

ANA CLÁUDIA GARCIA ROSA

**IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO
EPIDERMAL NO CARCINOMA EX ADENOMA PLEOMÓRFICO**

CAMPINAS
2008

ANA CLÁUDIA GARCIA ROSA

**IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO
EPIDERMAL NO CARCINOMA EX ADENOMA PLEOMÓRFICO**

Dissertação apresentada ao Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo

CAMPINAS
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

R788i Rosa, Ana Claudia Garcia.
Imunoexpressão do receptor de fator de crescimento epidermal no carcinoma ex adenoma pleomórfico / Ana Claudia Garcia Rosa. – Campinas: [s.n.], 2008.
78f.: il.

Orientador: Vera Cavalcanti de Araújo.
Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. Imunoistoquímica. 2. Adenoma pleomorfo. 3. Carcinoma. 4. Patologia bucal. I. Araújo, Vera Cavalcanti de. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO
C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC

Folha de Aprovação

A dissertação intitulada: **“IMUNOEXPRESSÃO DO RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL NO CARCINOMA EX ADENOMA PLEOMÓRFICO”** apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: Patologia Bucal em __/__/__, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

Prof. (a) Dr (a)
Orientador

Prof. (a) Dr (a)
1º Membro

Prof. (a) Dr (a)
2º Membro

Para meu avô Pedro, com saudades.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Cris, pela paciência e por ter me esperado tantas vezes no aeroporto. Cada semana longe de você trazia muita saudade.

Aos meus pais. Vocês foram minha inspiração. Obrigada pelas inúmeras visitas em Campinas e pela companhia nos finais de semana.

Aos professores, funcionários, amigos e colegas que contribuíram para a execução deste trabalho. Cada momento que passamos juntos e cada palavra de incentivo serão sempre lembrados com muito carinho.

Obrigada Dra. Vera, pela orientação em minha busca por crescimento pessoal.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) no carcinoma ex adenoma pleomórfico (CXAP) de glândulas salivares pelo método imunoistoquímico, avaliando a possível relação da expressão do EGFR na transformação maligna do AP. Foram analisados 16 casos de CXAP em diferentes graus de invasão: intracapsular, minimamente invasivo e francamente invasivo. Adenomas pleomórficos (AP) e AP remanescentes em CXAP foram utilizados como controle. A análise qualitativa foi realizada por dois examinadores independentes. A análise quantitativa foi realizada através da contagem das células nas diferentes áreas tumorais. Para isso, em cada espécime foram contadas, no mínimo, 500 células, em aumento de 400X, obtidas de quatro campos aleatórios, com análise das imagens assistida por computador. Foram registradas as células positivas nas diferentes áreas, incluindo áreas *in situ* e periféricas dos tumores intracapsulares e minimamente invasivos e carcinomas francamente invasivos com componente epitelial e/ ou mioepitelial. Os resultados foram apresentados como porcentagem de células e/ ou núcleos positivos. O EGFR esteve presente no citoplasma e foi observado em alguns núcleos. Os CXAP intracapsulares e minimamente invasivos expressaram o EGFR na maioria das células luminais malignas das áreas *in situ* e da periferia tumoral (70,32% e 81,38%, respectivamente). Nos subtipos francamente invasivos com diferenciação epitelial, a porcentagem de expressão foi 91,61%, tanto nas regiões de blocos como nas regiões de ilhas e ninhos. Nos subtipos invasivos com diferenciação mioepitelial houve expressão do EGFR em 99,69% das células. A imunoexpressão do EGFR aumentou com a evolução tumoral, e mostrou-se um fator importante tanto na transformação maligna do AP como na progressão do CXAP. Sua presença nas áreas periféricas do CXAP nos leva à hipótese de que o receptor esteja envolvido no processo de invasão, o que requer maiores investigações.

Palavras-chave: EGFR. Carcinoma ex adenoma pleomórfico. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

Immunoexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) was investigated along the progression of pleomorphic adenoma (PA) to carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA) using 16 cases of CXPA in different degrees of invasion – intracapsular, minimally and frankly invasive carcinoma. PA without carcinoma and residual PA in CXPA were used as control. To this aim, positive cells in different areas including *in situ* and peripheral areas of both intracapsular and minimally invasive tumors as well as in the frankly invasive carcinoma with only epithelial component and/or myoepithelial component were counted. A minimum of 500 cells at 400X in aleatory fields was counted for each site by the computer-assisted image analysis. Results were presented as percentage of positive stained cells. EGFR was observed in the cytoplasm and it was also present in some nuclei. *In situ* areas of intracapsular and minimally invasive types showed strong expression of EGFR in almost all malignant luminal cells. In the peripheral areas, EGFR was present in the greater number of cells (70.32% and 81.38%, respectively). In frankly invasive of the epithelial type, the percentage of positive cells was 91.61%, counted in areas with small nests as well as in large blocks of cells. In frankly invasive type with myoepithelial component, EGFR was observed in 99.69% of cells. In conclusion, the immunohistochemical expression of EGFR increased with tumor evolution, and it seems to be an important factor in both malignant transformation of AP as well as in tumor progression. Its presence in the focal areas in the periphery of the tumors leads us to the hypothesis that it is involved in the invasive process, which deserves further investigation.

Keywords: EGFR. Carcinoma ex pleomorphic adenoma. Immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Glândulas salivares	12
2.2 Tumorigênese das glândulas salivares	13
2.2.1 Adenoma pleomórfico (AP)	13
2.2.1.1 Aspectos histológicos	14
2.2.1.2 Perfil imunológico	15
2.2.2 Carcinoma ex- Adenoma Pleomórfico (CXAP)	16
2.2.2.1 Histogênese	17
2.2.2.2 Aspectos histológicos	18
2.2.2.3 CXAP intracapsular ou minimamente invasivo.....	18
2.2.2.4 CXAP francamente invasivo.....	20
2.2.2.5 Diferenciação epitelial e/ou mioepitelial do CXAP invasivo	21
2.2.2.6 Perfil imunológico e prognóstico.....	22
2.3 Receptor de fator de crescimento Epidermal (EGFR)	24
2.3.1 Imunoexpressão do EGFR nas neoplasias	30
2.3.1.1 Tumores sólidos.....	31
2.3.1.2 Carcinomas de mama	35
2.3.2 EGFR e tumores de glândulas salivares	38
2.3.3 EGFR como alvo molecular terapêutico	41
3 PROPOSIÇÃO	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Seleção e classificação dos tumores	45
4.2 Imunoistoquímica.....	47
4.3 Análise dos cortes histológicos	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Glândulas salivares normais.....	52
5.2 Adenoma pleomórfico.....	52
5.3 Adenoma pleomórfico remanescente em CXAP	53
5.4 CXAP com componente epitelial	53
5.4.1 Intracapsular e minimamente invasivo.....	53

5.4.2 Francamente invasivo.....	53
5.5 CXAP com componente mioepitelial	54
5.5.1 Francamente invasivo.....	54
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A - CXAP	74
ANEXO A - DISPENSA DO COMITE DE ETICA EM PESQUISA.....	78

1 INTRODUÇÃO

O *Adenoma Pleomórfico* (AP) é uma neoplasia benigna de glândulas salivares. De acordo com a literatura, o AP é o tumor de glândula salivar mais comum, respondendo por 45 a 74% de todas as neoplasias de glândulas salivares (Eneroth, 1971; Shafer, 1987; Eveson et al., 2005). Caracteriza-se, histologicamente, por células epiteliais e mioepiteliais imersas em uma matriz mucóide, mixóide ou condróide, podendo ou não estar envolto por cápsula fibrosa. Os componentes epiteliais podem formar ductos, cordões ou ilhotas celulares sólidas.

O *carcinoma ex adenoma pleomórfico* (CXAP) corresponde à transformação maligna do AP. Com a transformação maligna, ocorre invasão tecidual, pleomorfismos celulares e mitoses atípicas. Este tumor compreende, aproximadamente, 3,6% de todos os tumores de glândulas salivares, 12% de todas as neoplasias malignas de glândulas salivares e 6,2% de todos os AP (Gnepp et al., 2005).

Os EGFR são os *receptores* da superfície celular para os membros da família dos *fatores de crescimento epidermal* (EGF). Pertencem à família dos receptores ErbB, uma subfamília de quatro tirosino-quinases intimamente relacionadas: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) e HER4 (ErbB-4). São proteínas que possuem ampla ação biológica, entre elas estimulação da síntese de DNA, proliferação, migração e adesão celular (Fallon et al., 1984).

A super- expressão, desregulação ou mutação do EGFR têm sido associadas a diversas neoplasias malignas, como carcinoma de pulmão (Veale et al., 1987; Gorgoulis et al., 1992), carcinoma gástrico (Sugiyama et al., 1989),

carcinoma de mama (DiRenzo et al., 2002; Santini et al., 2002; van der Groep, 2004; Tsuda et al., 2005; Dabbs et al., 2006; Rakha et al., 2006; Talley et al., 2008) e carcinoma epidermóide oral (Diniz-Freitas et al., 2007; Fischer et al., 2008).

Verifica-se que a ativação constitutiva do EGFR nas neoplasias malignas resulta na divisão descontrolada das células. Por isso, o bloqueio de sua atividade nas células tumorais tem sido um dos alvos terapêuticos para o tratamento destas patologias (Harari, 2004; Mendelsohn, Baselga, 2006; Younes et al., 2006; Hamakawa et al., 2008).

Em glândulas salivares, a expressão do EGFR tem sido estudada em diversos tumores, como carcinoma adenóide cístico (Vered et al., 2002), carcinoma mucoepidermóide (Gibbons et al., 2001; Younes et al., 2006; Hoyek-Gebeily et al., 2007; Shang et al., 2008) e adenocarcinoma (Nagao et al., 1998).

Entretanto, até a presente data, foram realizados apenas dois estudos para verificar o papel da imunexpressão do EGFR no CXAP. Nestes estudos, observou-se o aumento significativo da expressão do receptor com a progressão tumoral (Katori et al., 2007; Matsubayashi, Yoshihara, 2007).

Em nosso laboratório, o CXAP mostrou-se um modelo interessante para estudar a transformação maligna de um tumor benigno e para avaliar as modificações das células malignas, bem como as modificações dos tecidos e células adjacentes.

Estudos adicionais para a verificação do papel da imunexpressão do EGFR no CXAP, tanto em relação à proliferação celular como em relação à progressão e invasão tumoral, são importantes para o desenvolvimento de terapias

anti-neoplásicas direcionadas a alvos moleculares nos tumores de glândulas salivares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Glândulas salivares

As glândulas salivares são estruturas responsáveis pela produção de saliva, secreção primariamente envolvida no processo digestivo e na proteção da mucosa. A secreção salivar depende da estimulação aferente (por exemplo, paladar e mastigação) e é controlada pelo sistema nervoso autônomo. Sua composição é 99% de água e 1% de componentes inorgânicos e orgânicos (proteínas, glicoproteínas e enzimas). As glândulas salivares compreendem três pares de glândulas maiores, denominadas parótida, submandibular e sublingual, e numerosas glândulas menores, que se distribuem por quase toda a mucosa que reveste a cavidade bucal e orofaringe, e glândulas similares estão presentes no trato respiratório superior e sino-nasal, além dos seios paranasais (Araújo, Araújo, 1984).

Histologicamente, as glândulas salivares maiores são envolvidas por cápsula fibrosa e consistem em lóbulos separados por septos fibrosos. As glândulas salivares menores possuem a mesma estrutura, com exceção da cápsula. Cada lóbulo forma um agrupamento de ácinos e ductos (Berkovitz et al., 2002).

Os ácinos são formados por células serosas, mucosas ou mistas que excretam saliva para um lúmen central que a conduz aos ductos. Os ductos intercalares dão continuidade ao fluxo, seguindo para os ductos estriados e finalmente para os ductos excretores (Berkovitz et al., 2002).

As células mucosas possuem núcleo basal achatado, com citoplasma claro que contém vacúolos de sialomucina. As células serosas têm formato triangular com núcleo basal e citoplasma rico em grãos de zimogênio densamente

basofílicos que são positivos para a coloração com PAS (do inglês “*periodic acid Schiff*”). Sua secreção principal é a amilase (Berkovitz et al., 2002).

As estruturas acinares e os ductos são envolvidos por células mioepiteliais contráteis, variáveis na morfologia e que contêm actina de músculo liso, miosina e filamentos intermediários, incluindo citoqueratina 14. Estas células possuem longos processos dendríticos que abraçam os ácinos e ductos (Eveson et al., 2005).

O tecido conjuntivo das glândulas salivares contém, além de fibroblastos e colágeno, adipócitos. Com a idade, há uma diminuição no volume das células secretoras e um aumento nos componentes do tecido conjuntivo, especialmente no número de adipócitos (Eveson et al., 2005).

A glândula parótida é quase totalmente serosa, enquanto as glândulas sublinguais e submandibulares são mistas e as menores, mucosas (Eveson et al., 2005).

2.2 Tumorigênese das glândulas salivares

2.2.1 Adenoma pleomórfico (AP)

De acordo com a literatura, o adenoma pleomórfico (AP) é o tumor de glândula salivar mais comum, respondendo por 45 a 74% de todas as neoplasias de glândulas salivares (Eneroth, 1971; Shafer, 1987; Eveson et al., 2005).

A OMS (Eveson et al., 2005) classifica o AP como uma neoplasia benigna de glândulas salivares caracterizada por polimorfismos celulares e arquiteturais.

2.2.1.1 Aspectos histológicos

O AP apresenta grande diversidade histopatológica. Os componentes essenciais do tumor são elementos epiteliais (luminais), mioepiteliais (não-luminais) e mesenquimais (estroma), podendo ou não apresentar cápsula.

As células luminais formam estruturas ductais de tamanhos variáveis circunscritas por uma ou múltiplas camadas de células não-luminais, ou mioepiteliais (Dardick, 1996).

As células mioepiteliais podem ser morfológicamente semelhantes às células luminais ou ter citoplasma claro e núcleos hipercromáticos (Eveson et al., 2005). Podem ser fusiformes, ovais ou plasmocitóides (Dardick, 1996).

A cápsula, quando presente, varia em espessura (Eveson et al., 2005).

Raramente são vistas células mucosas, sebáceas e células serosas acinares, que são geralmente benignas e tipicamente apresentam núcleo vacuolado, sem nucléolo proeminente e com pouca frequência de mitoses (Eveson et al., 2005).

Metaplasia escamosa, às vezes com formação de pérolas de queratina, pode ser vista tanto nos ductos como nos lençóis, e ocasionalmente há metaplasia mucosa com mudança evidente nas células claras (Eveson et al., 2005).

O componente mesenquimal é mucóide, mixóide, cartilaginoso ou hialinizado, e às vezes compõe o maior volume do tumor. Pode haver material cristalóide como cristais de oxalato e formação de tecido ósseo (Eveson et al., 2005).

Nos tumores com inflamação mais extensa e necrose, pode haver aumento nas figuras mitóticas e alguma atipia celular. Além disso, a metaplasia escamosa pode ser confundida com malignidades (Eveson et al., 2005).

Ocasionalmente, células tumorais podem ser vistas dentro de espaços vasculares. Estes estão geralmente dentro do corpo do tumor ou na periferia. Às vezes são vistas nos vasos distantes da maioria da massa tumoral. Entretanto, este achado parece não ter nenhum significado em termos de comportamento tumoral ou risco de metástase (Eveson et al., 2005).

2.2.1.2 Perfil imunológico

Segundo Araújo et al. (2000), as células luminais são positivas para as citoqueratinas (CK) 7, 8, e 19, com expressão variável para CK 14, enquanto as células mioepiteliais neoplásicas expressam CKs ocasionalmente.

As células mioepiteliais neoplásicas co-expressam vimentina e actina α de músculo liso (Araújo et al., 2000), e são variavelmente positivas para proteína S-100, GFAP (*glial fibrillary acid protein*), calponina, CD10 e actina músculo-específica (HHF-35) (Dardick et al., 1992; Dardick, 1996).

A vimentina e a actina α de músculo liso estão presentes nas células mioepiteliais neoplásicas da maioria dos casos de AP, e por isso são marcadores mais confiáveis para estas células nestes tumores, segundo Araújo et al. (2000).

2.2.2 Carcinoma ex- Adenoma Pleomórfico (CXAP)

O carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) é o neoplasma mais comum dentro da categoria de tumores malignos mistos. Caracteriza-se por uma neoplasia epitelial maligna, na qual porções de AP são identificáveis. Também pode ser denominado carcinoma ex-tumor misto, carcinoma em tumor misto ou carcinoma iniciando em um tumor misto (Seifert et al., 1992; Gnepp, 1993).

O componente maligno pode apresentar as características histológicas de adenocarcinoma, carcinoma escamoso, mistura de ambos ou carcinoma indiferenciado (Spiro et al., 1977; Tortoledo et al., 1984; Gnepp, 1993). O diagnóstico de um CXAP depende da identificação da combinação de invasão, mitoses atípicas e pleomorfismo celular e nuclear compatível com malignidade (Dardick, 1996). As atipias celulares e o aumento na atividade mitótica das células podem ser observados nos componentes luminais, não- luminais ou ambos, sendo este o diagnóstico diferencial do AP (Dardick, 1996).

O CXAP compreende, aproximadamente, 3,6% de todos os tumores de glândulas salivares, 12% de todas as malignidades salivares e 6,2% de todos AP (Gnepp et al., 2005).

Segundo a OMS (Gnepp et al., 2005), a distinção entre tumores não invasivos e invasivos é baseada na invasão destrutiva do componente carcinomatoso através da cápsula dentro dos tecidos peritumorais.

De acordo com Brandwein et al. (1996), o CXAP é classificado histologicamente em: intracapsular, minimamente invasivo ($\leq 1,5$ mm de invasão extra-capsular) e invasivo ($\geq 1,5$ mm de invasão extra-capsular).

