 2002 Jan/Feb;22(1A):201-4.

Ide F et al. Skin and salivary gland carcinogenicity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene is equivalent in the presence or absence of aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Lett*. 2004 Oct;214(1):35-41.

Ihrler S, Zietz C, Sendelhofert A, Lang S, Blasenbren-Vogt S, Löhrens U. A morphogenetic concept of salivary duct regeneration and metaplasia. *Virchows Arch*. 2002 May;440(5):519-26.

Jay A, Piper K, Farthing PM, Carter J, Diwakar A. Low-grade myofibroblastic sarcoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Nov;104(5):e52-8

Jussila, T. Modelling cancer: recapitulation of tumour growth in experimental systems in vivo and in vitro [dissertação]. Oulu (Finlândia): Faculty of Medicine, University of Oulu; 2000.

Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol.* 2008 May;44(5):509-1.

Kim HS, Cho JF, Chung YT et al. Carcinosarcoma (true malignant tumor) of the parotid gland – a report of a case with small cell carcinoma as the carcinoma component. *Korean J Pathol.* 2008;42:175-80.

Kim SK, Spencer HH, Weatherbee L, Nasjleti CE. Changes in secretory cells during early stages of experimental carcinogenesis in the rat submandibular gland. *Cancer Res.* 1974 Sep;34(9):2172-83

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Patologia: bases patológicas das doenças.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. Cap.8, p.281-356.

Kwon MY, Gu M. True malignant mixed tumor (carcinosarcoma) of parotid gland with unusual mesenchymal component: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Jun;125(6):812-5.

Lewis JE, Olsen KD. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (editors). *Pathology and genetics, head and neck Tumours.* Lyon: IARC Press; 2005. p.245-6.

Machado GF, Figueiredo F. Revisão: filamentos intermediários. *Medicina (Ribeirão Preto).* 1996 Jan/Mar;29:104-13.

Mainenti P, Bolanho A, Rosa LEB. Chemical carcinogenesis in rat (*Rattus norvegicus*) submandibular gland using DMBA. ACR 2008;28(2):67-71.

Mainenti P. Carcinogênese quimicamente induzida em glândulas salivares submandibulares de ratos (*Rattus norvegicus*) [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2006.

Mainenti P. Fibrolipoma de mucosa jugal (revisão de literatura e relato de caso). Rev. do CROMG. 1999 Set-Dez;5(3):185-191.

Mainenti P, Rosa LEB. Carcinogênese química experimental em glândulas salivares – revisão da literatura. RBC 2008;54(2):167-74.

Matthews JB. Immunocytochemical methods: a technical overview. J Oral Pathol. 1987 Apr;16(4):189-95.

Mentzel T, Fletcher JA. Low grade myofibroblastic sarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (editors). Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. Lyon: IARC Press; 2002. p.94-95.

Miettinen M. Antibody specific to muscle actins in the diagnosis and classification of soft tissue tumors. Am J Pathol. 1988 Jan;130(1):205-15.

Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol. 2008 Jun;129(6):705-33.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot. *Patologia oral & maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Cap.11, p.373-417.

Ogawa Y, Yamauchi S, Ohnishi A, Ito R, Ijuhin N. Immunohistochemistry of the myoepithelial cells during development of the rat salivary glands. *Anat Embryol*. 1999 Aug;200(2):215-28.

Ogawa Y, Wan F, Toyosawa S, Ijuhin N. Induction of adenocarcinoma containing myoepithelial cells in rat submandibular gland by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene. *Virchows Arch*. 2000 Sept;437(3):314-24.

Palmer RM. The identification of myoepithelial cells in human salivary glands. A review and comparison of light microscopical methods. *J Oral Pathol*. 1986 Apr;15(4):221-9.

Parham DM, Barr FG. Alveolar rhabdomyosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (editors). *Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press; 2002. p.150-2.

Parham DM, Barr FG. Embryonal rhabdomyosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (editors). *Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press; 2002. p.146-9.

Polyak K, Hu M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005 Jul;10(3):231-47.

Prasad AR, Savera AT, Gown AM, Zarbo RJ. The myoepithelial immunophenotype in 135 benign and malignant salivary gland tumors other than pleomorphic adenoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1999 Sep;123(9):801-6.

Rangel MC, Silva SD, Castro NP, Valentin MD. Essentials of molecular biology in cancer research. *ACR.* 2008;28(1):2-10.

Rodrigues MAM, Camargo JLV. Carcinogênese. In: Montenegro MR, Franco M, editores. *Patologia processos gerais.* São Paulo: Atheneu; 1999. p.223-40.

Rosenberg A. Ossos, articulações e tumores de partes moles. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, editores. *Robins, patologia estrutural e funcional.* 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.1087-1134.

Schmutz JA, Chaudhry AP. Incidence of induced tumors in the rat submandibular gland with different doses of 7, 12-dimethylbenz-(α)-anthracene. *J Dent Res.* 1969 Nov/Dec;48(6):1316.

