

LUCYENE MIGUITA

**ESTUDO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS E SEUS
RECEPTORES NO ADENOMA PLEOMÓRFICO E CARCINOMA EX-ADENOMA
PLEOMÓRFICO**

CAMPINAS

2008

LUCYENE MIGUITA

**ESTUDO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS E SEUS
RECEPTORES NO ADENOMA PLEOMÓRFICO E 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

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane Furuse

CAMPINAS

2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

M635e Miguita, Lucyene.
Estudo do fator de crescimento de fibroblastos e seus receptores no adenoma pleomorfo e carcinoma ex-adenoma pleomórfico / Lucyene Miguita. – Campinas: [s.n.], 2008.
85f.: il.

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

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

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

Folha de Aprovação

A dissertação intitulada: **“ESTUDO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS E SEUS RECEPTORES NO ADENOMA PLEOMÓRFICO E CARCINOMA EX-ADENOMA PLEOMÓRFICO”** apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: Patologia Bucal em 06/10/2008, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo
Orientadora

Profa. Dra. Cristiane Furuse
1º Membro

Profa. Dra. Andrea Mantesso
2º Membro

Dedico esta tese às pessoas que mais amo: minha mãe, *Kiyoko*, exemplo de perseverança e generosidade; meu pai, *Umberto*, exemplo de positivismo; meu “irmãozinho”, *Wylliam*, grande amigo e exemplo de simplicidade; ao *Sandro*, companheiro de minha vida e confidente; e finalmente (*in memoriam*) à minha avó Tsuruko Kiritani, quem cuidava de mim enquanto meus pais trabalhavam e uma das responsáveis pela existência desta família no Brasil. Que Deus a tenha!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais pelo apoio e incentivo aos estudos, nunca deixando desistir de meus objetivos e, principalmente, por viabilizar a realização deste sonho. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês!!

À Professora (Emérita) Doutora Vera Cavalcanti de Araújo, gostaria de agradecer pelo privilégio de tê-la como orientadora e conselheira, pela honra do conhecimento recebido, pelo aprendizado de ética, por me receber em sua própria residência para me orientar, e acima de tudo, pelo exemplo de profissionalismo e humildade, apesar de toda a maestria que a senhora possui. Obrigada por acreditar em mim!

Ao Professor (Emérito) Doutor Ney Soares de Araújo, agradeço pelo tempo, paciência e atenção dada durante as aulas, por ensinar que além da patologia devemos ver o indivíduo como todo, e, principalmente, pela honra de termos mais um professor emérito no mestrado de patologia bucal da São Leopoldo Mandic!!

À Professora Doutora Albina Altemani, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, pelos casos cedidos, viabilizando a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Cristiane Furuse, pelos “puxões de orelhas”, pelos ensinamentos e contribuição na orientação da tese. Muito obrigada!

À Professora Doutora Elizabeth Ferreira Martinez pelo incentivo, generosidade e exemplo de que é possível conciliar a carreira acadêmica com a clínica. Obrigada por toda ajuda que tem me dado! E devo estender este agradecimento aos seus pais, que, com muita simpatia, sempre me receberam à porta da casa para receber material de pesquisa, muitas vezes “tarde da noite”! Obrigada!

À Professora Doutora Ana Paula Dias Demasi pelos esclarecimentos moleculares, essenciais para o entendimento deste estudo como um todo. Muito obrigada!!

À Professora Doutora Andresa Borges Soares, pelos conselhos e ajuda de referências bibliográficas cedidas. Obrigada!

À Jeruza Pinheiro Silveira Bossonaro e à Professora Audrey Jordão Basso pela super ajuda na execução laboratorial deste estudo. Não sei o que seria de mim sem vocês!! Vocês são uns amores!

Ao Instituto e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic, por toda estrutura e suporte na realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto temático (04/07960-0), o qual este estudo fez parte.

Não posso esquecer-me de agradecer aos meus amigos do mestrado, com orgulho, a 1ª Turma de Mestrado em Patologia Bucal da São Leopoldo Mandic: Alexandre, Ana Cláudia, Cássio, (Mãezona) Cris Matni, Flavinho, Guilherme, Kika Monteiro, Lari, Letícia, (Luiz) Sérgio, Zé Antônio. Agradeço a todos pela amizade, pelo carinho fraternal, troca de experiências divididas e pelos felizes momentos que passamos juntos durante o curso. Saibam que podem contar comigo para o que precisarem!

E por fim, ao meu namorado, agradeço por ceder grande parte de seu tempo, deixando compromissos com amigos, ficando muitos finais de semana fazendo almoços e jantares para mim, para que eu pudesse fazer a tese, aulas e seminários... Obrigada pela paciência, carinho e companheirismo!!

Demorou, mas conseguimos alcançar mais uma etapa!!

“Aprendi que se aprende errando.
Que crescer não significa fazer aniversário.
Que o silêncio é a melhor resposta, quando se ouve uma bobagem.
Que trabalhar significa não só ganhar dinheiro.
Que amigos a gente conquista mostrando o que somos.
Que verdadeiros amigos sempre ficam com você até o fim.
Que não se espera a felicidade chegar, mas se procura por ela.
Que quando penso saber tudo ainda não aprendi nada. [...]”

Herman Melville

“Que um mestrado é único e vale para vida toda.”

Desconhecido

RESUMO

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) está associado a processos biológicos e neoplásicos, via receptores transmembrana tirosina quinase, porém pouco elucidado em tumores de glândula salivar. Entre os tumores de glândula salivar o adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia benigna mais frequente e com capacidade de malignização para carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP), consistindo um bom modelo de estudo da evolução da carcinogênese. Para investigar a expressão do FGF-2 e seus receptores, FGFR-1 e FGFR-2, na progressão do AP em CXAP, foram utilizados três casos de AP e quinze casos de CXAP em variados graus de invasão - intracapsulado (IC), minimamente invasivo (MI) e francamente invasivo (FI) com componente epitelial apenas e/ou componente mioepitelial - pela técnica imunoistoquímica. Percentual de células positivas foi calculado em cinco campos aleatórios em aumento de 400x, contendo no mínimo 500 células, com auxílio de programa de imagem. Foi observado que o FGF-2 está fortemente expresso no AP (85,08%) e CXAP (89,94% IC, 88,47% MI, 80,15% FI epitelial, 73,70% FI epitelial/mioepitelial, 99,46% FI mioepitelial). O receptor mais expresso no AP foi o FGFR-1(46,43%) comparado ao FGFR-2 (2,66%), enquanto que o CXAP apresentou a expressão de ambos receptores, FGFR-1 (79,17% IC, 79,55% MI, 63,76% FI epitelial, 81,30% FI epitelial/mioepitelial e 99,52% FI mioepitelial) e FGFR-2 (90,68% IC, 61,37% MI, 81,42% FI epitelial, 60,81% FI epitelial/mioepitelial e 99,80% FI mioepitelial). Nos carcinomas minimamente invasivos, pequenos ninhos celulares foram parcialmente negativos ao FGF-2 e FGFR-1. Em áreas *in situ*, onde células mioepiteliais benignas envolvem áreas carcinomatosas, foi observado um interessante fenômeno: o FGF-2 mostrou forte marcação nas células mioepiteliais benignas enquanto que ambos receptores foram negativos. Os resultados sugerem que o FGF-2 pode estar implicado na proliferação do AP e CXAP via FGFR-1 e na malignização via FGFR-2, e pode estar envolvido na diferenciação da célula mioepitelial benigna em áreas *in situ*, porém estas evidências necessitam de estudos mais profundos.

Palavras-chave: Adenoma pleomórfico. Fator de crescimento de fibroblastos. Carcinoma ex-adenoma pleomórfico.

ABSTRACT

The fibroblast growth factor (FGF) is associated with several biological and neoplastic processes by tyrosine kinase receptors, although poorly elucidated in salivary gland tumors. Pleomorphic adenoma (PA) is the most common salivary gland tumor with high potential to malignization turning into carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA), which is a good model to study the evolution of carcinogenesis. To investigate the function of FGF by receptors FGFR-1 (fibroblast growth factor receptor-1) and FGFR-2 (fibroblast growth factor receptor-2) among the progression of PA to CXPA we used three cases of PA and fifteen cases of CXPA in several degrees of invasion - intracapsular (IC), minimally invasive (MI) and frankly invasive (FI) carcinoma with epithelial component and/or myoepithelial component - by immunohistochemistry. Percentage of positive cells was evaluated in 5 assorted areas for each site with minimum of 500 cells at 400x, by computer assisted image analysis. The results revealed that FGF-2 is strongly expressed in PA (85,08%) and in CXPA (89,94% IC, 88,47% MI, 80,15% FI epithelial, 73,70% FI epithelial/myoepithelial, 99,46% FI myoepithelial). The most expressed receptor in PA was FGFR-1(46,43%) compared to FGFR-2 (2,66%), while CXPA presented both receptors expression: FGFR-1 (79,17% IC, 79,55% MI, 63,76% FI epithelial, 81,30% FI epithelial/myoepithelial e 99,52% FI myoepithelial) and FGFR-2 (90,68% IC, 61,37% MI, 81,42% FI epithelial, 60,81% FI epithelial/myoepithelial e 99,80% FI myoepithelial). In *in situ* areas, where benign myoepithelial cells are present around carcinomatous epithelial cells, an interesting phenomenon was observed: FGF-2 was strongly expressed in benign myoepithelial cells in which both receptors were negative. In conclusion the results suggested that FGF-2 seems to contribute to the proliferation of PA and CXPA by FGFR-1 and to malignization by FGFR-2. It was also suggested that FGF-2 can be somewhat responsible for the differentiation of benign myoepithelial cells. This however needs further investigation.