Ainda, conforme Altemani et al. (2005), os CXAP podem ser classificados em carcinomas com diferenciação epitelial e carcinomas com diferenciação epitelial e/ou mioepitelial, dependendo do tipo celular predominante. Tumores com diferenciação epitelial e/ ou mioepitelial são observados nos subtipos invasivos.

2.2.2.1 Histogênese

O CXAP evolui histologicamente a partir de um carcinoma não invasivo (carcinoma *in situ*) em um AP ou de um AP com severas mudanças displásicas. As mudanças consistem tipicamente em células tumorais substituindo a camada epitelial interna do ducto normal, deixando a camada mioepitelial externa intacta (Gnepp et al., 2005).

Na fase inicial, células carcinomatosas com núcleos grandes e atípicos substituem as células ductais lumbais neoplásicas benignas, enquanto são retidas por uma camada intacta de células mioepiteliais não atípicas do AP pré-existente. Isto pode ser considerado um carcinoma *in situ* e não existe potencial metastásico (Cheuk, Chan, 2007).

Com o tempo, as células carcinomatosas rompem a camada mioepitelial neoplásica benigna e invadem o estroma ao redor. Se este processo ainda está confinado ao AP que o originou, o carcinoma é considerado intracapsular. O prognóstico é excelente com a excisão completa (Cheuk, Chan, 2007).

Se a invasão se estender além da cápsula fibrosa do AP que o originou, o CXAP é considerado invasivo. Entretanto, ele também deve ser categorizado como “minimamente invasivo” e “francamente invasivo” (Cheuk, Chan, 2007).

Na maioria dos casos (75%) as células epiteliais luminais sofrem transformação maligna. Em outros casos (19%), o carcinoma mostra tanto diferenciação epitelial como mioepitelial, ou puramente diferenciação mioepitelial (6% dos casos) (Altemani et al., 2005).

2.2.2.2 Aspectos histológicos

Microscopicamente, a proporção de componentes benignos ou malignos pode variar. O componente maligno pode ser um adenocarcinoma pobremente diferenciado (tipo carcinoma do ducto salivar) ou um carcinoma indiferenciado, entretanto qualquer forma de carcinoma pode ser encontrada. Desta forma, um padrão de crescimento infiltrativo destrutivo é o critério mais confiável de diagnóstico (Gnepp et al., 2005).

O componente epitelial apresenta hiper cromasia nuclear, mitoses e pleomorfismos freqüentes, embora alguns tumores apresentem atipia mínima. Esta última característica determina a gradação do tumor e está correlacionada ao prognóstico (Gnepp et al., 2005).

2.2.2.3 CXAP intracapsular ou minimamente invasivo

São tumores circunscritos ou encapsulados com alguns componentes definíveis do AP, além do componente epitelial maligno.

Histologicamente, os intracapsulares apresentam-se como AP com componentes malignos totalmente encapsulados, e se não encapsulados, ainda

dentro do limite externo do AP; já os minimamente invasivos excedem além do AP original ou cápsula em até 1,5 mm (Dardick, 1996).

Estes tumores podem apresentar três áreas histologicamente distintas: áreas de AP remanescente (semelhantes ao tumor de origem), áreas de carcinoma intraductal e áreas de carcinoma (Altemani et al., 2005).

As áreas com carcinomas intraductais apresentam estruturas compostas por células não- luminais (mioepiteliais) e células luminais (epiteliais) malignamente transformadas. As células mioepiteliais são remanescentes das estruturas ductais do AP, e formam uma camada intacta localizada entre as células luminais e a lâmina basal. Nos ductos maiores, preenchidos por células carcinomatosas, as células mioepiteliais aparecem comprimidas e, em alguns casos, desaparecem (Altemani et al., 2005).

As áreas de carcinoma são compostas por blocos ou ilhas de células epiteliais sem o mioepitélio remanescente. As células epiteliais são poligonais, com citoplasma eosinofílico extenso, núcleo centralizado e nucléolos proeminentes. Pode ser observado pleomorfismo nuclear variando de moderado a intenso, além de mitoses freqüentes e focos de necrose. As células malignas têm origem em um carcinoma ou adenocarcinoma com padrão de crescimento glandular ou papilar (Altemani et al., 2005).

Entremeando o componente epitelial atípico pode haver estroma relativamente acelular, hialino ou mixóide. Nódulos satélites de tumor podem estar presentes dentro da cápsula ou fora dela. Raramente observa-se calcificação (Dardick et al., 1996).

Em 2006, Araújo et al. estudaram a participação das células mioepiteliais benignas nas áreas intraductais de CXAPs. Para isso, investigaram o perfil imunohistoquímico destas células em quatro casos de CXAP e compararam às células mioepiteliais das estruturas semelhantes a ductos no AP residual. O painel de anticorpos utilizados na reação imunohistoquímica (CK14, actina de músculo liso, calponina, p63, CD10 e D2-40, laminina e maspin), mostrou expressão mais acentuada nas células mioepiteliais envolvendo as células luminiais malignas do CXAP do que nas células mioepiteliais das estruturas semelhantes a ductos no AP, revelando que no processo de transformação maligna, as células mioepiteliais benignas tornam-se diferenciadas e produzem proteínas importantes relacionadas à função de supressão tumoral.

2.2.2.4 CXAP francamente invasivo

Histologicamente, o CXAP francamente invasivo estende-se mais de 1,5 mm além da cápsula ou limite externo do tumor. Não é circunscrito e apresenta margens infiltrativas. Apresenta alguma evidência presente do AP que o originou, mas a proporção entre os componentes benignos e malignos varia consideravelmente (Dardick, 1996).

Os CXAP francamente invasivos podem ser de origem epitelial, mioepitelial ou mistura de ambos (Altemani et al., 2005).

Os elementos epiteliais malignos variam em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma indiferenciado, ou mistura destes subtipos. Os padrões de crescimento do adenocarcinoma podem ser glândulo-ductais, papilares ou pobremente diferenciados (Dardick, 1996; Altemani et al., 2005).

A infiltração através da cápsula por mais de 8 mm envolve as glândulas salivares e tecidos moles adjacentes, e neste estágio o tumor apresenta prognóstico pobre. É comum a invasão perineural e perivascular, podendo haver também necrose e hemorragia (Dardick, 1996).

2.2.2.5 Diferenciação epitelial e/ou mioepitelial do CXAP invasivo

Altemani et al. (2005) aplicaram um painel de anticorpos contra proteínas do citoesqueleto (CK7, 8, 14, 13 e 19, vimentina e actina de músculo liso) em 16 casos de CXPA (cinco intra-capsulares, quatro minimamente invasivos, sete francamente invasivos) para caracterizar quais componentes celulares do AP sofrem transformação maligna. O resultado obtido pela aplicação do painel de anticorpos permitiu a separação dos CXAPs francamente invasivos em dois grupos menores: carcinomas com diferenciação epitelial (75% dos casos) e carcinomas com diferenciação mioepitelial (25% dos casos). Nos CXAPs com diferenciação epitelial, células luminais malignas aparecem nas estruturas semelhantes a ductos como carcinoma intraductal. Os carcinomas com diferenciação mioepitelial (não-luminal) foram compostos na maioria ou quase exclusivamente por células que expressaram vimentina e menos freqüentemente, actina de músculo liso, e neste grupo não foram identificadas estruturas ductais remanescentes do AP preenchidas por células luminais malignas.

O grau de angiogênese e a área vascular total também apresentam padrões distintos no CXPA com ou sem diferenciação mioepitelial. Pobre vascularização associada a uma maior distribuição microvascular é característica do CXPA com diferenciação mioepitelial (Soares et al., 2007).

2.2.2.6 Perfil imunológico e prognóstico

Rosa et al. (1996) avaliaram a expressão imunoistoquímica da oncoproteína c-erbB-2 em 16 casos de CXPA. A expressão de membrana para a c-erbB-2 foi encontrada em 21,1% de todos os casos, todos correspondentes às áreas com adenocarcinomas de alto grau, enquanto áreas carcinomatosas de baixo grau e AP apresentaram-se sem expressão. Os autores concluíram que o acúmulo da proteína c-erbB-2 está associada à aquisição de um fenótipo maligno no CXPA.

Lewis et al. (2001) avaliaram retrospectivamente 73 casos de CXPA de glândulas salivares maiores pela análise imunoistoquímica de queratinas (AE1/AE3, CK7, CK20), antígeno epitelial de membrana (EMA), antígeno carcino-embriônico (CEA), vimentina, actina, proteína S-100, GFAP e oncoproteínas p53 e c-erbB-2; com o objetivo de descrever as características patológicas e identificar potenciais fatores de prognóstico. A expressão resultante foi positiva para AE1/AE3 em 97% dos casos, CK7 em 94%, EMA em 86%, CEA em 75%, vimentina em 52%, proteína S-100 em 29% e oncoproteínas p53 e c-erbB-2 em 41% e 30% dos carcinomas, respectivamente. Nenhuma oncoproteína foi associada com a diminuição da sobrevivência, entretanto os autores sugerem que o CXAP intra-capsular apresenta bom curso clínico e que fatores de prognóstico no CXAP incluem estágio tumoral, grau, proporção do carcinoma, extensão da invasão e índice de proliferação.

Félix et al. (2004) avaliaram a imunoexpressão da tenascina, proteína da matriz extracelular relacionada à morfogênese tumoral, bem como invasão local e comportamento metastático, em 20 casos de CXAP e 63 casos de AP. A expressão da tenascina foi significativamente menor no AP (25%) quando comparada aos componentes benignos e malignos do CXAP (75% e 90%, respectivamente). Nos CXAPs, houve diferença significativa na frequência de depósitos de tenascina ao

redor das células neoplásicas dos tumores que sofreram metástase (73%) e dos que não sofreram metástase (0%). Os autores concluíram que a deposição de tenascina está envolvida nos mecanismos de transformação maligna dos AP em CXAP, assim como está relacionada com a progressão clínica da doença.

Araújo et al. (2008) avaliaram a expressão imunohistoquímica da tenascina e da fibronectina em 17 casos de CXAP, classificados de acordo com a presença de células epiteliais e mioepiteliais e grau de invasão (intracapsular, minimamente e francamente invasivo). Tanto a tenascina como a fibronectina expressaram em todos os casos de CXAP, entretanto, a fibronectina foi fortemente expressa nos carcinomas do subtipo epitelial, enquanto a tenascina nos carcinomas do subtipo mioepitelial. A tenascina também expressa em algumas áreas da borda dos tumores do subtipo intracapsular e minimamente invasivo, o que poderia representar a real frente de invasão destes tumores.

Furuse et al. (2008) demonstraram que, nos CXAP do subtipo francamente invasivos com componente epitelial e/ou mioepitelial, a expressão de HGFA (*fator de crescimento de hepatócitos*), uma citocina envolvida em diversos processos biológicos como migração, proliferação celular e angiogênese, foi negativa em todas as células.

Também foi demonstrado que na periferia CXAP alguns pequenos grupos de células perderam positividade para o PDGF (*fator de crescimento derivado de plaquetas*), embora a expressão de PDGF e seu receptor tenham aumentado com o grau de malignidade (Demasi et al., *in press*).

2.3 Receptor de fator de crescimento Epidermal (EGFR)

Os fatores de crescimento epidermal, do inglês “*Epidermal Growth Factor*” (EGF), foram primeiramente descritos por Cohen em 1961 (Cohen, 1962), e são proteínas regulatórias essenciais para a sobrevivência celular. Normalmente, desempenham papéis importantes no controle do crescimento, proliferação e diferenciação das células tanto de origem ectodérmica como mesenquimal (Jorissen et al., 2003; Henson, Gibson, 2006). Estruturalmente, o EGF humano é uma proteína com peso molecular de 6045 Da formada por 53 aminoácidos residuais (Carpenter, Cohen, 1990).

O receptor de fator de crescimento epidermal (do inglês, “*Epidermal Growth Factor Receptor*”, ou EGFR, ErbB-1, HER) é o receptor de vários membros das proteínas ligantes da família EGF. É uma glicoproteína de membrana plasmática de peso molecular 170-kDa (Singh, Harris, 2005), e o gene que codifica esta proteína localiza-se na região p12 do cromossomo 7.

Os primeiros estudos sobre a existência de um receptor específico para o EGF na superfície da célula ocorreram na década de 70, quando Fimiani et al. (1973) avaliaram as características da ligação do EGF a membranas plasmáticas purificadas do epitélio de córnea bovina. Na mesma época, O'Keefe et al. (1974) observaram um sítio de ligação específico para o EGF nas membranas celulares do fígado e da placenta de ratos. Em seguida, Hollenberg & Gregory (1977) observaram que tanto o EGF humano como de ratos compartilhavam um sítio receptor comum em fibroblastos humanos cultivados. Pela primeira vez, descreveu-se o EGFR como uma proteína de membrana receptora do EGF, em células de ratos (Das et al., 1977). No ano seguinte, Lee & Weinstein (1978) verificaram que alguns ésteres promotores de tumores inibiam a ligação do EGF aos receptores celulares. Em 1979,

Fox & Das já sugeriam que a internalização e o processamento do EGFR em fibroblastos cultivados induziam a síntese de DNA (Das, Fox, 1978; Fox, Das, 1979). Enquanto isso, Linsley et al. (1979) caracterizaram a ligação direta do EGF a seu receptor. Em 1980, Cohen et al. isolaram e purificaram o EGFR, e três anos depois Carpenter (1983) caracterizava a atividade tirosino-quinase do EGFR induzida pela ligação ao EGF, enquanto Schreiber et al. (1983) investigavam seu papel biológico na transdução do sinal.

O EGFR faz parte da família de receptores ErbB/HER, composta por quatro receptores de tirosino-quinases (RTKs) intimamente relacionados: EGFR (ErbB-1), HER-2/*c-neu* (ErbB-2), HER-3 (ErbB-3) e HER-4 (ErbB-4). Enquanto o EGFR e o ErbB-2 são expressos em uma grande variedade de células, a expressão do ErbB-3 é restrita às células de origem epitelial ou neuroectodermal. Os quatro membros desta família são normalmente co-expressos em vários tecidos, exceto o sistema hematopoiético (Yarden et al., 2001).

Os ligantes de mamíferos que podem ativar o EGFR na superfície celular incluem: EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*), HB-EGF (*Heparin-binding EGF*), AR (*Amphiregulin*), BTC (*Betacellulin*), EPR (*Epiregulin*) e EPG (*Epigen*) (Singh, Harris, 2005).

O papel da ativação do EGFR na proliferação celular, migração, apoptose, diferenciação e desdiferenciação foi demonstrado por estudos *in vitro* utilizando a administração exógena de ligantes do EGFR, incluindo EGF, TGF- α e HB-EGF (Carpenter, Cohen, 1990; Alroy, Yarden, 1997). Cada ligante do EGFR é capaz de estimular a ativação autócrina/parácrina do receptor estimulando atividades biológicas distintas. Bioquimicamente, a expressão da família dos ligantes EGF varia

entre os tecidos e também entre diferentes células do mesmo tecido (Todaro et al., 1980; Singh, Harris, 2005).

Tanto o EGF como o TGF- α extracelulares ligam-se com alta afinidade ao EGFR na superfície celular estimulando a atividade de proteína tirosino-quinase do receptor, que inicia uma cascata de transdução do sinal resultando em uma série de mudanças bioquímicas dentro da célula, como aumento nos níveis de cálcio intracelular, glicólise, síntese protéica e expressão de certos genes. Estas mudanças resultam em síntese de DNA e proliferação celular (Fallon et al., 1984).

O EGFR também interage com seus três homólogos conhecidos, ErbB-2, ErbB-3 e ErbB-4 formando heterodímeros (Carpenter, Cohen, 1990), sendo o ErbB-2 o parceiro preferencial de interação com o EGFR para a formação de heterodímeros (Graus-Porta, 1997). Heterooligômeros envolvendo o EGFR e outros receptores da superfície celular, como os complexos EGFR e fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês "*platelet-derived growth factor*", ou PDGF) também foram observados (Lee et al., 2002). Existem ainda evidências que sugerem a formação de grupos de EGFR ligante-ativados, embora não se saiba se o agrupamento é importante para a auto-ativação ou se ocorre como consequência da ativação dos dímeros individuais (Oda et al., 2005).

A molécula EGFR contém três regiões: uma extracelular, que contém o domínio de ligação para a proteína ligante, uma pequena região trans-membrana e uma região intracelular, que contém o domínio C- terminal de ligação com múltiplos sítios de fosforilação (Wells, 1999).

A região extracelular é composta por quatro subdomínios (L1, CR1, L2 e CR2) envolvidos na adesão do ligante ao receptor, dimerização e interações do

EGFR com outras proteínas de membrana (Ogiso et al., 2002). A união do ligante ao receptor ocorre nos domínios L1 e L2; e o maior domínio de ligação do EGFR ao EGF e TGF- α parece ser o L2, embora as porções N-terminais do EGF e TGF- α liguem-se ao domínio L1 do receptor. Os domínios CR1 e CR2, regiões ricas em cisteína, consistem em um número de pequenas moléculas unidas aparentemente por uma ou duas pontes dissulfeto, e o grande *loop* do domínio CR1 faz contato com o domínio CR1 do EGFR homólogo, e também contatos menores com os domínios L1 e L2 (Ogiso et al., 2002). Esta interface participa na formação dos dímeros fisiologicamente ativos na superfície celular. As demais regiões do domínio extracelular mediam as interações com outras proteínas de membrana (Singh, Harris, 2005).

A pequena região trans-membrana separa o domínio extracelular da região citoplasmática e serve como um sítio de atenuação de *feedback* pelas PKC (proteína-quinases C) e quinases erkMAP (quinase regulada pelo sinal extracelular, proteína-quinase ativada por mitógenos) (Wells, 1999; Singh, Harris, 2005).