Sela J, Azachi C, Levij IS, Ulmansky M. Fibrosarcoma or squamous cell carcinoma of rat parotid after instillation of DMBA into the duct. *J Dent Res.* 1974 Nov/Dec;53(6):1498.

Serpi R. Mechanism of benzo(a)pyrene-induced accumulation of p53 tumor suppressor protein in mouse [dissertação]. Oulu (Finlândia): Faculty of Medicine, University of Oulu; 2003.

Sheehan R, Shklar G. The effect of cyclophosphamide on experimental salivary gland neoplasia. *Cancer Res.* 1972 Feb;32(2):420-25.

Shklar G. Recent advances in experimental oral and salivary gland tumors. *J Oral Surg.* 1970 July;28(7):495-500.

Snyder R, Hong J-Y. Metabolic and biochemical issues in the molecular epidemiology of cancer. In: Buffler P, Rice J, Baan R, Bird M, Boffetta P, editors. *Mechanisms of carcinogenesis, contributions of molecular epidemiology.* Lyon: IARC Scientific Publications; 2004. p.51-69.

Sociedade Brasileira de Patologia. *Manual de Imuno-Istoquímica. Com menções à técnica de hibridização molecular* SBP; 1995.

Soma L, LiVolsi VA, Baloch ZW. Dendritic interstitial and myofibroblastic cells at the border of salivary gland tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Feb;125(2):232-6.

Staffieri C. et al. Carcinosarcoma de novo of the parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Aug;104(2):e35-40.

Standish SM. Early histologic changes in induced tumors of the submaxillary salivary glands of the rat. *Am J Pathol.* 1957 Jul-Aug;33(4):671-89.

Stojadinovic S, Reinert S, Philippou St TS, Machtens E. Carcinosarcoma of the mandibular mucosa: the first report. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Aug;31(4):444-7.

Sumitomo S, Hashimura K, Mori M. Growth pattern of experimental squamous cell carcinoma in rat submandibular glands – an immunohistochemical evaluation. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996 Mar;32B(2):97-105.

Takahashi M, Okamiya H. Tumours of the oral cavity, buccal pouch, oesophagus, forestomach and salivary glands. In: Turusov V, Mohr U. Pathology of tumours in laboratory animals, volume III - tumors of the hamster. Lyon: IARC Scientific Publications; 1996. Cap. 3, p.59-77.

Takai Y, Hyun KH, Murase N, Hosaka M, Mori M. Histopathologic studies of DMBA-induced mouse submandibular-gland tumors with or without cryoprobe treatment. *J Oral Pathol.* 1984 Aug;13(4):419-28.

Takai Y, Murase N, Hosaka M, Kawamura K, Mori M. Immunohistochemical localization of keratin in experimental carcinoma of the mouse submandibular gland. *J Oral Pathol.* 1986 Jan;15(1):5-10.

Takeuchi J, Miura K, Usizima H, Katoh Y. Histological changes in the submandibular glands of rats after intraductal injection of chemical carcinogens. *Acta Pathol Jpn.* 1975 Jan;25(1):1-13.

Ten Cate AR. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.

Thompson LDR, Fanburg-Smith JC. Malignant soft tissue tumors. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (editors). *Pathology and genetics, head and neck tumours.* Lyon: IARC Press; 2005. p.35-42.

Tsujimoto H, Yura Y, Yoshioka Y, Kusaka J, Yoshida H, Sato M. Effect of epidermal growth factor administration on the development of mouse salivary gland carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1999 Jan;28(1):30-6.

Turbiner S, Shklar G. Variations in experimental carcinogenesis of submandibular gland in three strains of rats. *Acta Oral Biol.* 1969 Sept;14(9):1065-71.

Vainio H, Magee P, McGregor D, McMichael AJ. Consensus report. In: Vainio H, Magee P, McGregor D, McMichael AJ, editors. *Mechanisms of carcinogenesis in risk identification.* Lyon: IARC Press; 1992. p. 8-54.

Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncol.* 2007 Nov;43(10):999-1006.

Völker HU, Mühlmeier G, Maier H, Kraft K, Müller-Hermelink HK, Zettl A. True malignant mixed tumor (carcinosarcoma) of submandibular gland – a rare neoplasm of monoclonal origin?. *Histopathology.* 2007;50:795-798.

Weisburger EK. General principles of chemical carcinogenesis. In: Waalkes MP, WARD JM, editors. *Carcinogenesis.* New York: Raven Press; 1994. p.1-23.