Keywords: Pleomorphic adenoma. Fibroblast growth factor. Carcinoma ex-pleomorphic adenoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vias de secreção de moléculas intracelulares.	18
Tabela 1 - Localização cromossomal e ligantes-específicos de FGFR em humanos.	20
Figura 2 - Esquema do complexo FGF: heparina: FGFR.	22
Figura 3 - Resumo das cascatas sinalizadas pelo FGFR.	24
Tabela 2 - Título e tempo de incubação dos anticorpos primários.	46
Tabela 3 - Sexo, idade, localização, componente e grau de invasão dos casos de AP e CXAP.	48
Figura 4 - Expressão imunoistoquímica de FGF e seus receptores em glândula salivar normal: A, C e E: glândula salivar menor com componente glandular mucoso e seroso; B, D e F: glândula salivar maior. A e B: expressão do FGF-2 nas estruturas ductiformes. C: expressão do FGFR-1 nas estruturas ductiformes da glândula salivar normal menor, setas indicam estruturas semilunares negativas ao FGFR-1, no detalhe observa-se forte expressão em ducto excretor. D: expressão do FGFR-1 nas estruturas ductiformes e células serosas. E: expressão do FGFR-2 nas estruturas ductiformes e semilunares (setas). F: expressão do FGFR-2 nas estruturas ductiformes em glândula salivar normal maior. Figuras em aumento de 400x.	51
Tabela 4 - Distribuição da expressão do FGF e seus receptores no AP, de acordo com a localização no núcleo e/ou citoplasma das células.	53
Figura 5 - Expressão imunoistoquímica de FGF e seus receptores FGFR-1 e FGFR-2 em AP: A, C, E: expressão do FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em aumento de 200x. B, D e F: detalhe da expressão dos imunomarcadores utilizados nas estruturas ductiformes. B: expressão do FGF-2, no núcleo (setas) e citoplasma de algumas células mioepiteliais em torno das estruturas ductiformes e expressão, ora positiva, ora negativa, nas células luminais. D: detalhe da expressão positiva do FGFR-1 em algumas células luminais e mioepiteliais, tanto em núcleo como no citoplasma das células. F: expressão do FGFR-2 no núcleo de algumas células luminais e mioepiteliais.	54
Figura 6 - Expressão imunoistoquímica de FGF e seus receptores FGFR-1 e FGFR-2 em áreas <i>in situ</i> do CXAP minimamente invasivo: A, C e E: células carcinomatosas positivas para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em aumento de 400x. B, D e F: detalhe em maior aumento das células mioepiteliais benignas (setas). B: células mioepiteliais benignas positivas ao FGF-2. D e F: células mioepiteliais benignas negativas aos receptores FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em áreas <i>in situ</i>	58

Figura 7- Expressão imunoistoquímica de FGF e seus receptores em CXAP minimamente invasivo e francamente invasivo com componente epitelial apenas: A, C e E: expressão positiva para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em ninhos de células carcinomatosas de CXAP minimamente invasivo e expressão parcial em blocos celulares menores (setas). B, D e F: expressão positiva para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em extensos lençóis de células carcinomatosas no CXAP francamente invasivo com componente epitelial apenas. Figuras em aumento de 400x.....	59
Figura 8 - Expressão imunoistoquímica de FGF e seus receptores em CXAP francamente invasivo com componente epitelial e mioepitelial: A, C e E: apresentando expressão positiva para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, nas células neoplásicas no CXAP francamente invasivo com componente epitelial e mioepitelial. B, D e F: expressão positiva para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, nas células neoplásicas de CXAP francamente invasivo com componente mioepitelial apenas. Figuras em aumento de 400x.....	60
Tabela 5 - Distribuição da expressão do FGF e seus receptores no CXAP, de acordo com a localização no núcleo e/ou citoplasma das células.....	61
Gráfico 1 - Expressão de FGF-2 e seus receptores no citoplasma das células de AP e CXAP.....	62
Gráfico 2 - Expressão do FGF-2 e seus receptores no núcleo das células de AP e CXAP.....	62
Gráfico 3 - Expressão do FGF-2 e seus receptores simultaneamente no citoplasma e núcleo das células de AP e CXAP.....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Fator de crescimento de fibroblastos.....	14
2.2 Receptores de fgf tirosina quinase e proteoglicanas heparan sulfato.....	20
2.3 FGF no desenvolvimento da glândula salivar	26
2.4 Fator de crescimento de fibroblastos em neoplasias	29
2.5 Adenoma pleomórfico.....	32
2.6 Carcinoma ex-adenoma pleomórfico.....	37
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
5 RESULTADOS.....	49
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO A - APROVAÇÃO DO CEP.....	85

1 INTRODUÇÃO

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é uma família de polipeptídios que está envolvida em vários processos como: desenvolvimento e reparação tecidual; sobrevivência de célula neural; angiogênese; quimiotaxia; migração e proliferação celular; progressão tumoral; media a diferenciação e o crescimento celular via receptores transmembrana tirosina quinase (FGFR) e/ou proteoglicanas heparan sulfato (HSPG) presentes na matriz extracelular (Myoken et al., 1997; Sumitomo et al., 1999; Ornitz, Itoh, 2001; Yura et al., 2001; Bossard et al., 2003).

Durante a progressão tumoral estas quimiocinas potencializam o crescimento tumoral, estimulam a angiogênese, induzem a diferenciação celular (Majno, Joris, 1996; Heldin, Westermark, 1999; Sumitomo et al., 1999; Bissel, Radisky, 2001; Kusafuka et al., 2001; Bossard et al., 2003; Presta et al., 2005; Schmahl et al., 2007) e permitem uma interação desequilibrada entre epitélio e estroma na tumorigênese (Grose, Dickson, 2005).

A atuação deste fator em tumores de glândula salivar não foi claramente estabelecida, porém estudos prévios efetuados em adenoma pleomórfico (AP) (Myoken et al., 1997; Kusafuka et al., 2001) e em carcinoma de glândula salivar (Sumitomo et al., 199; Yura et al., 2001) sugerem importante atuação do FGF-2 na patogênese destes tumores, assim como dos receptores FGFR-1 e FGFR-2.

O AP é a neoplasia epitelial benigna mais frequente em glândulas salivares e tem potencial de transformação maligna para carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) (Savera, Zarbo, 2004; Eveson et al., 2005). Este último constitui

um bom modelo de estudo da evolução da carcinogênese. Com base neste fato este estudo visou avaliar a expressão deste fator de crescimento (em específico o FGF-2) e seus receptores (FGFR-1 e FGFR-2) no CXAP, comparando esta expressão com a do AP, por meio da técnica imunohistoquímica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para elucidar a importância do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) no desenvolvimento do adenoma pleomórfico (AP) e carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) segue abaixo uma breve revisão de literatura sobre a estrutura e função do FGF e sua atuação nos tecidos, na glândula salivar e em lesões tumorais e sobre os tumores estudados.

2.1 Fator de crescimento de fibroblastos

O FGF é uma família de fatores de crescimento polipeptídios, com massa molecular variando de 17 a 34 kDa constituída por 13 a 71% de aminoácidos idênticos. Estes fatores são encontrados desde nematóides a humanos (Ornitz, Itoh, 2004) e estão envolvidos em vários processos biológicos como: desenvolvimento e reparação tecidual; angiogênese; quimiotaxia; migração e proliferação celular e tumorigênese. Mediam a diferenciação e o crescimento celular via receptores transmembrana tirosina quinase, que serão explicados no próximo tópico (Myoken et al., 1997; Sumitomo et al., 1999; Yura et al., 2001; Bossard et al., 2003; Jaskoll et al., 2004).

Gospodarowicz (1974) foi o primeiro a caracterizar um polipeptídio derivado de extrato ácido da glândula pituitária bovina, sendo primeiramente chamado de fator de crescimento de células ovarianas. Após observar a importância de extratos na manutenção da atividade biológica, Gospodarowicz (1975) purificou um polipeptídio mitogênico de fibroblastos de glândula pituitária bovina utilizando técnica similar de extração e purificação do estudo anteriormente citado, sendo o

mesmo nomeado de fator de crescimento de fibroblastos. Juntamente com Moran, Gospodarowicz (Gospodarowicz, Moran, 1975) demonstrou o efeito mitogênico do FGF sobre culturas primárias de fibroblastos bovinos, observando que o FGF adicionado ao soro fetal e ao meio de cultura duplicava a divisão celular. A partir deste período foram encontrados 22 genes (FGF-1 ao FGF-23) no genoma humano, incluindo o FGF-1 (FGF ácido, aFGF), FGF-2 (FGF básico, bFGF), FGF-3 (*int-2*), FGF-4 (HST-1/ K-FGF), FGF-5, FGF-6 (HST-2), FGF-7 (fator de crescimento de queratinócito), FGF-8 (fator de crescimento andrógeno-indutor), e FGF-9 (fator ativador glial), sendo o FGF-15 o único ainda não isolado em humanos (Myoken, 1997; Ornitz, Itoh, 2001; Yura et al., 2001; Grose, Dickson, 2005).

Alguns genes de FGF são expressos durante o desenvolvimento embrionário como, por exemplo, FGF3, 4, 8, 15 (em ratos), 17 e 19 (Ornitz & Itoh, 2001). Os mais amplamente estudados são FGF-1 e FGF-2, os quais são encontrados em células inflamatórias como fagócitos mononucleares, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e mastócitos (Presta et al., 2005), assim como, na matriz extracelular, no citoplasma e núcleo de células (Myoken et al., 1997; Ornitz, Itoh, 2001).