A porção intracelular C-terminal do EGFR contém o domínio tirosino-quinase, cuja fosforilação modula a transdução do sinal, sendo formada por: cinco motivos de auto-fosforilação (resíduos de tirosina Y992, Y1068, Y1086, Y1148, Y1173), que se liga a proteínas contendo os domínios SH2 ou PTB (ligante de fosfo-tirosina); três motivos de internalização (aminoácidos 973, 966 e 1149), que compreendem uma volta curta; e sítios de trans-fosforilação, ativação proteolítica e degradação (sítio de clivagem da calpaína) (Carpenter, Cohen, 1990; Wells, 1999; Singh, Harris, 2005).

Estudos sugerem que a porção C-terminal também funciona como um substrato auto-inibitório, e que a deleção da porção citoplasmática ou mutação dos

sítios de auto-fosforilação torna o EGFR ligante-ativado incapaz de fosforilar os substratos cadeia abaixo (Bertics et al., 1988; Helin et al., 1991).

Ativado, o EGFR sofre transição da forma monomérica inativa para formar um homo/ heterodímero ativo, embora haja evidências de que dímeros ativos pré-formados possam existir antes da união do EGFR ao ligante (Oda et al., 2005). A dimerização do complexo EGFR estimula sua atividade tirosino-quinase intrínseca, e como resultado, ocorre auto-fosforilação dos cinco resíduos de tirosina (Y992, Y1068, Y1086, Y1148 e Y1173) na porção C-terminal do receptor e internalização celular (endocitose) do complexo ligante/EGFR. A auto-fosforilação e internalização promovem a ativação de uma cascata de proteínas sinalizadoras que se associam às tirosinas fosforiladas através de seus domínios SH2. A cascata de proteínas sinalizadoras desencadeadas pelo EGFR inclui as seguintes proteínas: fosfolipase C-g (Thomas et al., 2003), proteína Ras (Alroy, Yarden, 1997) e outras pequenas GTPases da família Ras, como a Rho e Rac, proteínas STAT (do inglês, "*signal transducer and activator of transcription*", ou transdutor do sinal e ativador de transcrição) (David et al., 1996), proteína G, proteíno-quinases PI3 e fosfolipase D e a tirosino-quinase Src (Hackel et al., 1999). Como consequência, esta cadeia de proteínas ativadas inicia a transdução do sinal via mecanismos MAPK, AKT e JNK, levando à síntese de DNA no núcleo e proliferação celular (Oda et al., 2005).

Em síntese, a união ao ligante induz a atividade quinase do EGFR seguida pela internalização do complexo ligante-receptor e transdução do sinal. Dentro dos compartimentos celulares com ambiente ácido, o destino do EGFR é decidido pelas propriedades do respectivo ligante: enquanto o ligante EGF permanece unido e direciona o complexo EGF/EGFR para a degradação, o ligante TGF- α dissocia-se e o receptor é reciclado (Singh, Harris, 2005).

Evidências recentes sugerem um novo modo de sinalização do EGFR, no qual o EGFR ativado sofre translocação nuclear mediando outros processos celulares, como regulação da expressão gênica. Esta rota de sinalização é distinta do mecanismo bem caracterizado que envolve a transdução dos sinais mitogênicos através da sinalização de múltiplas cascatas de proteínas. A atividade transcricional do EGFR nuclear parece depender da transativação de seu domínio C-terminal e de sua interação física e funcional com outros fatores de transcrição que contêm atividade de ligação com o DNA (Lo, Hung, 2006).

As respostas biológicas integradas à sinalização pelo EGFR são pleiotrópicas, incluindo mitogênese ou apoptose, aumento na mobilidade celular, secreção de proteínas, diferenciação ou desdiferenciação (Singh, Harris, 2005).

O EGFR contribui primariamente para o desenvolvimento epitelial, enquanto os outros receptores ErbB regulam a formação de outros tecidos, incluindo tecidos neurais e musculares esqueléticos (Miettinen et al., 1995; Sibilía et al., 1998).

O EGFR é normalmente expresso nas células não-neoplásicas, mas pode estar super-expresso nas células cancerígenas. Tanto as mutações, como a super-expressão ou amplificação gênica do EGFR são encontradas em diversos tumores humanos como cânceres de mama, cabeça e pescoço e pulmão, com incidência particularmente alta em tumores cerebrais de origem glial (Rasheed et al., 1999).

O mecanismo de sinalização nuclear do EGFR tem sido associado à maioria das características dos tumores mais agressivos, como aumento no potencial de proliferação, síntese de óxido nítrico e acelerada progressão na fase G1/S do ciclo celular (Lo, Hung, 2006). Na literatura, alguns autores relacionam a expressão nuclear do EGFR ao prognóstico dos pacientes com carcinoma de mama

(Lo et al., 2005) e carcinoma epidermóide de orofaringe (Psyrrri et al., 2005), entretanto, muitos aspectos deste mecanismo de sinalização ainda não foram definidos.

2.3.1 Imunoexpressão do EGFR nas neoplasias

Na década de 80 foram realizados os primeiros estudos relacionando a expressão do EGFR à carcinogênese, quando este foi observado em vários tumores (Gusterson et al., 1984), entre eles carcinoma de células escamosas do pulmão (Hendler, Ozzane, 1984), glioblastomas (Libermann et al., 1985) e carcinomas de mama (Sainsbury et al., 1985).

A expressão e amplificação do gene EGFR também foi observada em células A431, derivadas e cultivadas de carcinomas epidermóides humanos (Merlino et al., 1984; Xu et al., 1984; Merlino et al., 1985).

A partir daí, surgiram vários trabalhos associando a técnica imunoistoquímica para a avaliação da expressão do EGFR em neoplasias como sarcomas (Gusterson et al., 1985), carcinomas de pulmão (Veale et al., 1987; Gorgoulis et al., 1992), carcinomas de mama (Wrba et al., 1988; Lewis et al., 1990), carcinoma epidermóide oral (Partridge et al., 1988), meningiomas (Shiurba et al., 1988), carcinoma gástrico (Sugiyama et al., 1989), carcinoma de esôfago (Mukaida et al., 1990), carcinoma colorretal (Moorghen et al., 1990), etc.

O primeiro trabalho avaliando a expressão imunoistoquímica do EGFR em glândulas salivares ocorreu em 1989 (Yamada et al., 1989). Posteriormente, surgiram trabalhos na década de 90 e atualmente diversos estudos têm sido feitos

para elucidar o papel da imunexpressão do EGFR na tumorigênese das glândulas salivares.

O desenvolvimento de reagentes sensíveis e sistemas de detecção, junto à introdução da recuperação antigênica induzida por temperatura específica, fazem da imunistoquímica uma técnica indispensável nos exames histológicos de rotina, contribuindo para o diagnóstico, prognóstico e tratamento das diferentes lesões (Leong, Leong, 2006). As recomendações para o aperfeiçoamento e padronização da técnica são fornecidas pelo “*Ad-Hoc Committee on Immunohistochemistry Standardization*” (Goldstein et al., 2007).

2.3.1.1 Tumores sólidos

Leong et al. (2004) realizaram um estudo prospectivo de 75 pacientes com carcinoma indiferenciado de nasofaringe em um período de 4 anos, onde avaliaram a expressão imunistoquímica do EGFR e relacionaram às variáveis clínico-patológicas da doença. Entre os espécimes avaliados, 82,7% apresentaram super-expressão do EGFR, o que se relacionou significativamente com o tamanho do tumor primário. Entretanto, a expressão do EGFR não afeta a cura da doença ou a sobrevivência do paciente.

Yamamoto et al. (2004) avaliaram a expressão imunistoquímica da anpirregulina e do EGFR em 43 espécimes de histiocitoma fibroso maligno. A expressão da anpirregulina e do EGFR foi identificada em 79% e 84% dos espécimes observados, respectivamente. A co-expressão destes marcadores foi observada em 70% dos espécimes.

Bloomston et al. (2006), utilizando técnica *microarray* de tecidos, avaliaram o efeito da expressão imunohistoquímica do EGFR no carcinoma pancreático para determinar a associação do EGFR com as características histopatológicas e a consequência para os pacientes. Foram analisados 71 casos de adenocarcinoma pancreático e 18 casos de pancreatite crônica. O EGFR estava presente em 69% dos casos de adenocarcinoma pancreático e 39% dos casos de pancreatite crônica. Entretanto, não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão do EGFR e o grau do tumor, tamanho ou invasão dos linfonodos.

Langer et al. (2006) avaliaram a expressão imunohistoquímica das proteínas EGFR, c-erbB-2, p53, p16, p27 e ciclina D1 por análise de *microarray* de tecidos de 137 casos de adenocarcinomas primários de esôfago e relacionaram os resultados obtidos com fatores clínico-patológicos. Os autores concluíram que a expressão imunohistoquímica da oncoproteína c-erbB-2, ciclina D1, p16, p27, p53 e EGFR na maioria dos adenocarcinomas esofageanos sugere sua relevância na patogênese desta entidade, entretanto nenhum dos marcadores moleculares avaliados foi de valor prognóstico.

Laimer et al. (2007) avaliaram o significado prognóstico da super-expressão do EGFR no carcinoma epidermóide oral em um estudo retrospectivo de 109 pacientes que foram submetidos à cirurgia de carcinoma oral e de orofaringe no período entre 1980 e 1997. Alta expressão do EGFR foi encontrada em 80 (73,42%) dos casos de amostras tumorais, e a super-expressão do EGFR foi significativamente relacionada à diminuição da sobrevivência destes pacientes.

Cimbaluk et al. (2007) avaliaram a expressão imunohistoquímica da proteína EGFR tanto nas células epiteliais como mesenquimais em 30 carcinosarcomas de útero utilizando *microarray* de tecidos. Nos componentes

epiteliais, a expressão do EGFR foi encontrada em 30% dos casos, enquanto nos componentes mesenquimais, a expressão do EGFR foi encontrada em 67% dos casos. Desta forma, nos carcinossarcomas, a expressão do EGFR foi variável entre os componentes epiteliais e mesenquimais.

Wang et al. (2007) avaliaram a expressão imunoistoquímica por *microarray* do EGFR em 103 amostras de tecidos de pacientes submetidos à ressecção de adenocarcinomas de esôfago e junção esôfago-gástrica e relacionaram os resultados obtidos com o prognóstico da doença. A expressão do EGFR foi observada em 32% dos casos e relacionada com classificação patológica avançada e metástase nos linfonodos, além de curta sobrevivência.

Bralet et al. (2007) avaliaram e compararam a expressão imunoistoquímica do EGFR nas células do carcinoma de cólon durante a história natural do curso da doença, desde o tumor primário até a metástase aos linfonodos e fígado. As amostras foram analisadas independentemente por dois patologistas. A expressão do EGFR na membrana celular foi detectada em 38/40 carcinomas de cólon, 23/26 linfonodos e 51/64 metástases no fígado. Tanto os tumores primários como as metástases relacionadas expressaram EGFR em 28 pacientes (73% dos casos).

Diniz-Freitas et al. (2007) analisaram a expressão imunoistoquímica do EGFR no carcinoma epidermóide oral e relacionaram aos achados clínicos, histológicos, curso da doença e prognóstico. Foram avaliados 47 casos, e a relação entre a expressão do EGFR e demais achados foi avaliada por testes estatísticos. Os autores encontraram ausência ou expressão fraca em 12 casos (25,5%) e expressão moderada ou intensa em 35 casos (74,5%). Entretanto, a expressão do EGFR não apresentou associação estatisticamente significativa com nenhuma

variável clínica, histológica, biológica ou prognóstica considerada, não podendo ser utilizado como indicador de prognóstico no carcinoma epidermóide oral.

Mallikarjuna et al. (2007) avaliaram a expressão imunoistoquímica da proteína EGFR em 60 melanomas e correlacionaram aos parâmetros clínico - patológicos. Metástases foram diagnosticadas nos pacientes com melanoma entre 5 e 8 anos (média de 6,5 anos). Neste estudo, a expressão do EGFR foi constatada em apenas 30% dos casos de melanoma.

Smith et al. (2007) avaliaram a expressão imunoistoquímica dos fatores de crescimento EGFR, PDGFR- β , BFGFR e MIB-1 em 84 meningiomas, incluindo 36 benignos, 29 atípicos e 19 malignos. A análise de sobrevivência foi obtida pelo acompanhamento dos dados dos pacientes que apresentavam tumores diagnosticados, com duração média de 9 anos (5,1 a 18,8 anos). A expressão imunoistoquímica do EGFR foi encontrada em 47% dos tumores benignos, 48% dos atípicos e 42% dos malignos. A ausência da expressão ao EGFR relacionou-se ao pobre prognóstico e curta sobrevivência dos pacientes com meningiomas atípicos, porém esta associação não foi encontrada nos casos de meningiomas benignos ou malignos.

Wei et al. (2007) analisaram a expressão imunoistoquímica do EGFR e dos receptores HER2 e HER3 nos tumores esofagianos malignos primários e metástases correspondentes nos linfonodos. Observou-se que houve forte expressão do EGFR tanto na membrana das células metastáticas do carcinoma de células escamosas do esôfago como na membrana das células dos tumores primários.

Dobashi et al. (2007) investigaram a correlação entre amplificação gênica, mutação e super-expressão/ativação de proteínas e do EGFR em 39 casos de tumores ósseos e de tecidos moles. A super-expressão do EGFR foi encontrada por análise imunoistoquímica em 22,6% dos sarcomas, mas não nas lesões benignas. Pela técnica de *imuno-blotting* a super-expressão do EGFR foi encontrada em 47,4% dos sarcomas. Nos casos que não apresentaram aberrações gênicas, a super-regulação do EGFR foi encontrada tanto nos sarcomas como nas lesões benignas, mas a ativação gênica foi encontrada apenas nos sarcomas. Os autores sugeriram que a ativação do EGFR nos tumores de tecidos ósseos e moles não pareceu estar especificamente relacionada com a ativação de moléculas específicas cadeia-abaixo, porém nestes tumores o mecanismo AKT foi predominantemente ativado.

Fischer et al. (2008) avaliaram o valor prognóstico da expressão do EGFR em 365 carcinomas epidermóides orais, utilizando imunoistoquímica e hibridização *in situ* em *microarray* de tecidos. Neste estudo os autores não observaram relação significativa da expressão do EGFR com os dados clínico- patológicos do carcinoma epidermóide oral.

2.3.1.2 Carcinomas de mama

Möller et al. (1989) avaliaram a expressão imunoistoquímica do EGFR nas glândulas mamárias normais e em uma série de 213 tumores de mama primários não selecionados. Na mama normal, o EGFR foi expresso em quantidades variáveis nas células mioepiteliais, lobulares e ductais. Os autores concluíram que a expressão do EGFR não é exclusiva das células da linhagem epitelial, e que o

EGFR pode ter outras funções não relacionadas à proliferação, uma vez que é facilmente detectado nas células mioepiteliais normais.

Pilichowska et al. (1997) avaliaram a expressão imunoistoquímica de fatores de crescimento e do EGFR com o receptor de estrógeno em 36 carcinomas de mama e comparou os resultados com 10 fibroadenomas. O EGFR foi regularmente expresso preferencialmente nas células mioepiteliais dos ductos mamários nos fibroadenomas e nas glândulas mamárias normais.

DiRenzo et al. (2002) estabeleceram uma linhagem primária de células imortalizadas de glândula mamária. A análise bioquímica destas células indicou um fenótipo de células epiteliais basais, com expressão de CKs de alto peso molecular. Os autores demonstraram que o crescimento contínuo destas células é rigorosamente dependente tanto do EGF como IGF, e que os efeitos mitógenos destes fatores nas células imortalizadas são em parte mediados pela AKT.

Santini et al. (2002) avaliaram a expressão imunoistoquímica e a distribuição do EGFR nas células mamárias mioepiteliais em tecidos normais, lesões proliferativas benignas e carcinoma *in situ*. As células mioepiteliais coraram constante e fortemente para o EGFR, criando um anel externo contínuo envolvendo o epitélio dos ductos e ácinos na saúde, nas lesões proliferativas epiteliais e no carcinoma *in situ*, tanto do tipo ductal como lobular. Focos de micro-invasão foram facilmente detectados devido à perda completa de coloração pelo EGFR.

van der Groep et al. (2004) avaliaram a expressão imunoistoquímica do EGFR em cânceres de mama invasivos hereditários (mutações germinativas BRCA1 e BRCA2). Tanto as pacientes com mutações no gene BRCA1 ou BRCA2 apresentaram alta frequência de super-expressão do EGFR, compatíveis com o

subtipo de fenótipo predominantemente basal destes cânceres e seu comportamento agressivo.

Tsuda et al. (2005) avaliaram a expressão imunoistoquímica de marcadores mioepiteliais e oncoproteínas kit, EGFR, e c-erbB-2 em carcinomas de mama, encontrando super-expressão do EGFR mais freqüentemente nos subtipos indiferenciados que nos subtipos diferenciados, concluindo que os subtipos indiferenciados de carcinoma de mama apresentam características de células mamárias epiteliais embrionárias (células tronco), que podem ser identificadas pela super-expressão do KIT ou EGFR.

Rakha et al. (2006) avaliaram as características morfológicas e perfil imunoistoquímico de 1944 carcinomas de mama com fenótipos basais e mioepiteliais utilizando a técnica de *microarray* de tecidos para identificar o subtipo mioepitelial ou basal e imunoistoquímica para avaliar seu perfil imunológico. Tumores com fenótipos basais expressaram CK5/6 e/ou CK14; tumores com fenótipos mioepiteliais expressaram actina de músculo liso e/ou p63. Entre as características encontradas, verificou-se associação entre a perda de expressão dos receptores do hormônio esteróide e proteínas FHIT e expressão positiva de p53 e EGFR.