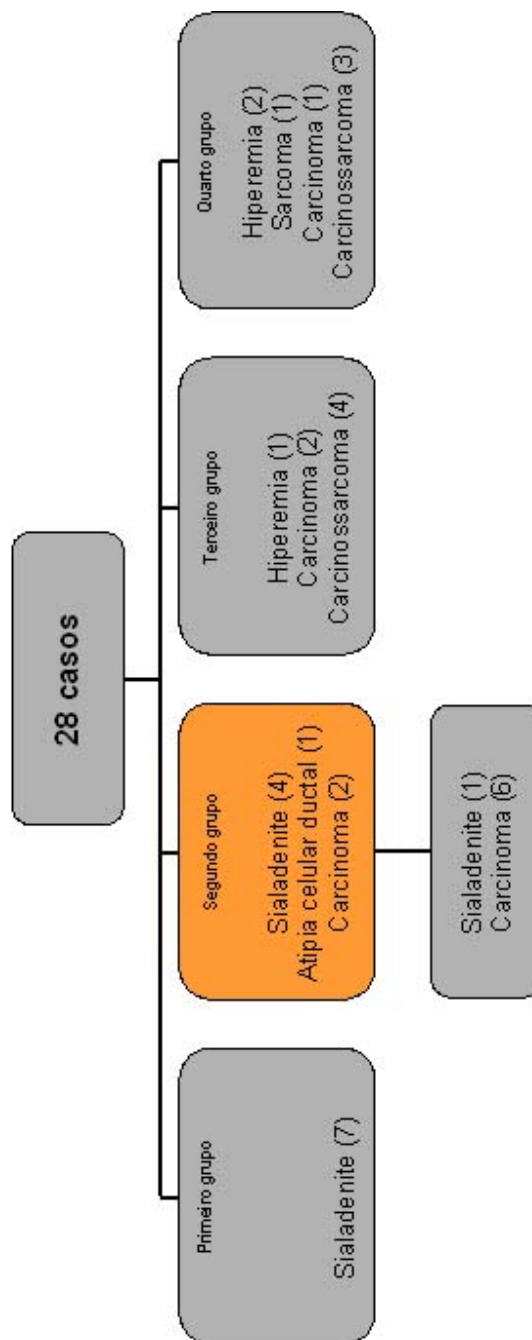
Wigley CB, Carbonell AW. The target cell in the chemical induction of carcinomas in mouse submandibular gland. *Europ J Cancer.* 1976 Sep;12(9):737-41.

Woolf N. *Pathology, basic and systemic.* London: W.B. Saunders, 1998. 1281 p.

Yamagiwa K, Ichikawa K. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *CA Cancer J Clin.* 1977 May-Jun;27(3):174-81.

Zaman A. et al. Induction of adenocarcinomas in the submandibular salivary glands of female Wistar rats treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Archs Oral Biol.* 1996 Feb;41(2):221-224.

Apêndice A – Diagnóstico final em cinza. Em laranja, resultado alterado.



Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax. (12) 3947-9010 / aigotti@fosjo.unesp.br / Oncodas@fosjo.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **20/2007-PA/CEP**, sobre **“Imunofenotipagem de lesões obtidas em carcinogênese quimicamente induzida por DMBA, em glândulas submandibulares de ratos (rattus norvegicus)**, sob responsabilidade de **PIETRO MAINENTI**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de junho de 2007.

Prof. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora do CEP/ANIMAIS/FOSJC

Mainenti P. Immunophenotyping of the lesions after DMBA chemical carcinogenesis in rat's (Rattus norvegicus) submandibular salivary gland [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

The chemical carcinogenesis, addressed to animal salivary gland, is not a novel research. The use of DMBA in rat's submandibular salivary gland is known to produce neoplasms like sarcomas and carcinomas either intermingled or not. Despite of the good amount of information regarding DMBA carcinogenesis histopathology in rat's submandibular parenchyma, little is known about the immunohistochemistry in such tumors. We proposed a revision of a previous research conducted by Mainenti (2006), in attempt to better understand the neoplasm formation after DMBA. The original experiment disclosed non neoplastic lesions, mainly sialadenitis, and tumors like carcinomas, carcinosarcomas and one case of sarcoma. The present work used all the material from the first research like surgical specimens in formol and slides. We compared the previous hematoxylin and eosin slides with new ones. We also used Gomori's trichrome in order to disclose collagen fibers. The immunohistochemistry was performed using the following antibodies: AE1/AE3, vimentin, α -SMA, calponin, desmin, myogenin, S-100, CerbB-2 and EMA. Some previous lesions, presented as benign ones, were diagnosed as carcinomas. The immunohistochemistry was positive as shown: AE1/AE3 for epithelial neoplasm, vimentin for connective tissue in mesenchymal tumors, α -SMA and calponin for scarce pleomorphic fusiform cells in the stroma of the carcinomas and in the mesenchymal neoplasms. We concluded that the immunohistochemistry strongly suggested myofibroblast differentiation in the stroma of the carcinomas and myofibroblast cells related to the fibrosarcoma and carcinosarcomas. These cells

produced collagen shown after Gomori's trichrome. The epithelial neoplasm component was suggested as derived from luminal cells.

Keywords: Carcinogenesis. DMBA. Salivary gland. Neoplasms. Immunohistochemistry. Myofibroblasts.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)