O FGF-2, fator estudado nesta pesquisa, é situado no cromossomo 4q25-q27 (Itoh, Ornitz, 2004) e apresenta cinco isoformas por tradução alternativa de um simples RNAm. A isoforma mais comumente encontrada na matriz extracelular e citoplasma das células possui baixo peso molecular, 18kDa, e media a migração e adesão celular através do aumento da expressão de integrinas e degradação de caderinas de células endoteliais (Presta et al., 2005). As outras isoformas, de alto peso molecular, variam de 22 a 34kDa, são nucleares e estimulam o crescimento celular (Florkiewicz, Sommer, 1989; Allouche, Bikfalvi, 1995; Okada-Ban et al., 1999; Dow, deVere White, 2000; Ornitz, Itoh, 2001). Quando estão superexpressas,

promovem a imortalização celular (Delrieu, 2000; Yeoh, Haan, 2007), proliferação celular em meio de cultura, além de induzir a transformação fenotípica (Yu et al., 1993; Delrieu, 2000; Presta et al., 2005; Yeoh, Haan, 2007) e migração celular (Delrieu, 2000; Presta et al., 2005).

A secreção extracelular de FGF pode-se originar passivamente de lise celular ou membrana plasmática danificada (pela morte celular, injúria tecidual, injúria química, irradiação ou infecção) ou pelo mecanismo de exocitose por via Golgi-retículo endoplasmático dependente (Myoken et al., 1997; Dow, deVere White, 2000) ou excreção Golgi-retículo endoplasmático independente, como no caso do FGF-2 (figura 1).

Pela via “convencional”, ou via Golgi-retículo endoplasmático dependente, produtos de transcrição RNAm (RNA mensageiro) de FGF é direcionado para o interior do retículo endoplasmático, devido à presença de uma sequência peptídica sinalizadora, onde é traduzido através de ribossomos e, posteriormente, vai para o complexo de Golgi, onde é armazenado em vesículas, sendo secretado para o meio extracelular. Porém, o FGF-1 e FGF-2 não possuem uma sequência peptídica sinalizadora, ficando sua secreção independente do complexo Golgi-retículo endoplasmático, podendo ser através de proteínas carreadoras (por exemplo, a proteína *heat shock*), ou exocitose cálcio-dependente ou transporte ativo (via ATPase- Na^+ / K^+ , no caso do FGF-2) (Florkiewicz et al., 1998; Dow, deVere White, 2000; Nickel, 2003; Taverna et al., 2008).

Este último mecanismo foi observado através de microscopia eletrônica em um estudo em cultura de células endoteliais normais por Yu et al. (1993), que presenciaram o FGF-2 em vesículas, também chamadas de grânulos por Taverna et al. (2003) e Taverna et al. (2008), no interior do citoplasma, sendo estruturas

diferentes de lisossomos, aparentemente fusionadas à membrana plasmática, apresentando imunorreatividade negativa a componentes do retículo endoplasmático e zonas do complexo de Golgi, fato este demonstrado através da técnica de *Western Blotting* para detecção do fator, confirmando a produção do FGF-2 independente da via Golgi-retículo endoplasmático (Yu et al., 1993).

O mecanismo de movimento do FGF-2, do núcleo para membrana celular, foi observado em cultura de células de hepatocarcinoma. Quando ocorre a desorganização de microtúbulos diminui, a expressão do fator no núcleo e nucléolos, sendo mais evidente a diminuição da expressão em nucléolos. Para ocorrer a associação da actina com o FGF-2 é necessária a ATPase- Na^+/K^+ na movimentação dos grânulos de FGF-2 endógeno para a periferia celular (Taverna et al., 2008).

Para ser secretado, ocorre, inicialmente, a aproximação de grânulos contendo FGF-2 localizados nas proximidades da membrana celular e a co-expressão de integrina $\beta 1$ e anexina V-ligante (dois componentes indicadores de vesículas de membranas) em trechos da membrana celular, seguida da formação de vesículas originadas de “projeções” da membrana celular contendo FGF-2. Estas vesículas são chamadas de exovesículas, que posteriormente são liberadas para o meio extracelular (Taverna et al., 2003).

Quando existente no meio extracelular, o FGF-2 atua sobre as células por meio de receptores transmembrana e proteoglicanas heparan sulfato (veja sobre receptores no item 2.1.1), desencadeando vias de sinalização intracelular (Chaffer et al., 2007), ou sofrendo internalização (Delrieu, 2000; Reilly et al., 2004).

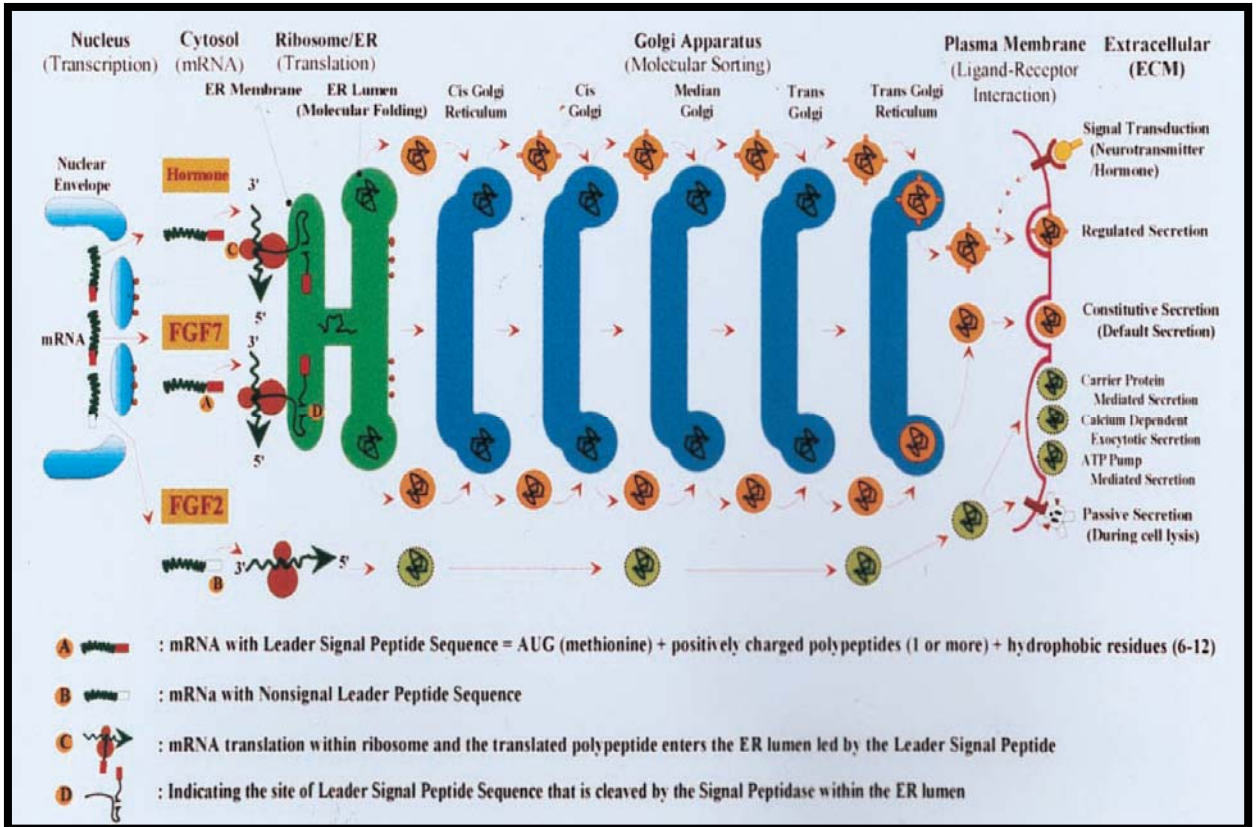


Figura 1 - Vias de secreção de moléculas intracelulares.

Fonte: Dow & deVere White, 2000, p.802.

A internalização do FGF-2 e sua translocação nuclear, em cultura de fibroblastos, ocorrem via endocitose caveolina-dependente (Reilly et al., 2004), endocitose por invaginação da membrana plasmática em forma de “frasco”, mediada por caveolina, uma proteína de membrana (Sverdlov et al., 2007). Dentro do núcleo esta isoforma do FGF-2 pode atuar diretamente no nucléolo da célula via UBF (do inglês, *upstream binding factor*), que é um fator de transcrição responsável pela dimerização e dobra da hélice de DNA estrutural, desenhando os elementos essenciais para a transcrição de RNAr (RNA ribossomal) (Sheng et al., 2005).

Em culturas primárias de células endoteliais bovinas adultas que sofreram adição de FGF-2 de 18kDa ao meio de cultura apresentam a expressão do fator no núcleo e nucléolo das células durante a fase de proliferação. O FGF-2 do meio

extracelular internaliza para o citoplasma, sofre uma degradação (de FGF-2 de 18,4kDa para 16,5 kDa) e transloca-se para o núcleo e nucléolo das células (Baldin et al., 1990; Pederson, 1998).

Além do processo de internalização e translocação das moléculas extracelulares de 18 kDa de FGF-2, ocorre a síntese *de novo* de isoformas nucleares de alto peso molecular que dão origem ao FGF-2 nuclear (Delrieu, 2000). As isoformas de alto peso molecular possuem a mesma sequência polipeptídica do FGF-2 de 18kDa com adição de uma extensão amino-terminal de variados comprimentos (Arese et al., 1999; Delrieu et al., 2000) a qual tem demonstrado ter uma função semelhante à NLS (do inglês, *nuclear localization sequence*), que permite a permanência destas isoformas no núcleo (Arese et al., 1999). Porém, para a modulação do crescimento celular é necessária, apenas, a presença nuclear da isoforma de 18kDa, sequência comum a todas isoformas de FGF-2, atuando como possível mensageiro biológico do FGF-2 pelas vias intrácrinas (dentro da célula), parácrina (entre células) e autócrina (sai da célula e atua na própria célula) (Arese et al., 1999; Delrieu et al., 2000).