Dabbs et al. (2006) avaliaram a expressão imunoistoquímica das citoqueratinas (CK)14, 17 e 5/6, vimentina, EGFR, c-kit, actina de músculo liso e p63 em 16 carcinomas de mama do subtipo basal com carcinomas ductais invasivos de alto grau, dos quais 13 apresentavam pelo menos uma área de carcinoma ductal *in situ*. Dos 16 casos invasivos, 88% eram positivos para CK14, CK17, CK5/7 e EGFR; 94% eram positivos para vimentina enquanto 50% dos casos ou menos eram positivos para actina de músculo liso, c-kit ou p63. Os autores observaram que as

áreas de carcinoma intraductal apresentam o mesmo fenótipo imunológico das áreas invasivas, tipicamente positivas para CK5/6, CK14, CK17, vimentina e EGFR.

Talley et al. (2008) avaliaram a expressão imunoistoquímica do EGFR e outros marcadores tumorais nos carcinomas de mama com gradações histológicas equivalentes em mulheres na pré-menopausa e na pós-menopausa, associando ao prognóstico. Os autores concluíram que a expressão do EGFR, Bcl-2 e acúmulo nuclear de p53 foram significativamente relacionados com a gradação histológica do tumor, mas não com o status da menopausa. Além disso, houve diferença na efetividade prognóstica destes marcadores nas mulheres com pré e pós-menopausa.

2.3.2 EGFR e tumores de glândulas salivares

Yamada et al. (1989) avaliaram a expressão imunoistoquímica e a localização do EGFR em glândulas salivares normais e 108 casos de tumores de glândulas salivares. Nas glândulas salivares normais, o EGFR foi ocasionalmente detectado nas células ductais, mas não nas células acinares. Em 33,8% dos APs, a expressão do EGFR foi observada nas células luminais e nas células tumorais com metaplasia escamosa. Algumas células mioepiteliais modificadas também expressaram EGFR, enquanto as células fusiformes da camada externa do tumor não expressaram. Em 44,4% dos adenolinfomas observou-se a expressão do EGFR na membrana das células tumorais. Em 25% dos carcinomas mucoepidermóides a expressão do EGFR foi observada na membrana celular das células epidermóides e no citoplasma das células tumorais secretoras de muco. Em 66,6% dos sialoadenocarcinomas houve expressão do EGFR na membrana plasmática e em

todo o citoplasma celular. Os autores observaram expressão imunohistoquímica do EGFR nos tumores de glândula em localizações distintas: na membrana celular de células tumorais epiteliais e no citoplasma de células ductais normais, células tumorais luminiais em APs e células tumorais secretoras de muco.

Nagao et al. (1998) avaliaram a expressão imunohistoquímica do Ki-67, p53, bcl-2 e EGFR em 11 casos de adenocarcinomas de células basais de glândulas salivares e nove adenomas de células basais. Dos casos analisados, seis adenocarcinomas de células basais foram positivos para p53 e três foram positivos para o EGFR, enquanto todos os casos de adenomas de células basais foram completamente negativos para p53 e EGFR. Embora todos os casos de adenomas de células basais tenham sido fortemente positivos para bcl-2, três adenocarcinomas de células basais foram completamente negativos. Os autores concluíram que expressão da p53, bcl-2 e EGFR foram úteis na distinção entre os tumores malignos de células basais e sua contraparte benigna.

Gibbons et al. (2001) avaliaram a expressão imunohistoquímica das proteínas c-erbB-2, erbB-3, EGFR e TGF- α em 22 casos de carcinoma mucoepidermóide e seis casos de carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares. Coloração positiva para todos os biomarcadores foi observada no citoplasma e membrana das células dos dois tumores. Entretanto, somente foi estatisticamente significativa a expressão do TGF- α e do EGFR, tanto citoplasmático como membranoso, para o carcinoma mucoepidermóide.

Fan et al. (2001), em um estudo retrospectivo, avaliaram a expressão imunohistoquímica do receptor andrógeno (RA), TGF- α e EGFR em 12 casos de carcinoma do ducto salivar. Os tumores estudados expressaram RA, TGF- α e EGFR em 92%, 67% e 92%, respectivamente. Os autores concluíram que o mecanismo

autócrino TGF- α / EGFR mediado pelo RA pode estar implicado na tumorigênese do carcinoma do ducto salivar.

Vered et al. (2002) avaliaram a expressão imunohistoquímica do EGFR em 27 espécimes de carcinoma adenóide cístico. Foram utilizadas como controle a mucosa oral de recobrimento e as glândulas salivares adjacentes. Foram avaliadas tanto a coloração da membrana como do citoplasma. Dos espécimes avaliados, 85% coraram positivamente para o EGFR. Os autores sugeriram o uso de inibidores de EGFR como possíveis alvos terapêuticos no carcinoma adenóide cístico.

Hoyek-Gebeily et al. (2007) realizaram um estudo retrospectivo de todos os casos de carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares dos pacientes de um hospital universitário atendidos no período entre 1994 e 2002, com o objetivo de relacionar os critérios de classificação histopatológica ao valor prognóstico da expressão imunohistoquímica das proteínas p53, EGFR e E-caderina no tumor. Os autores concluíram que a imunexpressão do EGFR e da p53 estavam relacionadas a altas gradações histológicas do carcinoma mucoepidermóide oral, sugerindo que estas proteínas são alvos interessantes para futuras investigações como fatores de prognóstico neste tumor.

Katori et al. (2007) avaliaram a expressão do EGFR, TGF- α e Ki-67 em relação à transformação maligna do AP pelo método de análise imunohistoquímica quantitativa. Neste estudo observou-se aumento significativo da expressão dos três anticorpos no CXAP, comparados ao AP e sialodenite, além de aumento significativo na expressão do EGFR e Ki-67 nos pacientes que morreram ou tiveram recorrência comparados aos pacientes que permaneceram vivos sem a doença. Os autores concluíram que o aumento da expressão do EGFR e TGF- α pode estar associado aos eventos iniciais de transformação maligna do AP.

Matsubayashi & Yoshihara (2007) avaliaram a expressão imunohistoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), Ki-67 e oncoproteínas p53, c-erbB-2 e EGFR no CXAP. Os autores observaram um aumento significativo na expressão do PCNA, p53, c-erbB-2, Ki-67 e EGFR nos componentes malignos do CXAP, quando comparados ao componente benigno deste tumor.

Shang et al. (2008) observaram a expressão imunohistoquímica do EGFR em 46 casos de carcinoma mucoepidermóide. Os autores verificaram que a maioria dos carcinomas mucoepidermóides de parótida expressam fortemente o EGFR em suas membranas celulares (81,8%), e que as metástases nos linfonodos geralmente expressam o EGFR na mesma extensão que nos tumores primários (72,7%).

2.3.3 EGFR como alvo molecular terapêutico

Os sinais mitogênicos nas células de mamíferos são ativados principalmente por fatores de crescimento que interagem com receptores localizados na membrana plasmática. A maioria destes receptores possui um domínio intracelular de tirosino-quinases. Ao interagir com os fatores de crescimento, estas tirosino-quinases são fosforiladas, desencadeando mecanismos de sinalização que alteram os padrões de expressão gênica e induzem a divisão celular. Tanto a super-expressão do receptor, como mutações no seu domínio citoplasmático de tirosino-quinases, contribuem para a sinalização constitutiva nas neoplasias malignas humanas.

Entre estes receptores, os da família ErbB são alvos atrativos para terapias direcionadas, pois estão freqüentemente envolvidos na produção de muitos tipos de cânceres (Perona, 2006).

O ErbB 1 ou EGFR é super- expresso, desregulado ou mutado em diversas malignidades epiteliais, e sua ativação parece ser importante no crescimento e progressão tumoral (Harari, 2004).

Com o desenvolvimento de terapias baseadas na inibição de receptores nas células neoplásicas, o EGFR tornou-se uma molécula- alvo importante no tratamento do câncer. Duas classes predominantes de inibidores do EGFR foram desenvolvidas, entre elas anticorpos monoclonais que atingem o domínio extracelular do EGFR, como o Cetuximab (Erbix) e pequenas moléculas inibidoras de tirosino- quinases, como o Gefitinib (Iressa) e Erlotinib (Tarceva). As estratégias alvo- moleculares para a terapia do câncer são distintas da quimioterapia e radioterapia convencionais pelo seu potencial de promover aumento na especificidade tumoral (Harari, 2004).

Os benefícios clínicos e de sobrevivência com os agentes anti- EGFR foram demonstrados em tumores como carcinoma pancreático, colorretal, pulmonar e de cabeça e pescoço (Mendelsohn, Baselga, 2006).

Entretanto, foi observado que mutações no domínio tirosino-quinase do EGFR podem levar à resistência de alguns carcinomas aos agentes terapêuticos inibidores de tirosino-quinases, o que foi demonstrado em carcinomas de mama e pulmão que não respondem ao tratamento com Gefitinib (Ferrer-Soler et al., 2007; Kim et al., 2008).

Em 2006, Younes et al. avaliaram os efeitos do AEE788, um inibidor de tirosino-quinases do EGFR e do VEGFR em células cultivadas do carcinoma adenóide cístico (CAC) de glândulas salivares. Neste estudo, examinaram-se os efeitos do AEE788 no crescimento e apoptose de células do CAC, bem como os

efeitos do inibidor na fosforilação do EGFR e do VEGFR2. Verificou-se que no tratamento das células do CAC apenas com o AEE788 ou em combinação com a quimioterapia, houve inibição do crescimento celular, indução da apoptose e inibição da fosforilação do EGFR e do VEGFR, de maneira dose- dependente. Os autores concluíram que o EGFR e o VEGFR podem ser alvos moleculares para o tratamento do CAC de glândulas salivares.

Recentemente, dois estudos sugeriram a possibilidade de utilização de terapias alvo-moleculares direcionadas a receptores, no tratamento de carcinomas de glândulas salivares, baseados no sucesso de inibidores de tirosino-quinases como o Gefitinib em carcinoma epidermóide oral (Hamakawa et al., 2008) e na expressão do EGFR em carcinomas mucoepidermóides primários (81,8%) e metástases correspondentes (72,7%) (Shang et al., 2008).

Até a presente data, os agentes terapêuticos anti- EGFR ainda não foram testados nos CXAP.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão do *receptor do fator de crescimento epidermal* (EGFR) no carcinoma ex- adenoma pleomórfico (CXAP) de glândulas salivares pela técnica imunoistoquímica, avaliando a possível relação da expressão do receptor na transformação maligna do AP e na progressão tumoral do CXAP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção e classificação dos tumores

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic (protocolo nº 07/258, ANEXO A) e financiado pelo projeto temático da FAPESP nº 04/07960-0.

Foram selecionados aleatoriamente 16 casos diagnosticados como *carcinoma ex- adenoma pleomórfico* (CXAP) e seis casos diagnosticados como *adenoma pleomórfico* (AP), dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic.

Os tumores malignos foram classificados de acordo com Brandwein et al. (1996), levando em consideração a extensão da invasão além da cápsula do AP prévio, como: intracapsular (sem invasão), minimamente invasivo ($\leq 1,5\text{mm}$ de invasão) e francamente invasivo ($\geq 1,5\text{mm}$ de invasão).

Os tumores também foram classificados de acordo com a presença de células epiteliais e/ou mioepiteliais utilizando-se imunistoquímica para citoqueratinas (identificação das células epiteliais), actina de músculo liso e vimentina (identificação das células mioepiteliais), como previamente descrito por Altemani et al. (2005). Estes dados são mostrados na tabela 1.

Glândulas salivares normais presentes nos espécimes também foram analisadas.

Tabela 1 - Sexo, idade, localização, componente e grau de invasão do carcinoma ex-adenoma pleomórfico

Caso	Sexo	Idade	Glândula Salivar	Componente	Grau de Invasão
1	Masculino	58	Parótida	Epitelial	Intracapsular
2	Feminino	50	Parótida	Epitelial	Intracapsular
3	Feminino	37	Submandibular	Epitelial	Intracapsular
4	Feminino	51	Parótida	Epitelial	Intracapsular
5	Feminino	65	Parótida	Epitelial	Minimamente invasivo
6	Feminino	43	Parótida	Epitelial	Minimamente invasivo
7	Masculino	74	Parótida	Epitelial	Minimamente invasivo
8	Masculino	64	Parótida	Epitelial	Minimamente invasivo
9	Feminino	57	Parótida	Epitelial	Minimamente invasivo
10	Feminino	62	Submandibular	Epitelial	Francamente invasivo
11	Masculino	66	Parótida	Epitelial	Francamente invasivo
12	*	*	Parótida	Epitelial	Francamente invasivo
13	Feminino	55	Palato	Epitelial / Mioepitelial	Francamente invasivo
14	Masculino	65	Parótida	Epitelial / Mioepitelial	Francamente invasivo
15	Feminino	50	Parótida	Epitelial / Mioepitelial	Francamente invasivo
16	Feminino	74	Palato	Mioepitelial	Francamente invasivo

* *Dados não disponíveis*

4.2 Imunoistoquímica

Foram realizadas reações imunostoquímicas no Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic, segundo as recomendações fornecidas pelo “*Ad-Hoc Committee on Immunohistochemistry Standardization*” (Goldstein et al., 2007).

Para isso, utilizou-se o anticorpo policlonal EGFR (código 1005: sc-03 - Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) empregando-se o método EnVision Peroxidase (DAKO, Carpinteria, CA, USA), seguindo o protocolo abaixo:

- a) cortes histológicos: secções de 3 μm foram estendidas em lâminas de vidro previamente lavadas e desengorduradas, tratadas em solução de organo-silano a 20% em acetona (3-aminopropil- trietoxi- silano – código A3648 – Sigma, St. Louis, MO, USA). As lâminas com cortes foram colocadas em estufa a 60°C por uma hora antes do início do processo imuno- histoquímico;
- b) desparafinização: as lâminas foram submetidas a dois banhos de xilol, sendo o primeiro a 60°C por 40 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos, a fim de se retirar o excesso de parafina dos cortes histológicos;
- c) hidratação: esta etapa foi realizada em banhos de dois minutos cada em gradiente decrescente de álcool, sendo: três banhos em álcool absoluto, um banho em álcool a 95% e um banho em álcool a 85%;
- d) remoção de pigmentos formólicos: as lâminas foram imersas em solução de hidróxido de amônia a 10% e em etanol a 85%, durante 10 minutos;

- e) foi realizada a lavagem em água corrente e água destilada por 10 minutos cada;
- f) recuperação dos sítios antigênicos: foi realizada com ácido cítrico 0,1M, pH 6,0, em Banho Maria, a 95°C, por 30'.
- g) foi realizada a lavagem em água corrente e água destilada por 10 minutos cada;
- h) bloqueio da peroxidase endógena tecidual: os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% e metanol na proporção 1:1, em dois banhos de 15 minutos cada;
- i) foi realizada uma lavagem com água destilada;
- j) foram realizadas duas lavagens com solução tampão TRIS a 0,05M, pH 7,4;
- k) incubação dos anticorpos primários: o anticorpo primário anti- EGFR foi diluído em BSA a 1%, a 4° C, na titulação de 1:50, por 18 horas (Tabela 2);
- l) foram realizadas duas lavagens com solução tampão TRIS 0,05M, pH 7,4;
- m) incubação dos anticorpos secundários: os reagentes EnVision Peroxidase Rabbit (cód. K4002) (DAKO, Carpinteria, CA, USA) foram incubados nos cortes previamente tratados com o anticorpo primário conforme recomendações do fabricante. Por ser um sistema de anticorpo livre de biotina, evitou resultados falsos positivos por reação cruzada com a biotina tecidual;
- n) foram realizadas duas lavagens com solução tampão TRIS 0,05M, pH 7,4;

- o) revelação da reação: a reação foi revelada com DAKO Liquid DAB plus (cod. K3468) (DAKO, Carpenteria, CA, USA), um cromógeno de coloração acastanhada, segundo recomendações do fabricante;
- p) foram realizadas duas lavagens com solução tampão TRIS 0,05M, pH 7,4;
- q) foi realizada uma lavagem com água destilada;
- r) contra-coloração: os cortes foram imersos em hematoxilina de Mayer por cinco minutos para a contra-coloração;
- s) foram realizadas duas lavagens com água destilada;
- t) desidratação: as lâminas passaram por cinco minutos numa série de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e 100%);
- u) diafanização: as lâminas passaram em dois banhos de cinco minutos cada em xilol;
- v) montagem: as lâminas foram montadas colando-se as lamínulas sobre os cortes histológicos com Permount;
- w) foi feita a análise em microscopia de luz.

Os itens 12 a 19 do protocolo de reação acima foram realizados na DAKO Autostainer Plus (DAKO, Carpenteria, CA, USA).

A omissão do anticorpo primário constituiu o controle negativo.

4.3 Análise dos cortes histológicos

A expressão e a localização do anticorpo utilizado foram observadas por microscopia de luz por dois examinadores independentes e registradas segundo análise qualitativa.

A análise quantitativa foi realizada através da contagem das células positivas nas diferentes áreas do CXAP, incluindo áreas *in situ* e áreas periféricas dos tumores intracapsulares e minimamente invasivos e grupos grandes e pequenos de células dos carcinomas francamente invasivos com componente epitelial e/ ou mioepitelial.

Para a contagem das células, foram obtidos, de cada espécime, quatro campos aleatórios com um mínimo de 500 células por campo. Cada campo foi fotografado em aumento de 400X. As células foram contadas em cada área por análise das imagens assistida por computador.

Os resultados foram apresentados como porcentagem de células e/ou núcleos corados positivamente.

5 RESULTADOS

Nesta investigação, a expressão imunoistoquímica do EGFR foi avaliada nos *carcinomas ex adenomas pleomórficos* (CXAP) com componente epitelial (quatro intra-capsulares, cinco minimamente invasivos, três francamente invasivos) e nos tumores com componente epitelial/ mioepitelial (quatro francamente invasivos). *Adenomas pleomórficos* (AP) sem carcinoma e AP remanescentes em CXAP foram utilizados como controle. A expressão do EGFR foi observada principalmente no citoplasma das células luminais e mioepiteliais malignas. O receptor também expressou em alguns núcleos, o que se mostrou mais evidente no CXAP francamente invasivo com componente mioepitelial. Os resultados foram expressos em percentagem, conforme tabela 3 e gráfico1.

Tabela 3 - Percentagem de células positivas e negativas à imunoexpressão do EGFR, por subtipo de CXAP

CXAP	Intracapsular	Minimamente Invasivo	Invasivo Epitelial	Invasivo Mioepitelial
[%(C)+] *	68,42% (± 8,97%)	79,22%(± 10,79%)	84,50%(± 7,33%)	89,68%(± 7,54%)
[%(C+N)+] *	1,90%(± 1,24%)	2,16%(± 1,9%)	7,11%(± 3,50%)	10,01%(± 7,67%)
[(C)-] *	29,68%(± 8,72%)	18,62%(± 10,32%)	8,39%(± 6,70%)	0,64%(± 0,57%)

* [(C) +]: células com expressão citoplasmática positiva para o EGFR;

[(C+N)+]: células com expressão citoplasmática e nuclear positiva para o EGFR;

[(C)-]: células negativas ao EGFR

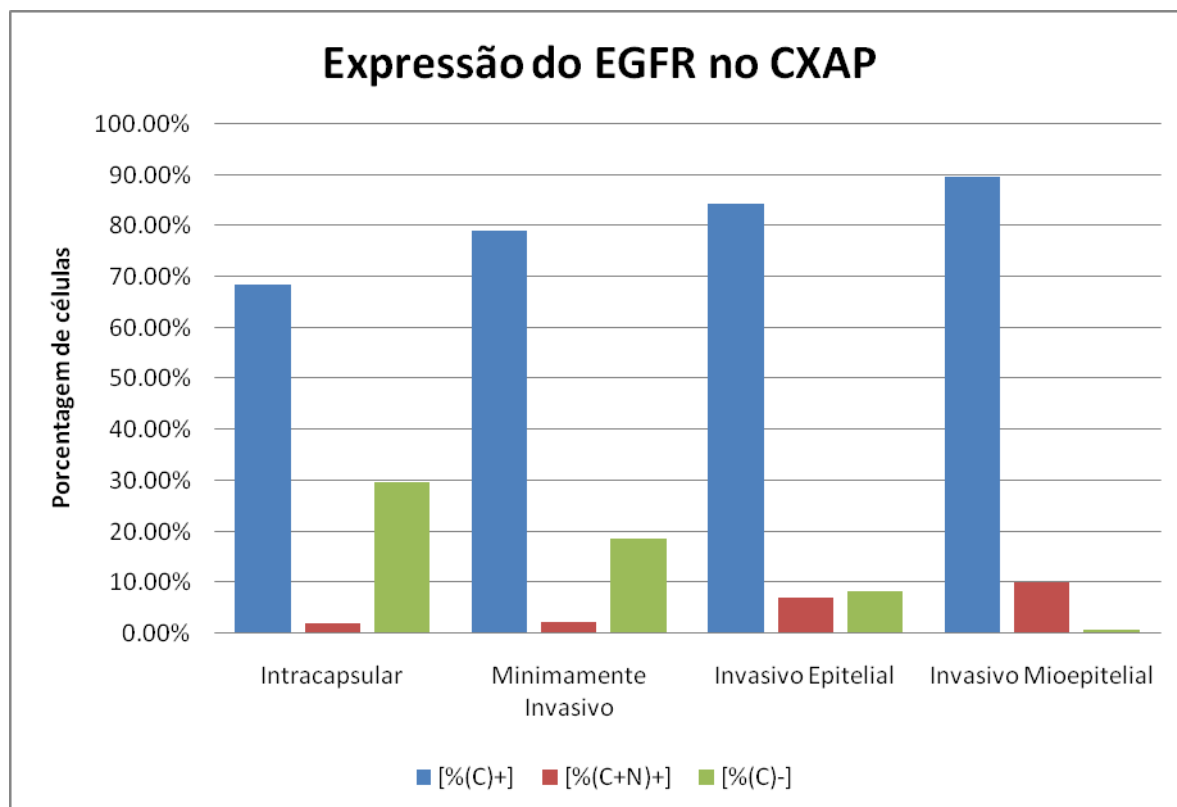


Gráfico 1 - Média da expressão do EGFR por subtipo de CXAP, em porcentagem

5.1 Glândulas salivares normais

A imuno-expressão do EGFR foi observada predominantemente no citoplasma das células de todo o sistema de ductos das glândulas salivares serosas e mucosas (figuras 1a e 1b).

5.2 Adenoma pleomórfico

Os AP expressaram o EGFR em áreas focais. Esta imunoexpressão foi observada principalmente nas regiões periféricas do tumor (figura 1c) e nas células das regiões condróides e mixóides. Em alguns espécimes, nas estruturas semelhantes a ductos, foi detectado no citoplasma das células luminiais (figura 1d).

Não houve marcações nos núcleos. Os estromas condróide, hialino e mixóide não expressaram o EGFR.

5.3 Adenoma pleomórfico remanescente em CXAP

As áreas de AP remanescentes apresentaram padrão de imunexpressão semelhante aos AP: áreas focais de expressão citoplasmática positiva nas células luminais, com ausência de marcação no estroma condróide, hialino e mixóide (figura 1e e 1f).

5.4 CXAP com componente epitelial

5.4.1 Intracapsular e minimamente invasivo

Os CXAP dos subtipos intracapsulares e minimamente invasivos apresentaram expressão citoplasmática do EGFR na maioria das células da periferia tumoral (70,32% e 81,38%, respectivamente; figuras 2a e 2b). As áreas “*in situ*” mostraram intensa expressão do EGFR no citoplasma de quase todas as células luminais neoplásicas malignas, entretanto não houve expressão do receptor nas células mioepiteliais neoplásicas benignas (figuras 2c e 2d).

Nas regiões de atipia severa, houve marcação em núcleos isolados e na cromatina de algumas células em atividade mitótica.

5.4.2 Francamente invasivo

No subtipo invasivo com componente epitelial, a porcentagem de células positivas para o EGFR foi 91,61%, tanto nas regiões de blocos como nas regiões de

ilhas e ninhos (figuras 2e e 2f). Houve expressão do EGFR no núcleo de algumas células malignas (7,11%).

5.5 CXAP com componente mioepitelial

5.5.1 *Francamente invasivo*

No subtipo invasivo com componente mioepitelial, foi observada imunoeexpressão do EGFR quase na totalidade das células (99,69%). Além disso, porcentagem de núcleos marcados foi discretamente maior (10,01%) que nos subtipos invasivos com componente epitelial (figuras g e h).

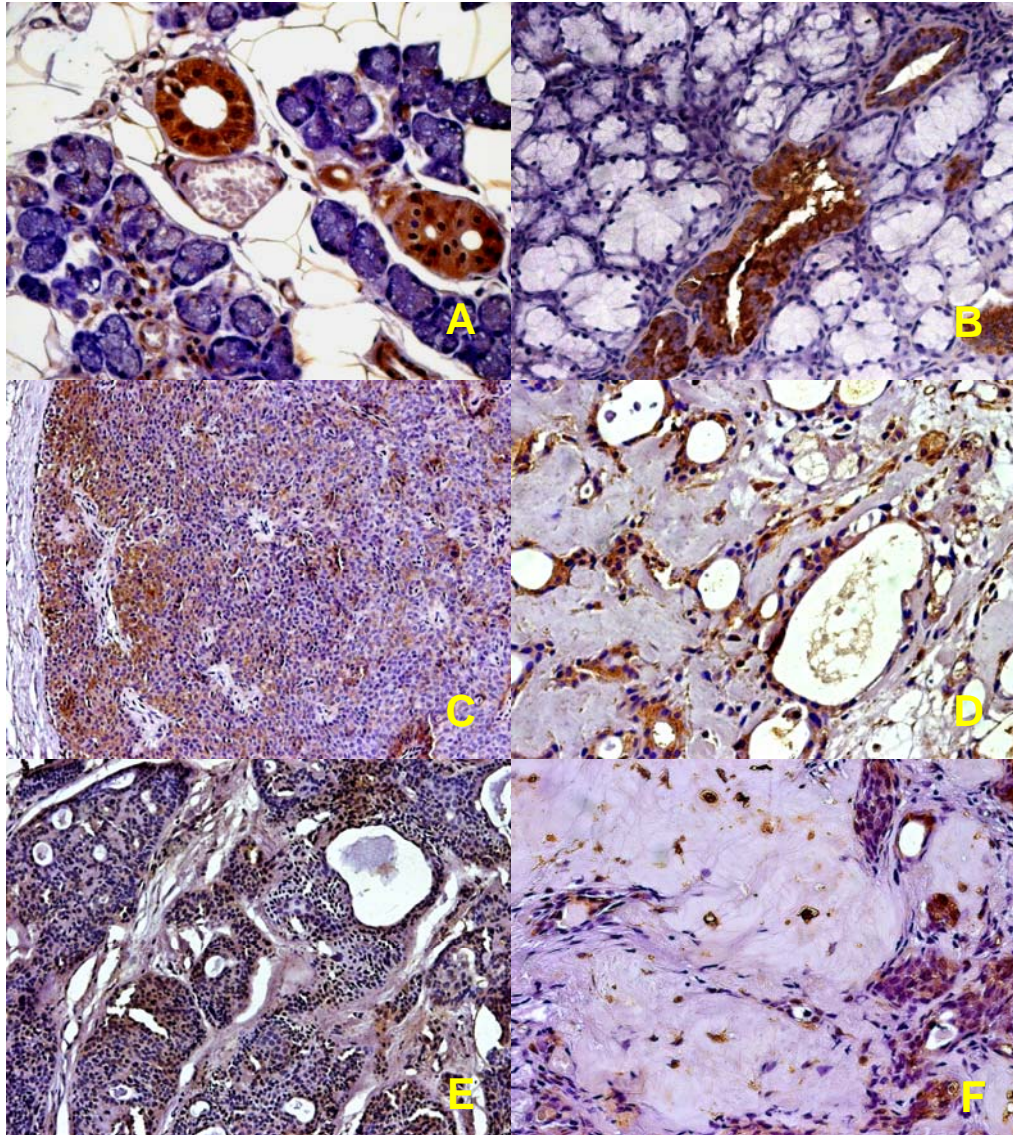


Figura 1 - Glândulas salivares normais, AP e AP remanescente. A, B, C, D, E e F: imunoistoquímica para o EGFR. A e B: a glândula salivar normal é positiva para o EGFR no citoplasma das células do sistema de ductos. C e D: AP, onde o EGFR se expressa principalmente na periferia tumoral e no citoplasma das células luminiais das estruturas ductais (D). E e F: AP remanescente em CXAP, com áreas focais de expressão do EGFR. Não há expressão no estroma condróide, apenas nas células das lacunas (F).

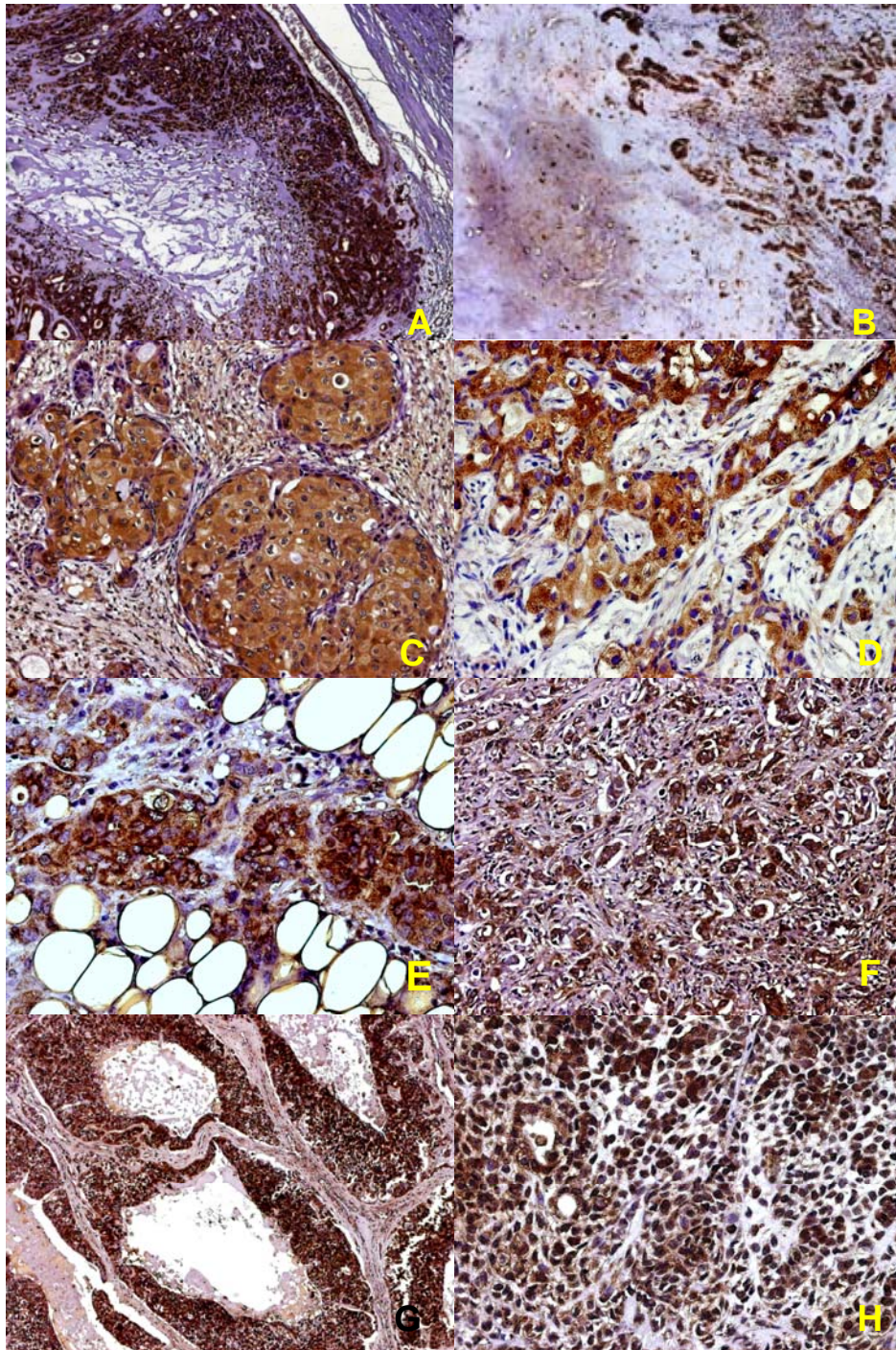


Figura 2 - Diversos subtipos de CXAP. A, B, C, D, E, F, G e H: imunoistoquímica para o EGFR. A e B: CXAP intracapsular, com intensa expressão do EGFR na periferia do tumor. C e D: CXAP minimamente invasivo; as áreas "in situ" expressam o EGFR no citoplasma das células luminais malignas. Não há expressão nas células mioepiteliais neoplásicas benignas. E e F: CXAP francamente invasivo com componente epitelial: expressão do EGFR nos grandes blocos e pequenos ninhos de células malignas. G e H: CXAP francamente invasivo com componente mioepitelial. Intensa expressão do EGFR no citoplasma de quase todas as células. Em algumas regiões tumorais, o anticorpo também expressou no núcleo das células malignas.

6 DISCUSSÃO

Entre os receptores de fatores de crescimento, o *receptor de fator de crescimento epidermal* (EGFR) aparece na literatura em vários aspectos da biologia celular, inclusive com participação no processo oncogênico. O EGFR foi descrito pela primeira vez como uma proteína de membrana receptora do EGF (*fator de crescimento epidermal*) em células de ratos (Das et al., 1977), que sofre internalização mediada pelo EGF e estimula a síntese de DNA (Das, Fox, 1978; Fox, Das, 1979; Schreiber et al., 1983). Em 1980, Cohen et al. já acreditavam que o receptor possuía uma atividade proteíno-quinase, e no mesmo ano foi descrita sua capacidade de interação com *fatores transformadores de crescimento tumorais* (TGF) produzidos por células neoplásicas (Todaro et al., 1980).

Hoje se sabe que o EGFR é uma proteína transmembrana membro da família dos receptores ErbB/ HER, que desempenha diversas funções biológicas na célula normal, entre elas proliferação, migração e adesão celular (Fallon et al., 1984, Singh, Harris, 2005). Na superfície da célula, vários ligantes podem ativar o receptor, resultando na sua dimerização e na auto-fosforilação dos resíduos de tirosinas do domínio C-terminal, o que leva à sinalização de uma cadeia de proteínas que se associam com as tirosinas fosforiladas e iniciam a transdução do sinal (Singh, Harris, 2005). O EGFR ativado pode sofrer translocação citoplasmática, onde faz a transdução dos sinais mitogênicos através da ativação de múltiplas cascatas de sinalização, ou migrar para o núcleo, onde participa na regulação da expressão gênica (Lo, Hung, 2006). Nas células cancerígenas, tanto a super-expressão do receptor, como mutações no domínio citoplasmático de tirosino-

quinases, contribuem para a sinalização constitutiva, o que parece ser importante no crescimento e na progressão de diversas neoplasias (Harari, 2004).