Em culturas de fibroblastos modificados, que produziam individualmente as variadas isoformas de FGF-2, em condições de falta de soro (soro a 1%), as isoformas de alto peso molecular se concentraram no núcleo e nucléolo das células, induzindo o crescimento celular, porém não impediram a apoptose das células nestas condições, podendo também atuar via intrácrina na transformação fenotípica destas células (Arese et al., 1999).

2.2 Receptores de fgf tirosina quinase e proteoglicanas heparan sulfato

Os receptores de fator de crescimento de fibroblastos ou receptores transmembrana tirosina quinase (FGFR) são receptores de alta afinidade tirosina quinase, constituídos de três domínios: um domínio extracelular, que contém dois ou três domínios extracelulares semelhantes às imunoglobulinas (Ig) com uma sequência heparina-ligante (“heparin-binding”); um domínio transmembrana; e um domínio tirosina quinase intracelular (Lappi, 1995; Itoh, Ornitz, 2004).

Existem quatro receptores transmembrana tirosina quinase em humanos e um receptor solúvel, sendo eles o FGFR-1 ou Flg, FGFR-2 ou Bek, o FGFR-3 e o FGFR-4, além de um receptor identificado por Sleeman et al. (2001) com ausência de um domínio intracelular tirosina quinase, denominado de FGFR-5 ou receptor solúvel. Todos apresentam *splices* alternativos, que geram isoformas de receptores com interações específicas diferentes (Alzheimer, Werner, 2000; Sleeman et al., 2001; Itoh, Ornitz, 2004; Grose, Dickson, 2005) (tabela 1). A metade invariável N-terminal do domínio Ig é codificada como exon IIIa, e a outra metade como IIIb e IIIc.

Tabela 1 - Localização cromossomal e ligantes-específicos de FGFR em humanos.

Gene	Localização	Proteína	Ligante-específico
FGFR-1	8p12	FGFR1-IIIb	FGF-1,2,3 e 10
		FGFR1- IIIc	FGF-1,2,4,5 e 6
FGFR-2	10q26,12	FGFR2-IIIb	FGF-1, 3, 7 e 10
		FGFR2-IIIc	FGF-1, 2, 4, 6,8 e 9
FGFR-3	4p16,3	FGFR3-IIIb	FGF-1 e 9
		FGFR3-IIIc	FGF-1 ,2, 4, 8 e 9
FGFR-4	5q35,2	FGFR-4	FGF-1, 2, 4, 6, 8 e 9
FGFR-5	Não identificado	FGFR-5 β FGFR-5 γ	FGF-2

São fortemente expressos em tecidos embrionários, porém após nascimento os mesmos apresentam-se de forma reduzida e encontram-se distribuídos no citoplasma, no núcleo, em forma solúvel no soro e na superfície celular na forma inativa (Lappi, 1995). As isoformas IIIb são expressas nas células epiteliais e as isoformas IIIc são frequentes em células mesenquimais (Ornitz, Itoh, 2001; Grose, Dickson, 2005).

O FGF sinaliza direcionalmente e reciprocamente através das bandas epitélio-mesenquimal. A integridade destas vias de sinalização requer uma alta afinidade do FGF com seu receptor tirosina quinase específico, além da interação com receptores/co-receptores HSPGs, como a sindecan-4 (Simons, Horowitz, 2001; Presta et al., 2005) e glipican (Ornitz, Itoh, 2001; Javerzat et al., 2002).

A interação do FGFR com FGF é heparina dependente, baseado na dimerização de dois complexos FGF: FGFR, ligados por um complexo de heparina (figura 2) (Plotnikov et al., 1999; Plotnikov et al., 2000; Harmer et al., 2003). A forma ativa do FGF necessita de heparina para ativar efetivamente o FGFR em células que são deficientes em: HSPG; ou incapazes de sintetizar HSPG; ou em células pré-tratadas com enzimas degradantes de heparina/ heparan sulfato ou inibidoras de sulfatação (Itoh, Ornitz, 2004).

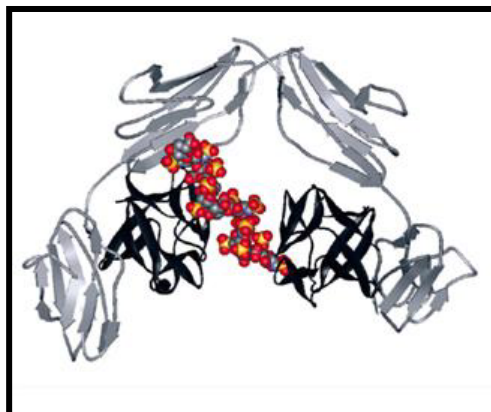


Figura 2 - Esquema do complexo FGF: heparina: FGFR.

Fonte: Harmer et al., 2003, p.549.

As HSPG são cadeias de glicosaminoglicanas heparan sulfato, constituídas de moléculas secretadas (perlecans) e de superfície celular (sindecans e glicans) (Chaffer et al., 2007), são consideradas como co-receptores de FGF ou receptores de baixa afinidade, pois ligam o FGF à superfície celular e permite a internalização do fator na célula (Lappi, 1995). Podem estimular ou inibir a atividade mitogênica das células (Fernig et al., 2000), e também atuar como ativadoras das vias quinases 1 e 2 (ERK1/2), independente de FGFR (Chua et al., 2004).

Em cultura de células vasculares de músculo liso bovino, as quais expressam apenas o isótipo de FGFR1-IIIc, Chua et al. (2004) observaram que, mesmo com a inibição do FGFR-1 nestas células, o FGF-1 e FGF-2 também podem ativar vias quinase 1 e 2 (ERK1/2) (ativadores de variadas vias de sinalização e resposta biológica para vários estímulos extracelulares), independentes de FGFRs, apenas através da presença de HSPGs, comportamento este diferente comparado a outros fatores de crescimento, como o FGF-10, que necessitam de seus receptores específicos (Chua et al., 2004).

A interação com proteoglicanas estabiliza o FGF de desnaturação e proteólise, limita sua difusão e atuação dentro de espaços intersticiais (Ornitz et al., 1996; Ornitz, toh, 2001; Itoh, Ornitz, 2004; Chaffer et al., 2007), fazendo da matriz extracelular o maior reservatório de depósito de FGF. Esta interação ocorre através da presença de um padrão de sulfatação e epimerização do ácido glucurônico para ácido idurônico dentro de um subdomínio polissacarídeo, regulando a bioviabilidade dos fatores de crescimento e a ativação da atividade tirosina quinase dos FGFRs (Fornig et al., 2000).

A superexpressão de algumas HSPG inibe a invasão celular em tumores através da promoção da interação das células com a matriz extracelular e adesão célula-célula. Isso explica a pouca expressão destas glicoproteínas em células transformadas, comparadas com células normais, como a sindecan que é pouco expressa em carcinomas colorretais, de mama e esôfago, aumentando o crescimento ancoragem-independente e o potencial de invasão. Porém, em carcinoma de mama, a superexpressão de glipican1 promove o crescimento tumoral quando há presença de resposta mitogênica FGF-2 alterada (Chaffer et al., 2007).

A atuação do FGF ativando vias de sinalização via FGFR mediado por HSPG está esquematizado na figura 3. O FGF não ligado à molécula de HSPG possui pouca afinidade ou nenhuma afinidade pelo seu receptor; HSPG liga-se a duas moléculas de FGF, viabilizando a dimerização do receptor tirosina quinase e autofosforilação. O FGF interage com os domínios IgII e IgIII para desencadear vias de sinalização intracelular (Lappi, 1995; Chaffer et al., 2007), através de resíduos de tirosina fosforilada que formam sítios ligantes para moléculas de sinais de transdução. Entre estas moléculas, encontram-se a fosfolipase C-gama₁ (PLC γ ₁), Crk, SHP-2, proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK) e PI3 quinase

(fosfatidilinositol 3-quinase, do inglês, *phosphoinositide 3-kinase*) (Lundin et al., 2003; Eswarakumar et al., 2005; Chaffer et al., 2007).