A super-expressão do EGFR foi observada no carcinoma pancreático, carcinoma epidermóide oral, carcinoma de cólon e carcinoma de mama (Santini et al., 2002; van der Groep, 2004; Tsuda et al., 2005; Bloomston et al., 2006; Dabbs et al., 2006; Hiraishi et al., 2006; Rakha et al., 2006; Laimer et al., 2007; Diniz-Freitas et al., 2007; Bralet et al., 2007; Cimbaluk et al., 2007; Wang et al., 2007; Talley et al., 2008). Em glândulas salivares, a super-expressão do EGFR foi relatada em tumores como adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenóide cístico e CXAP (Yamada et al., 1989; Gibbons et al., 2001; Vered et al., 2002; Hoyek-Gebeily et al., 2007; Katori et al., 2007; Matsubayashi et al., 2007; Shang et al., 2008). A expressão do EGFR também foi associada a parâmetros clínico-patológicos e ao prognóstico de diversos tumores, com resultados controversos na literatura (Leong et al., 2004; van der Groep, 2004; Bloomston et al., 2006; Langer et al., 2006; Diniz-Freitas et al., 2007; Laimer et al., 2007; Smith et al., 2007; Fisher et al., 2008; Talley et al., 2008).

As observações preliminares da expressão do EGFR nos diversos tipos tumorais permitiram o desenvolvimento de terapias baseadas na inibição do receptor nas células neoplásicas. Entre os agentes terapêuticos inibidores do EGFR, estão os anticorpos monoclonais que atingem o domínio extracelular do receptor, como o Cetuximab (Erbix) e moléculas inibidoras das tirosino-quinases, como o Gefitinib (Iressa) e Erlotinib (Tarceva) (Harari, 2004). Os benefícios clínicos da administração dos agentes anti-EGFR foram observados no carcinoma pancreático, colorretal, pulmonar e de cabeça e pescoço (Mendelsohn, Baselga, 2006). Entretanto, verificou-se que mutações no domínio tirosino-quinase do receptor tornam alguns

tumores resistentes aos agentes anti- EGFR, o que já foi observado nos carcinomas de mama e pulmão (Ferrer-Soler et al., 2007; Kim et al., 2008). Estudos recentes têm sugerido a utilização dos agentes inibidores do EGFR como alvo terapêutico no tratamento de tumores de glândulas salivares (Younes et al., 2006; Hamakawa et al., 2008; Shang et al., 2008) e, por isso, a investigação da função do EGFR na tumorigênese de glândulas salivares é um fator importante.

Em nosso laboratório, o *carcinoma ex adenoma pleomórfico* (CXAP) mostrou-se um modelo interessante para estudar a transformação maligna de um tumor benigno e para avaliar as modificações das células malignas, bem como as modificações dos tecidos e células adjacentes. Estes tumores foram definidos como neoplasias epiteliais malignas em associação com um *adenoma pleomórfico* (AP) primário ou recorrente (Araújo et al., 2006).

Nosso estudo foi conduzido para verificar a associação entre o EGFR e a progressão tumoral. Para isso, empregou-se a técnica imunoistoquímica, que tem sido amplamente utilizada para a verificação da expressão de proteínas oncogênicas e que, com o desenvolvimento de novos anticorpos, permite a visualização de alterações moleculares e morfológicas específicas (Leong, Leong, 2006). Foram seguidas as recomendações para o aperfeiçoamento e padronização da técnica, fornecidas pelo “*Ad-Hoc Committee on Immunohistochemistry Standardization*” (Goldstein et al., 2007).

De acordo com Brandwein et al. (1996), foram contadas as células positivas nas diferentes áreas do CXAP, incluindo áreas *in situ* e periféricas tanto dos tumores intra-capsulares como minimamente invasivos e grupos grandes e pequenos de células do carcinoma francamente invasivo apenas com componente epitelial e/ ou mioepitelial.

Em glândulas salivares normais, a expressão do EGFR foi observada nas células ductais luminais, mas não nas unidades secretoras. Já os AP e os AP remanescentes em CXAP, apresentaram positividade para o EGFR em áreas focais, mais localizadas na periferia do tumor e em algumas células luminais das estruturas semelhantes a ductos. Nos CXAP, as áreas *in situ* dos carcinomas intracapsulares e minimamente invasivos apresentaram forte expressão na maioria das células luminais malignas e os subtipos invasivos com componente epitelial caracterizaram-se pelo aumento progressivo no número de células positivas quando comparadas aos subtipos anteriores. Verificou-se, portanto, que com a progressão tumoral, a intensidade da expressão do EGFR nas células neoplásicas do CXAP aumentou. Isto provavelmente se deve a alterações genéticas e fenotípicas que levam a adaptações das células neoplásicas ao microambiente tumoral, intensificando a atividade proliferativa destas células com a progressão do tumor.

A expressão do EGFR ocorreu predominantemente no citoplasma, embora tenha sido observada em alguns núcleos, principalmente nas células neoplásicas malignas do subtipo mioepitelial. O mecanismo de sinalização nuclear do EGFR tem sido associado às principais características dos tumores mais agressivos, como aumento no potencial proliferativo das células e progressão acelerada do ciclo celular (Lo, Hung, 2006). Na literatura, a expressão nuclear do EGFR é sugerida como fator de prognóstico no carcinoma de mama (Lo et al., 2005) e no carcinoma epidermóide de orofaringe (Psyrrri et al., 2005). Nosso trabalho não teve como objetivo avaliar o valor prognóstico da expressão do EGFR no núcleo ou citoplasma de células do CXAP. Entretanto, nossos resultados sugerem a existência de relação entre aumento progressivo da expressão do receptor e a gradação histológica do tumor. Embora não existam dados que relatem a expressão do EGFR

em núcleos de células neoplásicas de glândulas salivares (Yamada et al., 1989; Gibbons et al., 2001; Vered et al., 2002; Hoyek-Gebeily et al., 2007; Katori et al., 2007; Matsubayashi et al., 2007; Shang et al., 2008), pode ser que, nos CXAP invasivos, as células tumorais que expressaram o receptor no núcleo tenham adquirido um fenótipo mais proliferativo, hipótese que requer maiores investigações.

A célula mioepitelial é componente de várias glândulas secretoras, incluindo as glândulas salivares. Foram atribuídas a esta célula tanto a função de supressão como de facilitação da progressão tumoral. Araújo et al. (2006) demonstraram que, no processo de transformação maligna do CXAP com diferenciação epitelial, as células mioepiteliais benignas das áreas *in situ* tornam-se diferenciadas e produzem proteínas relacionadas à função de supressão tumoral. Em nosso estudo, observamos que as células mioepiteliais neoplásicas benignas das áreas *in situ* do CXAP com diferenciação epitelial não expressaram o EGFR. Entretanto, as células mioepiteliais neoplásicas malignas do CXAP invasivo apresentaram forte expressão do receptor. Este resultado provavelmente está relacionado ao comportamento biológico distinto das células mioepiteliais benignas e malignas. A célula maligna pode apresentar aumento no potencial de replicação, evasão na apoptose e auto-suficiência na regulação dos sinais de crescimento. Por isso, o padrão de imunexpressão do EGFR nas células mioepiteliais do CXAP parece estar relacionado à perda da função inicial de supressão tumoral observada nas células mioepiteliais benignas das áreas *in situ* e ganho de função proliferativa nas células mioepiteliais malignas dos tumores invasivos.

Nos carcinomas de mama, tanto os tumores com diferenciação basal como epitelial/ mioepitelial expressam o EGFR, sendo esta expressão mais acentuada no subtipo basal com comportamento mais agressivo e invasivo (van der

Groep, 2004; Tsuda et al., 2005; Dabbs et al., 2006; Rakha et al., 2006). É interessante notar que, na mama, as células mioepiteliais normais, das neoplasias benignas e do carcinoma *in situ* expressam fortemente o EGFR, com uma perda de expressão do receptor nos microfocos de invasão tumoral (Möller et al, 1989; Santini et al., 2002). Este padrão de expressão diverge de nossos resultados. Pode ser que, nos carcinomas de mama, o comportamento da célula mioepitelial, quanto à função de supressão ou facilitação da progressão tumoral, invasão e proliferação, seja diferente do observado no CXAP ou que nas células mioepiteliais da mama, o EGFR exerça outras funções não relacionadas à proliferação.

Nossos resultados foram semelhantes aos de Matsubayashi & Yoshihara (2007), que observaram um aumento significativo na expressão do EGFR nos componentes malignos do CXAP com diferenciação epitelial quando comparados ao AP. Em nossos estudos, a imunexpressão do EGFR nos CXAP do subtipo epitelial ocorreu em 70,32% dos tumores intracapsulares, 81,38% dos tumores minimamente invasivos e 91,61% dos tumores invasivos.

A expressão do EGFR no CXAP foi diferente quando comparada a outros fatores de crescimento e receptores no mesmo tumor. Em um estudo recente, demonstrou-se que nos CXAP do subtipo francamente invasivos com componente epitelial e/ou mioepitelial a expressão de HGFA (*fator de crescimento de hepatócitos*), uma citocina envolvida em diversos processos biológicos como migração, proliferação celular e angiogênese, foi negativa em todas as células (Furuse et al., 2008). Nossos resultados demonstram que a expressão do EGFR no CXPA invasivo com componente epitelial e/ou mioepitelial ocorreu na maioria das células neoplásicas, exceto nas células mioepiteliais benignas das áreas *in situ*.

Também foi demonstrado que na periferia do CXAP alguns pequenos grupos de células perderam positividade para outro fator de crescimento, o PDGF (*fator de crescimento derivado de plaquetas*), embora a expressão do PDGF e de seu receptor estejam relacionadas à transformação maligna do tumor (Demasi et al., *in press*). O EGFR esteve fortemente presente na periferia do CXAP intracapsular e minimamente invasivo, tanto nos grandes grupos de células malignas como nos pequenos ninhos, e sua expressão pôde ser bem observada nas células epiteliais e mioepiteliais malignas dos CXAP invasivos. Portanto, o EGFR parece desempenhar um papel importante não só na proliferação celular, como também na invasão e progressão tumoral.

7 CONCLUSÃO

O EGFR esteve amplamente presente no citoplasma e algumas vezes nos núcleos das células luminiais e mioepiteliais malignas do CXAP.

A expressão imunoistoquímica do receptor no CXAP aumentou com a evolução do tumor, e mostrou-se um fator importante tanto na transformação maligna das células epiteliais e mioepiteliais como na progressão tumoral.

Diferente de outros fatores de crescimento anteriormente estudados, o EGFR parece desempenhar também um papel na invasão tumoral, uma vez que é observado nas células da periferia do CXAP, hipótese que requer futuras investigações.

REFERÊNCIAS¹

- Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 1997 June;410(1):83-6.
- Altemani A, Martins MT, Freitas L, Soares F, Araújo NS, Araújo VC. Carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXP): immunoprofile of the cells involved in carcinomatous progression. *Histopathology.* 2005 June;46(6):635-41.
- Araújo NS, Araújo VC. *Patologia Bucal.* São Paulo: Artes Médicas; 1984.
- Araújo VC, Altemani A, Furuse C, Martins MT, de Araújo NS. Immunoprofile of reactive salivary myoepithelial cells in intraductal areas of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Oral Oncol.* 2006 Nov;42(10):1011-6.
- Araújo VC, Sousa SO, Carvalho YR, Araújo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000 Sept;8(3):195-202.
- Araújo VC, Furuse C, Cury PR, Altemani A, Alves VA, de Araújo NS. Tenascin and fibronectin expression in carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008 Jan;16(1):48-53.
- Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. *Oral anatomy, histology and embryology.* 3a ed. Londres: Mosby; 2002.
- Bertics PJ, Chen WS, Hubler L, Lazar CS, Rosenfeld MG, Gill GN. Alteration of epidermal growth factor receptor activity by mutation of its primary carboxyl-terminal site of tyrosine self-phosphorylation. *J Biol Chem.* 1988 15;263(8):3610-7.
- Bloomston M, Bhardwaj A, Ellison EC, Frankel WL. Epidermal growth factor receptor expression in pancreatic carcinoma using tissue microarray technique. *Dig Surg.* 2006;23(1-2):74-9.
- Bralet MP, Paule B, Falissard B, Adam R, Guettier C. Immunohistochemical variability of epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver metastases from colonic carcinomas. *Histopathology.* 2007 Jan;50 (2):210-6.
- Brandwein M, Huvos AG, Dardick I, Thomas MJ, Theise ND. Noninvasive and minimally invasive carcinoma ex mixed tumor: a clinicopathologic and ploidy study of 12 patients with major salivary tumors of low (or no?) malignant potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81(6):655-64.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249-57.
- Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990 May 15; 265(14):7709-12.

¹ De acordo com o Manual de Normatização de Monografias da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, baseado no estilo Vancouver de 2007 e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Carpenter G. The biochemistry and physiology of the receptor-kinase for epidermal growth factor. *Mol Cell Endocrinol*. 1983 July;31(1):1-19.

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

Cimbaluk D, Rotmensch J, Scudiere J, Gown A, Bitterman P. Uterine carcinosarcoma: immunohistochemical studies on tissue microarrays with focus on potential therapeutic targets. *Gynecol Oncol*. 2007 Apr; 105(1):138-44.

Cohen S, Carpenter G, King L Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem*. 1980 May;255(10):4834-42.

Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem*. 1962 May;237(5):1555-62.

Dabbs DJ, Chivukula M, Carter G, Bhargava R. Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. *Mod Pathol*. 2006 Nov; 19(11):1506-11.

Dardick I, Ostrynski VL, Ekem JK, Leung R, Burford-Mason AP. Immunohistochemical and ultrastructural correlates of muscle-actin expression in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas based on comparison of formalin and methanol fixation. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;421(2):95-104.

Dardick I. *Colour atlas/text of Salivary Gland Tumor Pathology*. New York: Igaku-Shoin Medical; 1996.

Das M, Fox CF. Molecular mechanism of mitogen action: processing of receptor induced by epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978 June;75(6):2644-8.

Das M, Miyakawa T, Fox CF, Pruss RM, Aharonov A, Herschman HR. Specific radiolabeling of a cell surface receptor for epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977 July;74(7):2790-4.

Fimiani V, Gulletta E, Venza Teti D, Sbaraglia G. Studies of the specific receptor for epidermal growth factor. Characteristics of the binding of EGF to purified plasma membranes of bovine corneal epithelium. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1973 Aug 15;49(15):933-937.

Fox CF, Das M. Internalization and processing of the EGF receptor in the induction of DNA synthesis in cultured fibroblasts: the endocytic activation hypothesis. *J Supramol Struct*. 1979;10(2):199-214.

David M, Wong L, Flavell R, Thompson SA, Wells A, Lerner SA, Johnson GR. STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J Biol Chem*. 1996;9185-9188.

Demasi AP, Furuse C, Soares AB, Altemani A, Araújo VC. Peroxiredoxin I, PDGF-A and PDGFR-alpha are overexpressed in carcinoma ex-pleomorphic adenoma: association with tumor malignization. *Human Pathology* [in press].

Diniz-Freitas M, García-Caballero T, Antúnez-López J, Gándara-Rey JM, García-García A. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2007 May;13(3):285-90.

DiRenzo J, Signoretti S, Nakamura N, Rivera-Gonzalez R, Sellers W, Loda M, Brown M. Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Res.* 2002 Jan;62(1):89-98.

Dobashi Y, Suzuki S, Sugawara H, Ooi A. Involvement of epidermal growth factor receptor and downstream molecules in bone and soft tissue tumors. *Hum Pathol.* 2007 June;38(6):914-25.

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

Eveson JW, Kusafuka K, Stenman G, Nagano T. Pleomorphic adenoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours*, 1st ed. Lyon: IARC Press; 2005. p.254-258.

Fallon JH, Seroogy KB, Loughlin SE, Morrison RS, Bradshaw RA, Knaver DJ, Cunningham DD. Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: location and development. *Science.* 1984 June;224(4653):1107-9.

Fan CY, Melhem MF, Hosal AS, Grandis JR, Barnes EL. Expression of androgen receptor, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor alpha in salivary duct carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 Sept;127(9):1075-9.

Félix A, Rosa JC, Fonseca I, Cidadão A, Soares J. Pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma: immunohistochemical demonstration of the association between tenascin expression and malignancy. *Histopathology.* 2004 Aug;45(2):187-92.

Ferrer-Soler L, Vazquez-Martin A, Brunet J, Menendez JA, De Llorens R, Colomer R. An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa) -induced changes in the expression and nucleocytoplasmic trafficking of HER-ligands. *Int J Mol Med.* 2007 July;20(1):3-10.

Fimiani V, Gulletta E, Venza Teti D, Sbaraglia G. Studies of the specific receptor for epidermal growth factor. Characteristics of the binding of EGF to purified plasma membranes of bovine corneal epithelium. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1973 Aug;49(15):933-7.

Fischer C, Zlobec I, Stöckli E, Probst S, Storck C, Tornillo L, Lugli A, Wolfensberger M, Terracciano L. Is immunohistochemical epidermal growth factor receptor expression overestimated as a prognostic factor in head-neck squamous cell carcinoma? A retrospective analysis based on a tissue microarray of 365 carcinomas. *Hum Pathol.* 2008 Oct;39(10):1527-34.

Fox CF, Das M. Internalization and processing of the EGF receptor in the induction of DNA synthesis in cultured fibroblasts: the endocytic activation hypothesis. *J Supramol Struct.* 1979;10(2):199-214.

Furuse C, Altemani A, Araújo NS, Araújo VC. Immunoexpression of HGFA in different degrees of invasion of carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Virchows Arch.* 2008;452 (Supl1):S1-S286.

Gibbons MD, Manne U, Carroll WR, Peters GE, Weiss HL, Grizzle WE. Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope.* 2001 Aug;111(8):1373-8.

Gnepp DR, Brandwein-Gensler MS, El-Naggar AK, Nagao T. Carcinoma ex pleomorphic adenoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, ed. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours.* Lyon: IARC Press; 2005. p. 242-3.

Gnepp DR. Malignant mixed tumors of the salivary glands: a review. *Pathol Annu.* 1993;28(Pt 1):279-328.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling, *EMBO J.* 1997;16:1647-55.

Committee On Immunohistochemistry Standardization. Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007 June;15(2):124-33.

Gusterson B, Cowley G, McIlhinney J, Ozanne B, Fisher C, Reeves B. Evidence for increased epidermal growth factor receptors in human sarcomas. *Int J Cancer.* 1985 Dec;36(6):689-93.

Gusterson B, Cowley G, Smith JA, Ozanne B. Cellular localisation of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Int Rep.* 1984 Aug;8(8):649-58.

Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999 Apr; 11(2):184-9.

Hamakawa H, Nakashiro K, Sumida T, Shintani S, Myers JN, Takes RP, Rinaldo A, Ferlito A. Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer. *Head Neck.* 2008 June;30(6):800-9.

Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer.* 2004 Dec;11(4):689-708.

Helin K, Velu T, Martin P, Vass WC, Allevato G, Lowy DR, Beguinot L. The biological activity of the human epidermal growth factor receptor is positively regulated by its C-terminal tyrosines. *Oncogene.* 1991 May; 6(5):825-32.

Hendler FJ, Ozanne BW. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest.* 1984 Aug;74(2):647-51.

Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal.* 2006 Dec; 18(12):2089-97. Epub 2006 May 24.

Hollenberg MD, Gregory H. Human urogastrone and mouse epidermal growth factor share a common receptor site in cultured human fibroblasts. *Life Sci.* 1977 Jan;20(2):267-74.

Hoyek-Gebeily J, Nehmé E, Aftimos G, Sader-Ghorra C, Sargi Z, Haddad A. Prognostic significance of EGFR, p53 and E-cadherin in mucoepidermoid cancer of the salivary glands: a retrospective case series. *J Med Liban*. 2007 Apr-June; 55(2):83-8.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10; 284(1):31-53.

Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Expression of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor-alpha and Ki-67 in relationship to malignant transformation of pleomorphic adenoma. *Acta Otolaryngol*. 2007 May; 8:1-7

Kim HP, Han SW, Kim SH, Im SA, Oh DY, Bang YJ, Kim TY. Combined lapatinib and cetuximab enhance cytotoxicity against gefitinib-resistant lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2008 Mar;7(3):607-15.

Laimer K, Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Brunhuber T, Fong D, Barbieri V, Jank S, Doppler W, Rasse M, Norer B. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol*. 2007 Feb;43 (2):193-8.

Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J, Von Weyhern C, Reiter R, Feith M et al. Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in esophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study. *J Clin Pathol*. 2006 Jun;59(6):631-4.

Lee JC, Wang ST, Chow NH, Yang HB. Investigation of the prognostic value of co expressed erbB family members for the survival of colorectal cancer patients after curative surgery. *Eur J Cancer*. 2002 May;38(8):1065-71.

Lee LS, Weinstein IB. Tumor-promoting phorbol esters inhibit binding of epidermal growth factor to cellular receptors. *Science*. 1978 Oct 20;202(4365):313-5.

Leong AS, Leong TY. Newer developments in immunohistology. *J Clin Pathol*. 2006 Nov;59(11):1117-26.

Leong JL, Loh KS, Putti TC, Goh BC, Tan LK. Epidermal growth factor receptor in undifferentiated carcinoma of the nasopharynx. *Laryngoscope*. 2004 Jan; 114(1):153-7.

Lewis JE, Olsen KD, Sebo TJ. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. *Hum Pathol*. 2001 June;32(6):596-604.

Lewis S, Locker A, Todd JH, Bell JA, Nicholson R, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. Expression of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 1990 May;43(5):385-9.

Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*. 1985 Jan;313(5998):144-7.

Linsley PS, Blifield C, Wrann M, Fox CF. Direct linkage of epidermal growth factor to its receptor. *Nature*. 1979 Apr;278(5706):745-8.

Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer*. 2007;96(Suppl):r16-20.

Lo HW, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang SF, Hung MC. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Jan;65(1):338-48.

Mallikarjuna K, Pushparaj V, Biswas J, Krishnakumar S. Expression of epidermal growth factor receptor, ezrin, hepatocyte growth factor, and c-Met in uveal melanoma: an immunohistochemical study. *Curr Eye Res*. 2007 Mar;32(3):281-90.

Matsubayashi S, Yoshihara T. Carcinoma ex pleomorphic adenoma of the salivary gland: an immunohistochemical study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007 July;264(7):789-95.

Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol*. 2006 Aug;33(4):369-85.

Merlino GT, Xu YH, Ishii S, Clark AJ, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T, Pastan I. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science*. 1984 Apr 27;224(4647):417-9.

Merlino GT, Xu YH, Richert N, Clark AJ, Ishii S, Banks-Schlegel S, Pastan I. Elevated epidermal growth factor receptor gene copy number and expression in a squamous carcinoma cell line. *J Clin Invest*. 1985 Mar;75(3):1077-9.

Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R. Epithelial immaturity and multi organ failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1995 July; 376(6538): 337-41.

Möller P, Mechtersheimer G, Kaufmann M, Moldenhauer G, Momburg F, Mattfeldt T, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in benign and malignant primary tumors of the breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1989;414(2):157-64.

Moorghen M, Ince P, Finney KJ, Watson AJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptors in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 1990;10(3):605-11.

Mosesson Y, Yarden Y. Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. *Semin Cancer Biol*. 2004 Aug;14(4):262-70.

Mukaida H, Yamamoto T, Hirai T, Toi M, Nakamura T, Wada T, Yamashita Y, Kawano K, Niimoto M. Expression of human epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Jpn J Surg*. 1990 May;20(3):275-82.

Nagao T, Sugano I, Ishida Y, Hasegawa M, Matsuzaki O, Konno A et al. Basal cell adenocarcinoma of the salivary glands: comparison with basal cell adenoma through assessment of cell proliferation, apoptosis, and expression of p53 and bcl-2. *Cancer*. 1998 Feb 1;82(3):439-47.

Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*. 2005;1:20.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human

epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*. 2002 Sept;110(6):775-87.

O'Keefe E, Hollenberg MD, Cuatrecasas P. Epidermal growth factor. Characteristics of specific binding in membranes from liver, placenta, and other target tissues. *Arch Biochem Biophys*. 1974 Oct;164(2):518-26.

Partridge M, Gullick WJ, Langdon JD, Sherriff M. Expression of epidermal growth factor receptor on oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Oct;26(5):381-9.

Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol*. 2006 Feb;8(2):77-82.

Pilichowska M, Kimura N, Fujiwara H, Nagura H. Immunohistochemical study of TGF-alpha, TGF-beta1, EGFR, and IGF-1 expression in human breast carcinoma. *Mod Pathol*. 1997 Oct;10(10):969-75.

Psyrris A, Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Haffty B, Camp R, Rimm D, Burtness BA. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug;11(16):5856-62.

Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 1999;11(3):162-7.

Rosa JC, Fonseca I, Félix A, Soares J. Immunohistochemical study of c-erbB-2 expression in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Histopathology*. 1996 Mar;28(3):247-52.

Sainsbury JR, Farndon JR, Harris AL, Sherbet GV. Epidermal growth factor receptors on human breast cancers. *Br J Surg*. 1985 Mar;72(3):186-8.

Santini D, Ceccarelli C, Tardio ML, Taffurelli M, Marrano D. Immunocytochemical expression of epidermal growth factor receptor in myoepithelial cells of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002 Mar;10(1):29-33.

Schreiber AB, Libermann TA, Lax I, Yarden Y, Schlessinger J. Biological role of epidermal growth factor-receptor clustering. Investigation with monoclonal anti-receptor antibodies. *J Biol Chem*. 1983 Jan 25;258(2):846-53.

Seifert G, Sobin LH. The World Health Organization's Histological Classification of Salivary Gland Tumors. A commentary on the second edition. *Cancer*. 1992 Jul;70(2):379-85.

Shafer WG, Hine MK, Levi BM. *Tratado de patologia bucal*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1987

Shang J, Shui Y, Sheng L, Wang K, Hu Q, Wei Q. Epidermal growth factor receptor and human epidermal growth receptor 2 expression in parotid mucoepidermoid carcinoma: possible implications for targeted therapy. *Oncol Rep*. 2008 Feb;19(2):435-40.

Shiurba RA, Eng LF, Vogel H, Lee YL, Horoupian DS, Urich H. Epidermal growth factor receptor in meningiomas is expressed predominantly on endothelial cells. *Cancer*. 1988 Nov;62(10):2139-44.

- Sibilia M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J*. 1998 Feb;17(3):719-31.
- Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*. 2005 Oct;17(10):1183-93.
- Smith JS, Lal A, Harmon-Smith M, Bollen AW, McDermott MW. Association between absence of epidermal growth factor receptor immunoreactivity and poor prognosis in patients with atypical meningioma. *Neurosurg*. 2007 June;106(6):1034-40.
- Soares AB, Juliano PB, Araujo VC, Metze K, Altemani A. Angiogenic switch during tumor progression of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Virchows Arch*. 2007 July; 451(1): 65-71.
- Spiro RH, Huvos AG, Strong EW. Malignant mixed tumor of salivary origin: a clinicopathologic study of 146 cases. *Cancer*. 1977 Feb;39(2):388-96.
- Sugiyama K, Yonemura Y, Miyazaki I. Immunohistochemical study of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma. *Cancer*. 1989 Apr;63(8):1557-61.
- Talley L, Chhieng DC, Bell WC, Grizzle WE, Frost AR. Immunohistochemical detection of EGFR, p185(erbB-2), Bcl-2 and p53 in breast carcinomas in pre-menopausal and post-menopausal women. *Biotech Histochem*. 2008 Feb;83(1):5-14.
- Thomas SM, Coppelli FM, Wells A, Gooding WE, Song J, Kassis J, Drenning SD, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Sept;63(17):5629-35.
- Todaro GJ, Fryling C, de Larco JF. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: Polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 1980 Sept;77(9):5258-62.
- Tortoledo ME, Luna MA, Batsakis JG. Carcinomas ex pleomorphic adenoma and malignant mixed tumors. Histomorphologic indexes. *Arch Otolaryngol*. 1984 Mar;110(3):172-6.
- Tsuda H, Tani Y, Weisenberger J, Kitada S, Hasegawa T, Murata T, Tamai S, Hirohashi S, Matsubara O, Natori T. Frequent KIT and epidermal growth factor receptor overexpressions in undifferentiated-type breast carcinomas with 'stem-cell-like' features. *Cancer Sci*. 2005 June; 96(6): 333-9.
- Van der Groep P, Bouter A, van der Zanden R, Menko FH, Buerger H, Verheijen RH, van der Wall E, van Diest PJ. Re: Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004 May 5;96(9):712-3.
- Veale D, Ashcroft T, Marsh C, Gibson GJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1987 May;55(5):513-6.
- Vered M, Braunstein E, Buchner A. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Head Neck*. 2002 July; 24(7):632-6.

Wang KL, Wu TT, Choi IS, Wang H, Reseetkova E, Correa AM, Hofstetter WL, Swisher SG, Ajani JA, Rashid A, Albarracin CT. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer*. 2007 Feb 15;109(4):658-67.

Wang L, Gao Y, Yang L. Significance of expression of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor beta, c-erbB-2 oncogene in myoepithelioma of salivary gland. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1999 Mar;34 (2):100-2.

Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*. 1985 Jan 10-18;313(5998):144-7.

Wei Q, Chen L, Sheng L, Nordgren H, Wester K, Carlsson J. EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumors and corresponding metastases. *Int J Oncol*. 2007 Sept;31(3):493-9.

Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 June;31(6):637-43.

Wrba F, Reiner A, Ritzinger E, Holzner JH, Reiner G. Expression of epidermal growth factor receptors (EGFR) on breast carcinomas in relation to growth fractions, estrogen receptor status and morphological criteria. An immunohistochemical study. *Pathol Res Pract*. 1988 Feb;183(1):25-9.

Xu YH, Richert N, Ito S, Merlino GT, Pastan I. Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Dec;81(23):7308-12.

Yamada K, Iwai K, Okada Y, Mori M. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in salivary gland tumors. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1989;415(6):523-31.

Yamamoto T, Fujita I, Akisue T, Marui T, Nakatani T, Kawamoto T, Hitora T, Nagira K, Matsumoto K, Kurosaka M. Amphiregulin and epidermal growth factor receptor expression in human malignant fibrous histiocytoma of soft tissues. *Anticancer Res*. 2004 Mar-Apr;24(2C):1307-10.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*. 2001 Sept;37(Suppl 4):S3-8.

Younes MN, Park YW, Yazici YD, Gu M, Santillan AA, Nong X et al. Concomitant inhibition of epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases reduces growth and metastasis of human salivary adenoid cystic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Mol Cancer Ther*. 2006 Nov;5(11):2696-705.

APÊNDICE A - CXAP

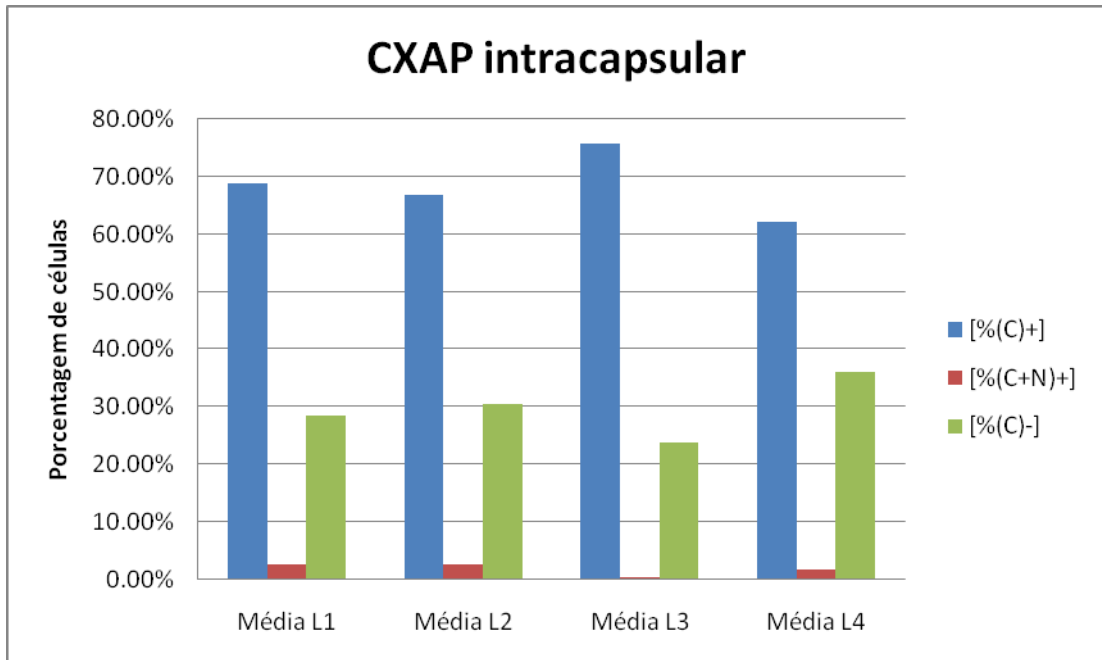


Gráfico 2 - Média da expressão do EGFR no CXAP intracapsular, por espécime (L1, L2, L3 e L4).

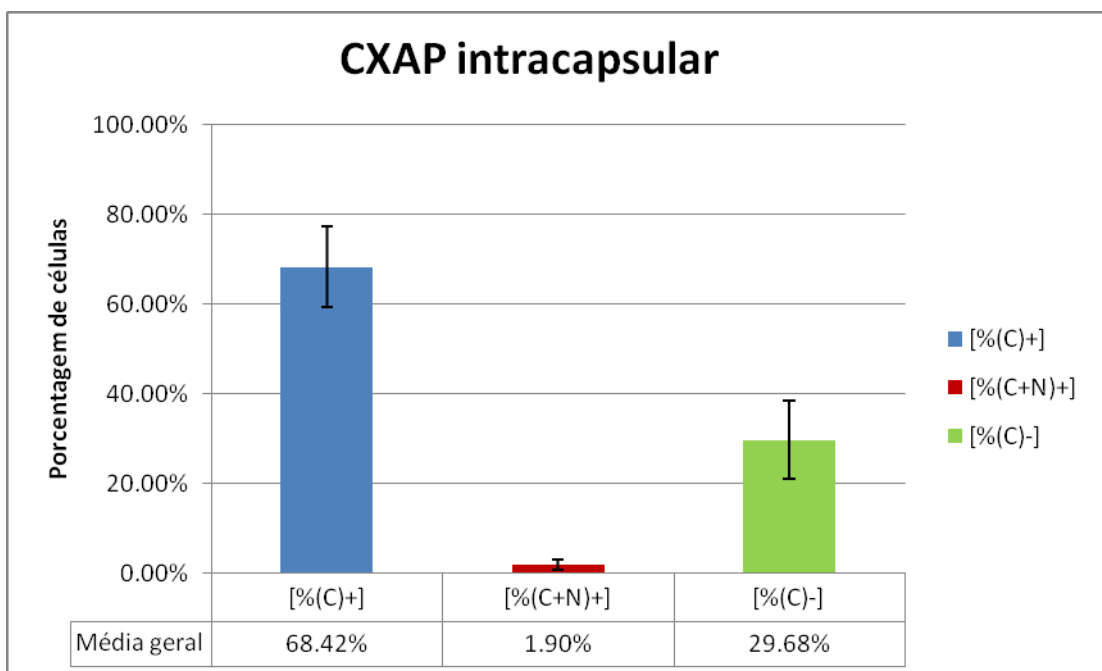


Gráfico 3 - Média geral da expressão do EGFR em todos os espécimes de CXAP intracapsular.