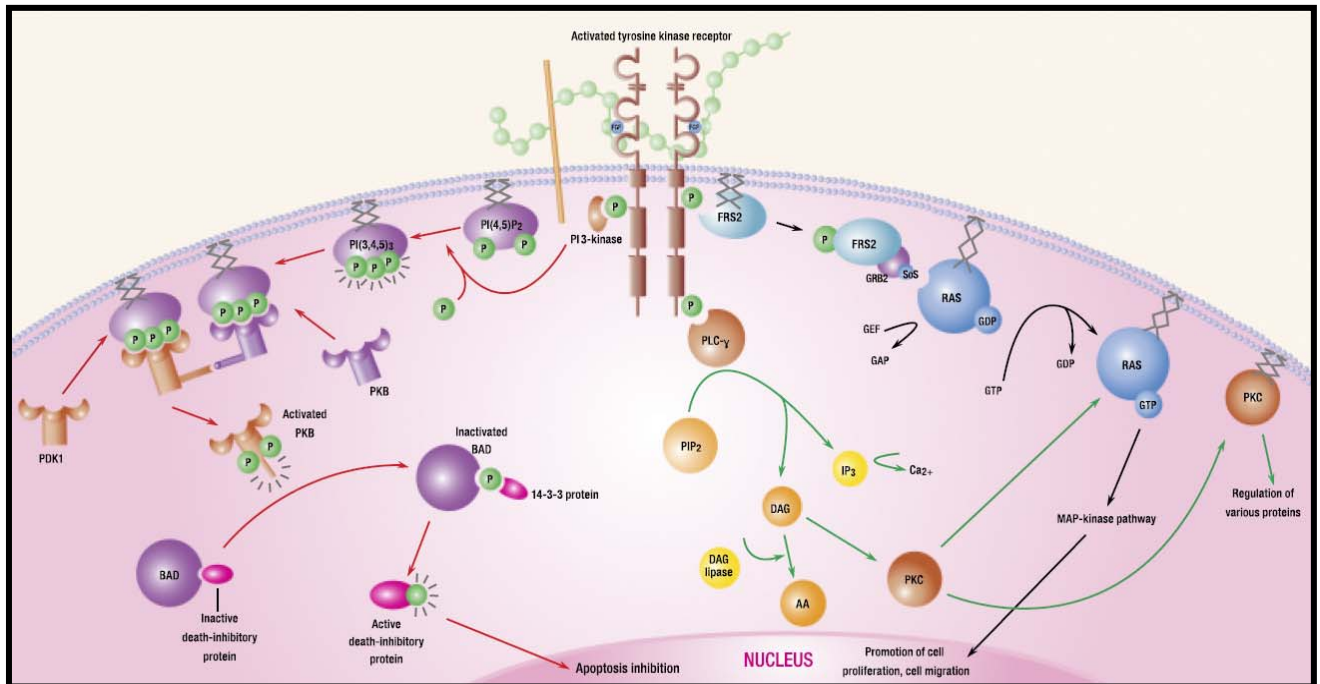


Figura 3 - Resumo das cascatas sinalizadas pelo FGFR.

Fonte: Chaffer et al., 2007, p.834.

A via PI3 quinase é ativada por receptores tirosina quinase promovendo variadas funções celulares como a sobrevivência celular, transformação do rearranjo do citoesqueleto, transformação celular e ativação da via AKT, atuando na apoptose, crescimento e ciclo celular (Vivanco, Sawyers, 2002). Em células tronco embrionárias, o FGFR-2 promove a diferenciação celular para um fenótipo epitelial, através da ativação da via PI3-quinase, dependente da via AKT (Chen et al., 2000).

O FGFR-1 é pouco expresso ou pode apresentar nenhuma expressão em cultura de fibroblastos quiescentes, porém quando as mesmas são estimuladas por FGF-2, ocorre a translocação do receptor, presente na superfície celular, para o núcleo da célula, inclusive na matriz nuclear, atuando como regulador da atividade

genética celular (Maher, 1996). O PLC γ_1 ligado ao FGFR-1 leva à translocação do FGFR-1 pela membrana plasmática onde ele cataliza as hidrólises de lipídios fosfoinositol, os quais estimulam a produção intracelular de Ca $^{2+}$ e ativam a proteína quinase C (PKC) (Lundin et al., 2003), responsável pela transformação celular (Vivanco, Sawyers, 2002).

O complexo FGF/FGFR sofre internalização, por endocitose, da membrana celular para o citosol. Uma fração de FGFR, após a internalização, atinge o núcleo na forma de complexo FGF/FGFR, translocando-se para o núcleo, mediados pela *importatin β* (componente de várias vias de importação nuclear) (Reilly, Maher, 2001). O FGFR-1 nuclear possui atividade quinase (Maher, 1996; Groth, Lardelli, 2002).

O FGFR-1 é dependente de energia para ser exportado do núcleo. Em cultura de fibroblastos é encontrado na membrana plasmática e em estruturas semelhantes a vesículas no citoplasma celular. A depleção de ATP induz à translocação nuclear de FGFR-1, na ausência de FGF-2, em células tratadas com oligomicina B e deoxigluco-2. E em células tratadas com FGF-2 o FGFR-1 é localizado dentro do núcleo celular, porém sem associação ao envelope nuclear. Esta translocação depende de *importatin β* e atua na proliferação celular induzindo a expressão de c-jun (componente do fator de transcrição heterodimérico AP-1) e da ciclina D1. A ciclina D1 é uma das principais ciclinas na fase G1 do ciclo celular e media a ativação de c-jun. O FGF-2 é um dos indutores da ciclina D1 (Reilly, Maher, 2001).

Reilly et al. (2004), observando as vias de endocitose do FGF-2 e seu receptor FGFR-1, em cultura de fibroblastos, relataram que a translocação do receptor e seu ligante são independentes um do outro, após sua internalização.

Sendo a translocação do FGFR-1 independente da endocitose clatrina-dependente ou caveolina-dependente ou via macropinocitose, sendo necessário apenas sua internalização no citoplasma das células, de forma ligante-dependente.

O FGF ao ligar-se ao FGFR-1 diminui a adesão celular e promove a translocação nuclear do receptor. Em cultura de células de adenocarcinoma de mama humano estimuladas com FGF, Bryant et al. (2005) observaram que ocorre uma internalização do FGFR juntamente com a E-caderina (molécula de adesão celular), sendo a translocação nuclear do FGFR dependente desta endocitose, proveniente da desregulação da função da E-caderina.

O FGFR-2 atua tanto no desenvolvimento embrionário, quanto na tumorigênese como segue nos tópicos a seguir.

2.3 FGF no desenvolvimento da glândula salivar

O desenvolvimento da glândula salivar tem sido extensamente estudado em glândula salivar submandibular de ratos. Seu desenvolvimento inicia-se no arco mandibular E11 do epitélio oral e é dividido em estágios (Melnick, Jaskoll, 2000; Jaskoll et al., 2004):

- a) estágio pré-botão - ocorre à formação inicial de um “nó” primitivo da glândula, um estreitamento do epitélio oral adjacente ao desenvolvimento da língua;
- b) estágio de botão inicial - o epitélio primitivo da cavidade oral apresenta-se como um cordão alongado e um bulbo terminal;
- c) estágio pseudoglandular - a glândula apresenta-se como um cordão de epitélio sólido alongado com variados bulbos terminais envoltos pelo

mesênquima;

- d) estágio de canalização - há um aumento no número de lóbulos e os primórdios ductais começam a exibir células epiteliais luminais cubóides;
- e) estágio de botão terminal - observa-se a presença de lúmen bem desenvolvido e distinto, com ductos e botões terminais.

A proliferação de células epiteliais ocorre em todos os estágios, porém, para o equilíbrio da embriogênese glandular, durante a formação ductal, no estágio de canalização inicia-se a apoptose epitelial (Jaskoll et al., 2004).

O desenvolvimento da glândula salivar depende da interação simultânea de componentes da matriz extracelular e receptores de fatores de crescimento. Múltiplos FGFs são expressos na sua morfogênese: FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF4, FGF-7 e FGF-10 são expressos no mesênquima; enquanto que no epitélio embrionário observa-se FGF-1, FGF-8 e FGFR1-IIIb e FGFR2-IIIb (Patel et al., 2006).

Para a inibição da embriogênese glandular, em cultura de células, é necessária a neutralização, com anticorpos, de FGF-1, FGF-7 e FGF-10. A interação FGF-10 / FGFR2-IIIb têm grande papel na inicialização e desenvolvimento primário glandular. Ratos em formação, com ausência de FGF-10, apresentam agenesia de glândula salivar, e em baixas expressões de FGF-10 originam glândulas hipoplásicas (Ohuchi et al., 2000; Patel et al., 2006).

O botão epitelial pode ser induzido por FGF-7 e o FGF-10, promovendo o prolongamento ductal em células epiteliais cultivadas em gel de laminina-1, e livres de meio de soro (Patel et al., 2006).

O FGF-7 também aumenta a expressão de FGFR1-IIIb e FGF-1, resultando no aumento da proliferação celular e expansão do botão epitelial. A neutralização de FGF-1 inibe a morfogênese mediada por FGF-7 e 10 (Steinberg et al., 2005; Patel et al., 2006).

Dentre as variadas isoformas, o FGF-8 possui importante papel na sobrevivência e morfogênese da glândula salivar. Durante o desenvolvimento de ratos com redução da expressão do gene FGF-8 em 50% abaixo da dosagem gênica de ratos normais, estes apresentaram hipoplasia da glândula salivar submandibular, enquanto que, *in vitro*, seu aumento induziu a embriogênese glandular (Jaskoll et al., 2004).

O FGF-8 tem apresentado grande afinidade com o FGFR2-IIIb, FGFR3-IIIc e FGFR-4. Durante o estágio inicial de botão em glândulas salivares submandibulares maduras, quando os FGFR-3 e FGFR-4 estão ausentes o FGF-8 media sua sinalização através do FGFR2-IIIc. Ratos com deficiência em FGFR2-IIIc apresentaram suas glândulas salivares submandibulares menores e com poucos botões, em relação ao grupo controle, enquanto que na ausência de FGFR2-IIIb não desenvolvem os primórdios de glândula salivar. A atuação do FGFR2-IIIb é dose-dependente de FGF-10 para promover aumento no desenvolvimento do epitélio de ramificação de glândula salivar em desenvolvimento e sobrevida celular. Em ratos, com mutação transgênica do FGFR-1, foram encontradas glândulas salivares menores que em ratos controle/selvagens, as quais eram constituídas de poucas células epiteliais embriogênicas, além de apresentarem lúmens distintos nos botões terminais. Os níveis alterados de FGFR-1 mediam sinalizações que inibem o epitélio de ramificação, porém não a histodiferenciação inicial (Alzheimer, Werner, 2005).

Alzeimer & Werner (2005), também estudaram o efeito reduzido de FGFR1 *in vitro*. FGFR-1 solúvel foi adicionado ao meio de cultura para se ligar aos ligantes de FGFR-1 endógeno, promovendo diminuição na morfogênese dos ramos, comparada com a cultura controle. Não houve significância entre a adição da isoforma FGFR1-IIIb e FGFR1-IIIc isoladas ou associadas, sugerindo também que ambas isoformas interrompem as mesmas cascatas de sinalização.

2.4 Fator de crescimento de fibroblastos em neoplasias

Os FGFs e seus receptores também exercem importante papel na tumorigênese. O FGF-2 aumenta e induz a expressão do gene bcl-2 (gene anti-apoptótico) em linhagens de células humanas de leucemia linfocítica crônica de células B (LLC-B). O FGF-2 exógeno tem impedido a apoptose induzida por fludarabine, medicação utilizada no tratamento de LLC-B. (Konig et al., 1997; Gabrilove, 2001) aumentando a sobrevivência destas células.

Em cultura de células de tumor de mama observou-se que HSPG é capaz de regular a ação de FGF-2. O crescimento de tumores de mama maligno é estimulado pelo FGF-1, porém quando ocorre uma inibição parcial da sulfatação. Tanto o FGF-1 como o FGF-2 são capazes de estimular o crescimento celular. O FGF-1 necessita apenas de um sítio ligante ao heparan sulfato, enquanto que o FGF-2 necessita de dois sítios ligantes (Fernig et al., 2000), quando há inibição da sulfatação o FGF-2 fica susceptível a indução da proliferação celular, agindo pelas vias ERK1/2 (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase1/2* - quinase 1/2 regulada por sinais extracelulares) (Chua et al., 2004).

Em tumores de pâncreas, a perda da função da molécula N-CAM (do inglês, *neural cell-adhesion molecule* - molécula importante na adesão celular) promove a formação de metástases em ratos, além da redução da adesão de vários componentes da matriz extracelular deste tecido tumoral. Em células tumorais deficientes de N-CAM, observou-se que FGF-1 e FGF-2 podem substituir esta molécula na indução da adesão da matriz, porém não promovem a proliferação celular deste tumor. E nas células tumorais positivas ao N-CAM, o FGFR-4, atua como mediador da molécula N-CAM na indução de várias vias de sinalização através do complexo N-CAM/FGFR-4/N-caderina (molécula responsável pela adesão célula-célula) (Cavallaro et al., 2001).

Em tumores de próstata, a queda de expressão de FGFR2-IIIb (isoforma IIIb do receptor-2 de fator de crescimento de fibroblastos, presente em células epiteliais) se dá pelo aumento de produção de FGFR-1 (comumente expresso no estroma) por células malignas, que permite uma interação desequilibrada entre epitélio e estroma, agindo negativamente na proliferação celular do epitélio. Em células epiteliais de lesões pré-malignas, a expressão de FGFR-1 acelera a progressão da lesão para um fenótipo maligno (Grose, Dickson, 2005).

Estromas com a expressão aumentada de FGF-2 podem promover um crescimento elevado em células carcinomatosas com alta expressão de FGFR-1. Recentemente, Yang et al. (2007) observaram que o TGF- β 1 (fator de crescimento transformante $-\beta$ 1) é capaz de estimular a liberação de FGF-2 em cultura de células de carcinoma de próstata.

Os poucos estudos do FGF em tumores de glândula salivar têm demonstrado sua importante atuação na patogênese destes tumores (Myoken et al.,

1996; Myoken et al., 1997; Sumitomo et al., 1999; Kusafuka et al., 2001; Yura et al., 2001).

Em adenomas pleomórficos, Myoken et al. (1997) compararam a expressão do FGF-1, FGF-2 e FGFR-1 em áreas tubulares, mixomatosas, sólidas e condróides do tumor, através da técnica imunohistoquímica, e suas observações sugerem que os fatores são produzidos pelas células tumorais e que o papel do FGFR-1 é de indução da proliferação autócrina em áreas tubulares e sólidas.

Kusafuka et al. (1998) estudaram os mesmos imunomarcadores de Myoken et al. (1997), porém com enfoque na diferenciação condróide do AP, comparado a glândula salivar normal de adultos e neonatos e observaram que o FGF-2 e FGFR-1 induzem a formação e proliferação de células neoplásicas e mioepiteliais modificadas por mecanismo autócrino e parácrino, além de a expressão de FGFR-1 em áreas condróides inibir a diferenciação das células lacunares em células osteogênicas e promover a produção de proteoglicanos cartilagem-específicas.

Myoken et al. (1996) observaram que ocorre uma superexpressão do FGF-2, FGF-1 e FGFR-1 em tumores malignos de glândula salivar (carcinoma adenóide cístico e carcinoma mucoepidermóide) comparado à glândula salivar normal, sugerindo que estes fatores tenham papel de facilitadores na progressão destes tumores.

Sumitomo et al. (1999), através do processo de indução carcinogênica com implantação de esponja de DMBA (9,10-dimetil-1,2 benzantraceno) em glândulas de ratos, observaram que, em glândula salivar normal, o FGF-2 foi expresso nas células de ductos excretórios, estriados e intercalados. Durante o processo de desenvolvimento do carcinoma epidermóide, a expressão do FGF-2

ocorreu tanto no epitélio tumoral como em todas as camadas do epitélio de origem, e seu receptor expresso apenas no epitélio tumoral.

E em carcinomas de glândula salivar, Yura et al. (2001), através de cultura de células inoculadas em glândula salivar de ratos, estimulada com FGF-1, observaram uma resposta de proliferação da neoplasia em baixas concentrações do fator de crescimento, sugerindo que a atuação na tumorigênese deste tumor ocorra através dos receptores FGFR-1 e FGFR-4.

2.5 Adenoma pleomórfico

O adenoma pleomórfico (AP) é o neoplasma benigno mais freqüente em glândula salivar, constituindo 60% dos casos de neoplasma salivar. Possui pequena predominância para o sexo feminino, sendo a idade média de 46 anos, porém acomete entre a primeira década de vida à décima década de vida. Oitenta por cento dos APs surgem em glândula parótida, seguidos de 10% em glândulas submandibulares e outros 10% em glândulas salivares menores, cavidade nasal, seio paranasal, tratos gastrointestinal e respiratórios superiores (Eveson et al., 2005). É uma lesão de crescimento lento, apresentando-se tipicamente como uma massa firme à palpação, indolor (Neville, 2004). Apesar de ser um tumor benigno seu prognóstico não é muito favorável devido à sua tendência a recidivar e risco de transformação maligna.

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde de 2005 é denominado como um tumor de capsulação variável, caracterizado microscopicamente mais pela sua arquitetura do que pelo pleomorfismo celular, no qual células epiteliais e mioepiteliais modificadas se misturam mais comumente com

tecido de aparência mixóide, mucóide ou condróide (Margatitescu et al., 2004; Eveson et al., 2005). Raramente são encontradas células acinares mucosas, sebáceas e serosas. Pode apresentar metaplasia escamosa, algumas vezes com pérolas de queratina, em 25% dos casos de AP, além de metaplasia mucosa ou células claras, células sebáceas ou serosas e metaplasia óssea (Eveson et al., 2005; Prado, 2005).

Os componentes celulares são de origem epitelial, derivadas de células progenitoras acinares (que originam células acinares e do ducto intercalar) (Shirasuna et al., 1986; Araújo, Sousa, 1996; Ogawa, 2003; Ogawa et al., 2003; Saverá, Zarbo, 2004) e formam proliferações tubulares (estruturas ductiformes) neoplásicas internamente constituída de células cuboidais, externamente delineadas por células mioepiteliais (Margaritescu et al., 2004) e proliferação de células mioepiteliais que podem apresentar morfologia poligonal, plasmocitóide, hialina ou fusiforme, dispostas em lençóis, ilhas ou ninhos celulares sólidos (Saverá, Zarbo, 2004; Eveson et al., 2005).

Em 1975, através da técnica histoquímica e microscopia eletrônica, Takeuchi et al. observaram que culturas de células de adenoma pleomórfico produziam glicosaminoglicanas e relacionaram a presença de heparan sulfato a atividade proliferativa das células epiteliais. APs com células fusiformes predominantes produziram larga escala de material mucinoso rico em sulfato de condroitina-4 e sulfato de condroitina-6, além de ácido hialurônico e heparan sulfato. As células ductais normais não apresentaram áreas mucinosas, continham pouco heparan sulfato, e apresentaram uma proliferação celular mais lenta.

O início da aplicação da técnica imunoistoquímica em glândulas salivares teve início em meados dos anos oitenta, visando o auxílio da identificação de células

mioepiteliais através de estudos de filamentos intermediários como a queratina, vimentina e desmina (Araújo et al., 1994, 2000; Takai et al., 1995). Dentre outros marcadores, a proteína S-100 tornou-se o anticorpo mais utilizado na identificação destas células (Araújo et al., 2000), juntamente com a proteína ácida glial fibrilar (GFAP) no diagnóstico de adenomas pleomórficos (Nakazato et al., 1985; Hellquist, Michaels, 1986; Takai et al., 1995). Devido à sua ultra-estrutura semelhante a células contráteis, as células mioepiteliais também expressam positividade imunohistoquímica para proteínas musculares como a actina de músculo liso, actina músculo específica (HHF-35), miosina, calponina, caldesmona (Gugliotta et al., 1988; Foschini et al., 2000; Ogawa, 2003; Saveria, Zarbo, 2004; Furuse et al., 2005).

Através de estudo imunohistoquímico efetuado por Araújo & Sousa (1996) a expressão de citoqueratinas (CKs) demonstrou ser de grande valia na identificação das células de tumores salivares. As CKs se expressam diferentemente nas variadas áreas da glândula salivar normal e células epiteliais, e as estruturas ductiformes em AP apresentaram expressão semelhante ao segmento intercalar do ducto salivar. As células mioepiteliais foram sensíveis à CK14, indicando que ambas as células, luminais e mioepiteliais, são de origem epitelial.