[% (C) +]: células com expressão citoplasmática positiva para o EGFR;
 [% (C+N) +]: células com expressão citoplasmática e nuclear positiva para o EGFR;
 [% (C) -]: células negativas ao EGFR

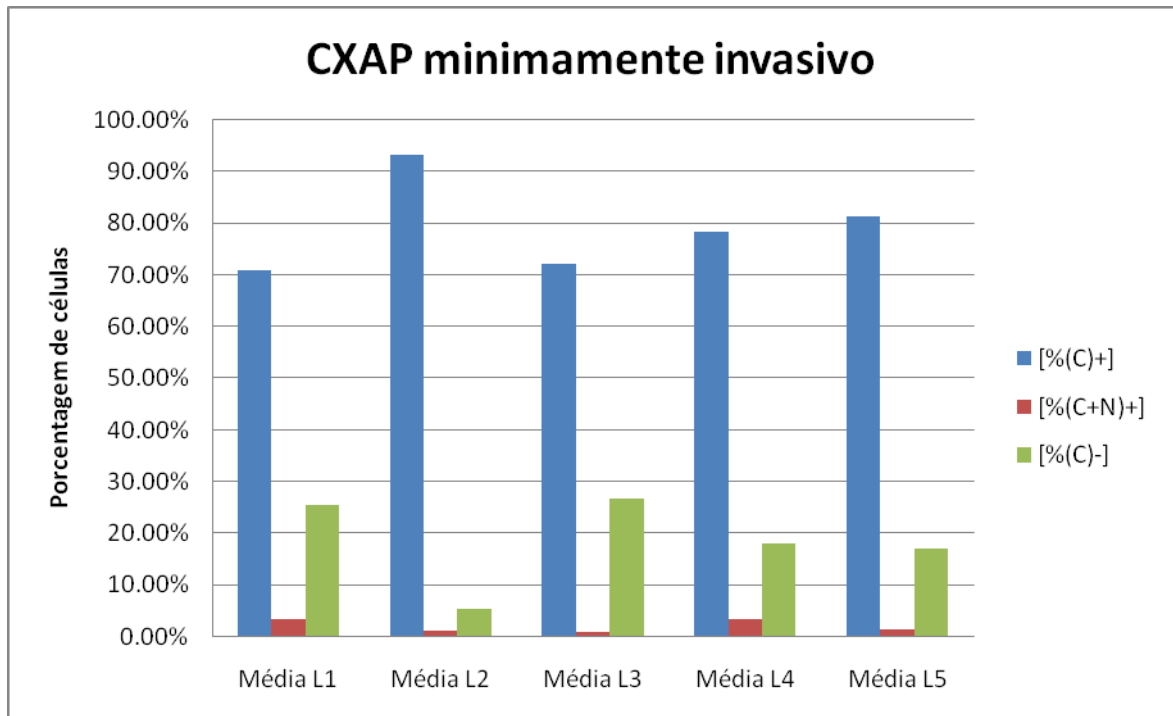


Gráfico 4 - Média da expressão do EGFR no CXAP minimamente invasivo, por espécime (L1, L2, L3, L4 e L5).

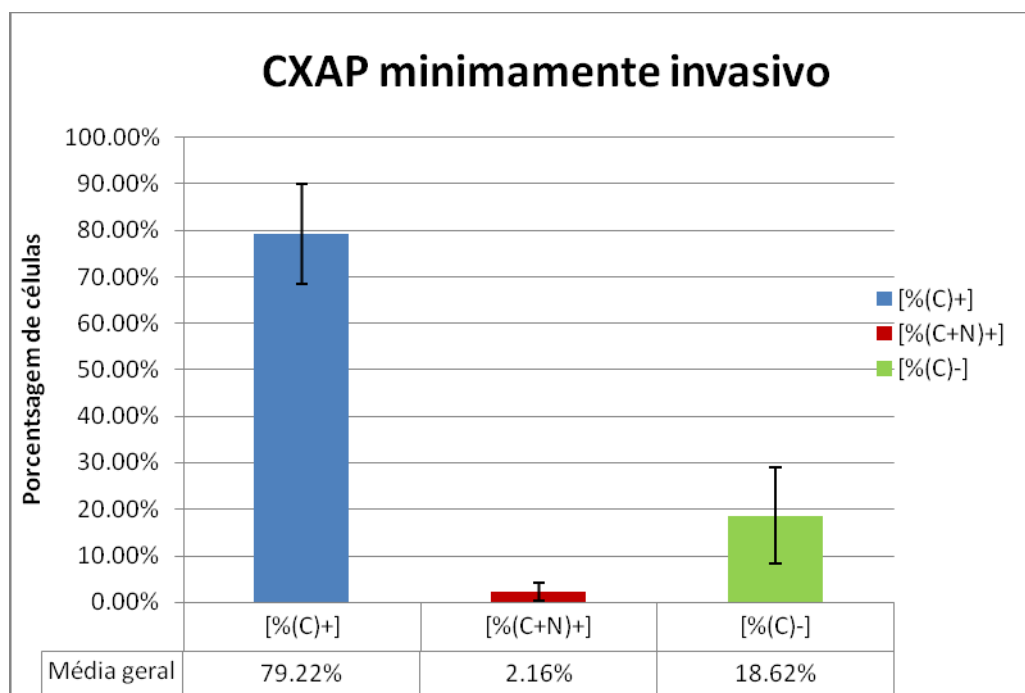


Gráfico 5 - Média geral da expressão do EGFR em todos os espécimes de CXAP minimamente invasivo.

[% (C) +]: células com expressão citoplasmática positiva para o EGFR;
 [% (C+N) +]: células com expressão citoplasmática e nuclear positiva para o EGFR;
 [% (C) -]: células negativas ao EGFR

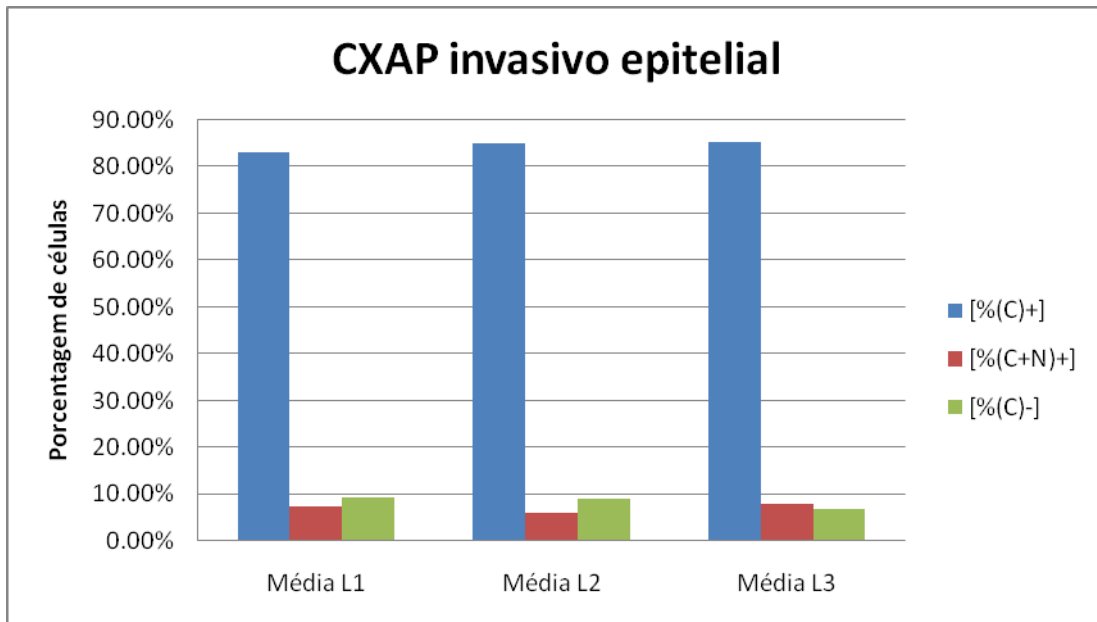


Gráfico 6 - Média da expressão do EGFR no CXAP francamente invasivo com componente epitelial, por espécime (L1, L2, e L3).

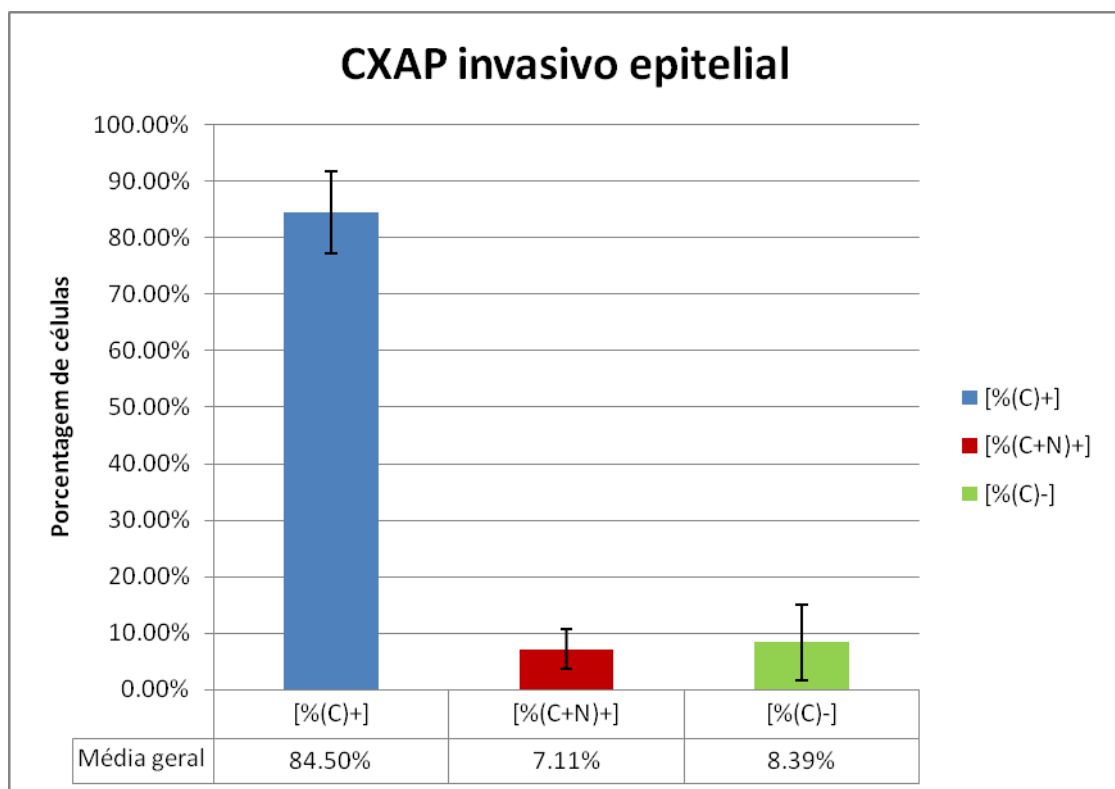


Gráfico 7 - Média geral da expressão do EGFR em todos os espécimes de CXAP francamente invasivo com componente epitelial.

[% (C) +]: células com expressão citoplasmática positiva para o EGFR;
 [% (C+N) +]: células com expressão citoplasmática e nuclear positiva para o EGFR;
 [% (C) -]: células negativas ao EGFR

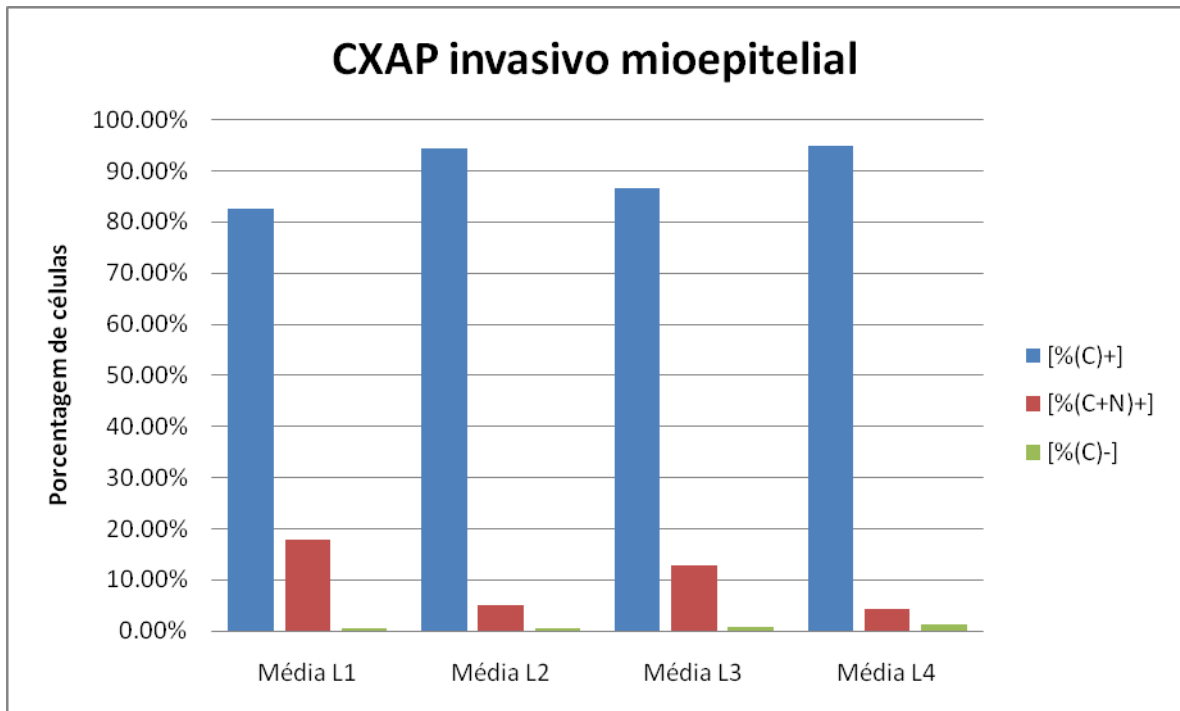


Gráfico 8 - Média da expressão do EGFR no CXAP francamente invasivo com componente mioepitelial, por espécime (L1, L2, L3 e L4).

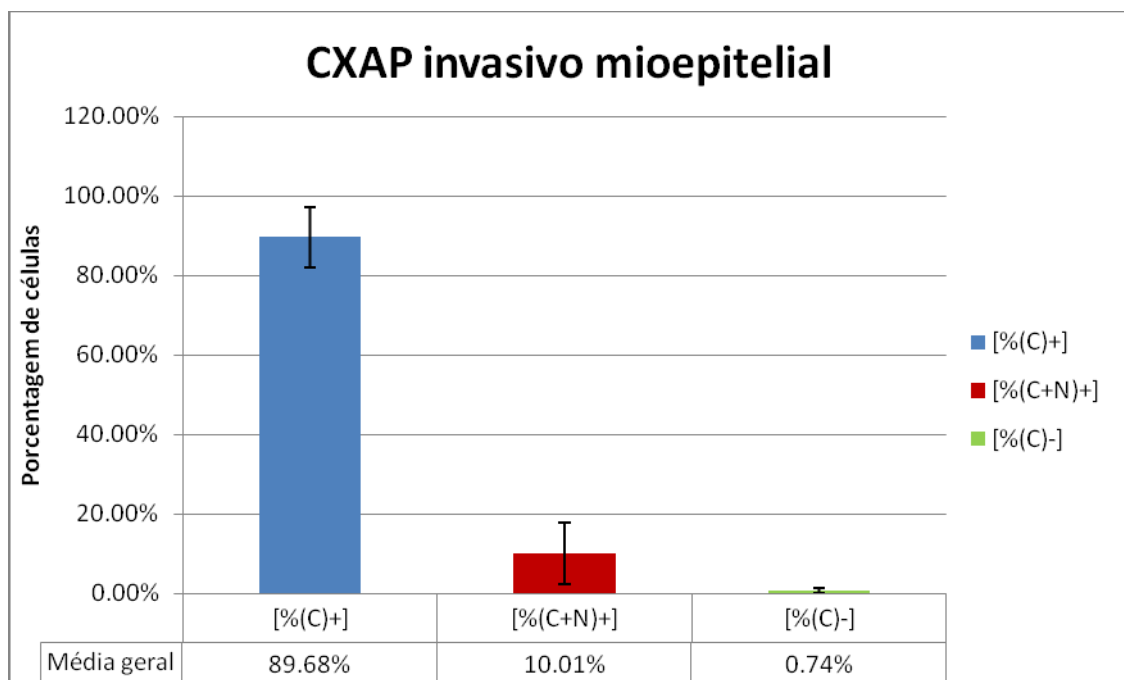


Gráfico 9 - Média geral da expressão do EGFR em todos os espécimes de CXAP francamente invasivo com componente mioepitelial.

[% (C) +]: células com expressão citoplasmática positiva para o EGFR;
 [% (C+N) +]: células com expressão citoplasmática e nuclear positiva para o EGFR;
 [% (C) -]: células negativas ao EGFR

ANEXO A – DISPENSA DO COMITE DE ETICA EM PESQUISA**Dispensa de Submissão**

Campinas, 22 de outubro de 2007.

A

C. D. Ana Cláudia Garcia Rosa

Curso: **Mestrado em Patologia Bucal**

Prezado (a) Aluno (a):

O projeto de sua autoria "**EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL E SEU RECEPTOR EM NEOPLASIA DE GLÂNDULAS SALIVARES**".

Orientado (a) pelo (a) Professor (a) Dr.(a) Vera Cavalcanti de Araújo.

Entregue na Secretaria de Pós-graduação do C.P.O. São Leopoldo Mandic, no dia 05/10/2007 com número de protocolo nº **07/258 NÃO SERÁ SUBMETIDO AO RESPECTIVO COMITÊ**, nesta Instituição, por tratar-se exclusivamente de pesquisa laboratorial, sem envolvimento de seres humanos ou animais.

Cordialmente

Prof. Dr. Thomaz Wassall
Coordenador de Pós-Graduação