Em estudo posterior, Araújo et al. (2000) estabeleceram um painel imunohistoquímico para auxílio diagnóstico de tumores de glândula salivar, incluindo o AP, sendo as células luminais das estruturas ductiformes do AP positivas para CKs 7, 8 e 19, semelhante às expressas em células luminais normais do ducto intercalado, e as células mioepiteliais em torno das estruturas ductiformes foram positivas para vimentina, actina de músculo liso, com pouca CK14. As células mioepiteliais modificadas (hialinas e plasmocitóides) exibiram imunorreatividade variável não compatível com compartimentos da glândula salivar.

Para elucidar quais biomarcadores eram ideais na identificação de células mioepiteliais neoplásicas em tumores de glândula salivar, Furuse et al. (2005) fizeram um estudo comparativo entre cinco marcadores utilizados na identificação destas células, a α -actina de músculo liso, calponina, vimentina, h-caldesmon e o S-100, através da técnica imunoistoquímica. E relataram que os melhores imunomarcadores para estas células foram α -actina de músculo liso ou calponina associados a vimentina.

Desta forma, os estudos imunoistoquímicos só têm contribuído para o diagnóstico e pesquisa da histogênese tumoral.

Entre outros fatores de crescimento estudados em AP, Aoki et al. (2006) relataram que o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) é estimulado pela cicloxigenase-2 (COX-2), de forma dose dependente, em linhagens de células de adenoma pleomórfico, sendo a imunomarcação de ambas imunorreações positivas no epitélio ductal.

Outro fator de crescimento estudado em AP é o fator de crescimento epidermal (EGF) e seu receptor EGFR (Mori et al., 1987; Yamada et al., 1989). O EGF é expresso em células epiteliais luminais das estruturas ductiformes e células mioepiteliais fusiformes em áreas mixomatosas (Mori et al., 1987). Já o receptor é positivo em 38,8% dos casos e sua distribuição imunoistoquímica é presente nas células epiteliais luminais, em áreas de metaplasia escamosa em células das áreas condróides, sendo relacionados à regulação do crescimento tumoral e diferenciação de células epiteliais (Yamada et al., 1989).

Kusafuka et al. (2001) observaram a expressão imunoistoquímica de variados membros da família do fator de crescimento transformante (TGF)- β em glândula

salivar normal e AP, sendo encontrado o TGF- β 2 e TGF- β 3, sugerindo que o TGF- β 2 atue na diferenciação das células luminiais das estruturas ductiformes e o TGF- β 3 na diferenciação das células mioepiteliais neoplásicas e na produção da matriz extracelular, sendo o TGF- β 1 negativo no AP.

Devido o AP ser uma neoplasia muito vascularizada, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) também é expresso nas estruturas ductiformes e células fusiformes em áreas mixomatosas, sendo o mesmo produzido pelas próprias células tumorais, estimuladas pela própria condição de hipóxia e pobre vascularização, atuante na proliferação e diferenciação das estruturas ductiformes através de seus receptores Flt-1 e Flk-1 (Swelam et al., 2005).

Citogeneticamente em aproximadamente 70% dos casos de AP foram observados aberrações citogenéticas em 3 padrões: rearranjo do 8q12, rearranjo do 12q13-15 e mudanças clonais esporádicas não envolvendo ambos os rearranjos. Podendo ser, atualmente, identificado pela translocação do gene HMGA2 ou PLAG1 através da detecção por reação de cadeia polimerase por transcriptase reversa (PCR-RT) ou hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Eveson et al., 2005; Cheuk, Chan, 2007).

Em um estudo para saber a atuação do PLAG1 descobriu-se que este gene se encontra no núcleo das células de AP e é responsável pela ativação de IGF2-III (fator de crescimento de Insulina) e aumento de sua atividade promotora, sendo um possível fator de crescimento presente na diferenciação das células em AP (Voz et al., 2000). Dentre os fatores de crescimento estudados neste experimento o FGF não foi utilizado, apenas o PDGF, porém sem significância.

A translocação no gene HMGA2 (conhecido previamente como HMGIC), promove a separação de ligantes de DNA ao RNAm e sua alta expressão sugere transformação maligna (Eveson et al., 2005; Cheuk, Chan, 2007).

2.6 Carcinoma ex-adenoma pleomórfico

Pela OMS é definido como uma malignização epitelial derivada de um AP. Acomete aproximadamente 3,6% de todos os tumores salivares, 12% de todas as malignidades salivares e 6,2% de todos APs. É comum na sexta e sétima décadas de vida, aproximadamente uma década após a média de idade de pacientes com AP. Em relação à sua localização, nas glândulas salivares maiores é mais freqüentes na glândula parótida, e em glândulas salivares menores é mais comum no palato com ocasional envolvimento da nasofaringe. Clinicamente apresenta-se como uma massa tumoral de crescimento rápido, pobremente circunscrito e invasivo. Pode apresentar-se com aparência encapsulada, bem circunscrita (Gnepp et al., 2005).

Histologicamente apresenta componentes benignos de AP associados ao desenvolvimento de células epiteliais malignas.

O CXAP é classificado de acordo com a extensão da invasão tumoral maligna através da cápsula do AP, podendo ser dividido em (Bradwein et al., 1996; Dardick, 1996; Gnepp et al., 2005; Freitas et al., 2005; Altemani et al., 2005):

- a) intracapsular (não invasivo ou *in situ*) - apresenta componentes carcinomatosos contidos por uma cápsula ou circunscrito pelo adenoma pleomórfico remanescente presente. As estruturas ductiformes apresentam células luminiais com citoplasma aumentado

de coloração pálida, com núcleo pleomórfico e nucléolo proeminente em contraste à células luminais vistas no adenoma pleomórfico imersos em um estroma hialino;

- b) minimamente invasivo - os componentes malignos apresentam invasão menor ou igual a 1,5mm através da cápsula e/ou adenoma pleomórfico. O tumor consiste de pequenos ninhos celulares sólidos atípicos semelhantes a nódulos satélites ou células isoladas, podendo estar próximo ou até rodear vasos sanguíneos, porém sem invadi-los;
- c) francamente invasivo - os componentes malignos apresentam invasão com mais de 1,5mm além da cápsula tumoral nos tecidos adjacentes, apresentando-se histologicamente com margens infiltrativas, não encapsulado. As áreas de carcinoma podem variar de pouco diferenciadas para bem diferenciadas, com atipias celulares evidentes. Áreas hemorrágicas e necróticas estão presentes, assim como invasão perineural.

Apesar de serem descritos separadamente nesta revisão, o CXAP intracapsular e o minimamente invasivo são descritos como um único subgrupo com potencial de malignidade limitado (Dardick, 1996; Altemani et al., 2005).

Histologicamente as áreas carcinomatosas apresentam atipias celulares como figuras mitóticas, pleomorfismo nuclear e citoplasmático em células epiteliais luminais, podendo estar dispostas em forma de ninhos ou lóbulos. Podem apresentar áreas de calcificação e até ossificação (Dardick, 1996).

As áreas de AP remanescente em CXAP intracapsular e minimamente invasivo são constituídas de estruturas ductais, cordões e ilhas de células poligonais,

lençóis e ilhas de células hialinas ou plasmocitóides em um estroma mixóide, hialino e condróide, enquanto que em francamente invasivo observa-se apenas nódulos de tecido hialinizado e estruturas de AP dispersas (Altemani et al., 2005)

Altemani et al. (2005), através da imunomarcacão com citoqueratinas, actina de músculo liso e vimentina, identificaram quais tipos celulares se diferenciam no CXAP. Setenta e cinco por cento dos casos eram compostos apenas por diferenciação de células epiteliais lumbais, 19% dos casos apresentaram diferenciação de células epiteliais e mioepiteliais e 6% compostos apenas por diferenciação de células mioepiteliais.

A progressão tumoral tem início na sua forma não-invasiva, também considerada como carcinoma *in situ* em AP, onde células ductais neoplásicas se apresentam com atipias, porém limitadas por células mioepiteliais benignas de um adenoma pleomórfico pré-existente. Com a evolução da lesão observa-se que as células carcinomatosas saem do confinamento das células mioepiteliais e invadem o estroma, porém contido em um AP, sendo classificado como intracapsular. Quando a invasão se estende através da cápsula é considerado invasivo, assim o CXAP é subdividido em minimamente invasivo e francamente invasivo (Cheuk, Chan, 2007).

Felix et al. (1999) observaram a relação de componentes da matriz extracelular na progressão tumoral do AP em CXAP. A laminina e o colágeno tipo IV estão associados à transformação maligna do AP e sua progressão. Enquanto que a tenascina está relacionada à migração e invasão tumoral (Felix et al., 2004).

Já o supressor tumoral maspin sofre perda da expressão em células epiteliais lumbais carcinomatosas durante a progressão tumoral do CXAP, enquanto que células mioepiteliais neoplásicas apresentam a expressão de maspin em todas

as fases tumorais, indicando que estas células tenham papel de supressores tumorais no CXAP (Martins et al., 2005).

Araújo et al. (2006) observaram o perfil imunológico das células mioepiteliais benignas ao redor das áreas carcinomatosas de transformação maligna em CXAP apenas com componentes luminais ou epiteliais comparando com áreas ductiformes de AP. Evidenciaram que estas células sofrem uma modificação fenotípica estimuladas pelas células malignas, sugerindo que estas células são sinalizadas no início da transformação maligna para conter a invasão tumoral, apresentando-se de forma bem diferenciada, produzindo importantes proteínas relacionadas com a supressão tumoral, como a laminina e maspin, diferente das células mioepiteliais benignas no AP, as quais se apresentaram menos diferenciadas.

Soares et al. (2007) observaram a angiogênese durante a transformação maligna do AP em CXAP, através da análise da densidade microvascular e a área vascular total pela imunomarcagem de CD34 e CD105. Constataram que ocorre um aumento da vascularização durante a progressão tumoral, sendo a ativação da angiogênese na “fase” de CXAP intracapsular, e que o CXAP com diferenciação mioepitelial apresenta vasos com distribuição, tamanho e forma diferentes do CXAP sem diferenciação mioepitelial.

Na transformação maligna do AP já observavam evidências de fatores de crescimento e seus receptores.

Kamio (1996) evidenciou a coexpressão da oncoproteína p-53 e da proteína homóloga do receptor do fator de crescimento epidermal (cerbB-2) em tumores malignos de glândula salivar, inclusive em CXAP, relacionando a expressão destas proteínas a alta atividade proliferativa das células tumorais.

Posteriormente, Freitas et al. (2005) demonstraram através de método imunistoquímico com dupla marcação, que células epiteliais carcinomatosas nas estruturas ductais de AP em estágio inicial de transformação maligna apresentam expressão significativa da oncoproteína p-53 e da proteína cerbB-2 (proteína homóloga do receptor de fator de crescimento epidermal), enquanto as células mioepiteliais benignas residuais raramente são positivas, indicando que as alterações genéticas que levam à transformação maligna ocorrem predominantemente nas células ductais luminiais e raramente nas mioepiteliais.

Matsubayashi & Yoshibara (2006) observaram a expressão de oncoproteínas p-53, cerbB-2, EGFR em relação à atividade proliferativa, pela imunomarcação de PCNA e Ki-67, no CXAP comparando-o ao AP e outros tumores de glândula salivar, constatando que o CXAP apresenta atividade proliferativa superior ao AP e que possui um comportamento biológico próprio em relação às outras neoplasias salivares, apresentando superexpressão de todos imunomarcadores em seus componentes malignos, em maior incidência que as outras neoplasias glandulares.

A cicloxigenase-2 inicia a formação de prostaglandinas em resposta a citocinas e fatores de crescimento como o fator de necrose tumoral (TNF) e receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR). Sua superexpressão está relacionada a vários efeitos celulares incluindo proliferação celular, redução de apoptoses, promoção da angiogênese, redução da expressão de E-caderina e aumento do potencial de invasão e metástase. A partir destas evidências, Katori et al. (2007) compararam a expressão de COX-2 e Ki-67 (marcador de proliferação celular) em CXAP, AP e sialadenite e relataram que os casos de CXAP constituídos de componentes carcinomatosos de alto grau de invasão apresentavam aumento da

expressão de COX-2, concluindo que a COX-2 está relacionada ao prognóstico da lesão e a eventos iniciais de transformação maligna do AP.

Citogeneticamente, semelhante ao AP, as alterações e rearranjos dos cromossomos 8q12 e 12q13-15 são encontrados no CXAP (Gnepp et al., 2005). A superexpressão dos genes localizados no cromossomo 12q 13-15, incluindo CDK4, HMGIC e Mdm2 (proteína que tem como propriedade ligar-se e inativar a proteína supressora tumoral p53) são identificadas em CXAP em fases iniciais, associada a deleções do cromossomo 5(q 22-23, q32-33) e translocações do cromossomo (10,12) (p15, q15) (Araújo et al., 2000; Röijer et al., 2002).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) e seus receptores (FGFR-1 e FGFR-2) no carcinoma ex-adenoma pleomórfico, comparando-a com a expressão no adenoma pleomórfico pela técnica de imunohistoquímica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O referido foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa, com número de protocolo nº. 07/124, instituído no Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic e apoiado pela FAPESP através do projeto temático nº. 04/07960-0.

Foram selecionados 3 casos de adenoma pleomórfico (AP) e um caso de glândula salivar normal do Arquivo do Laboratório de Patologia do Instituto e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic e os 15 casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP), em variados graus de invasão, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os CXAPs foram classificados de acordo com Brandwein et al. (1996) conforme a extensão da invasão tumoral através da cápsula do adenoma pleomórfico pré-existente como: intracapsular (sem invasão); minimamente invasivo ($\leq 1.5\text{mm}$ de invasão); e francamente invasivo. Os tumores também foram previamente classificados de acordo com a presença de células epiteliais e/ou mioepiteliais, por meio de reações imunoistoquímicas para citoqueratina (células epiteliais), vimentina e α -actina de músculo liso (células mioepiteliais), como descrito anteriormente por Altemani et al. (2005). Os dados dos casos estudados estão relacionados na tabela 3. Foram analisados adenomas pleomórficos remanescentes no CXAP, um caso de glândula salivar normal e glândulas salivares normais presentes nos espécimes do CXAP.

Os cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina de cada tumor foram re-examinados e um bloco de cada caso foi escolhido para estudo imunoistoquímico.

Foram realizadas reações imunoistoquímicas no Laboratório de Patologia do Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic, utilizando os seguintes anticorpos policlonais: fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) (código (147): sc79, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA); e seus receptores FGFR-2 (ou Bek - código (C-17): sc-122 - Santa Cruz Biotechnology) e FGFR-1 (ou Flg - código (C-15):sc-121 - Santa Cruz Biotechnology). Foi empregado o método EnVision Peroxidase (DAKO Corp., 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 organossilano a 10% em álcool etílico (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 imunoistoquímico;
- 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 cinco minutos cada em gradiente decrescente de álcoois, sendo: três banhos em álcool absoluto, um banho em álcool a 95% e um em álcool a 85%;
- d) recuperação dos sítios antigênicos: foi realizada com ácido cítrico à 0,1M, pH 6,0 em banho-maria a 95°C por 30 minutos, lavagem em água corrente e água destilada por 10 minutos cada;

- e) 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, uma lavagem com água destilada e duas lavagens com solução tampão de TRIS 0,05M pH 7,4;
- f) incubação dos anticorpos primários: os anticorpos primários foram diluídos em BSA 1%, na titulação e tempos otimizados (tabela 2), duas lavagens com solução tampão de TRIS 0,05M pH 7,4;

Tabela 2 - Título e tempo de incubação dos anticorpos primários.

Anticorpo	Título Soro Primário	Tempo de incubação
FGF-2*	1:100	18 horas (ON)
FGFR-1 (Flg)*	1:150	18 horas (ON)
FGFR-2 (Bek)*	1:50	40 min.

*Santa Cruz Biotechnology, Inc.
ON= Over night

- g) incubação dos anticorpos secundários: os reagentes EnVision Peroxidase Rabbit (cod. K4002, DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA), foram incubados nos cortes previamente com os anticorpos conforme recomendações do fabricante. Por ser um sistema de anticorpo livre de biotina, evita resultados falsos positivos por reação cruzada com a biotina tecidual, duas lavagens com solução tampão de TRIS 0,05M pH 7,4;
- h) revelação da reação: a reação foi revelada com DAKO Liquid DAB plus (cod. K3468) (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA), um cromógeno de coloração acastanhada, segundo recomendações do fabricante, duas

lavagens com solução tampão de TRIS 0,05M pH 7,4 e uma lavagem com água destilada;

- i) contra-coloração: os cortes foram imersos em hematoxilina de Mayer por 10 minutos para a contra-coloração, duas lavagens com água destilada;
- j) desidratação: as lâminas passaram por cinco minutos numa série de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e 100%);
- k) diafanização: as lâminas passaram em dois banhos de cinco minutos cada em xilol;
- l) montagem: as lâminas foram montadas colando-se as lamínulas sobre os cortes histológicos com Permount®;

Foram observadas e registradas a expressão e as localizações dos anticorpos utilizados em microscopia de luz para avaliação qualitativa e quantitativa dos casos utilizados.

Foi efetuada contagem de células em cinco campos aleatórios em aumento de 400X. Utilizando o programa de contagem de células ImageJ (Rasband, 1997, 2007; Collins, 2007), e posterior quantificação segundo critério de porcentagem de células positivas à imunomarcação (Goldstein et al., 2007).

Tabela 3 - Sexo, idade, localização, componente e grau de invasão dos casos de AP e CXAP.

Caso (nº Lâmina)	Sexo	Idade (anos)	Glândula Salivar/Localização	Componente	Grau de invasão
Casos de Adenoma Pleomórfico					
1 (005)	M	20	Lábio Superior		
2 (401)	F	*	Lábio Superior		
3 (2149)	F	30	Lábio Superior		
Casos de Carcinoma Ex-adenoma Pleomórfico					
1. (9337)	M	58	Parótida	Epitelial	Intracapsular
2. (7695/96)	F	50	Parótida	Epitelial	Intracapsular
3. (62586)	F	37	Submandibular	Epitelial	Intracapsular
4. (48707)	F	51	Parótida	Epitelial	Intracapsular
5. (6599)	F	65	Parótida	Epitelial	Minim/e invasivo
6. (27907)	F	43	Parótida	Epitelial	Minim/e invasivo
7. (8899/94)	M	74	Parótida	Epitelial	Minim/e invasivo
8. ((36710)	M	64	Parótida	Epitelial	Minim/e invasivo
9. (2011/03)	F	62	Submandibular	Epitelial	Franca/e invasivo
10. (12079/96)	M	66	Parótida	Epitelial	Franca/e invasivo
11. (IO4-6657)	F	86	Submandibular	Epitelial	Franca/e invasivo
12. (23257)	F	55	Palato	Epitelial/Mioepitelial	Franca/e invasivo
13. (1164)	M	65	Parótida	Epitelial/Mioepitelial	Franca/e invasivo
14. (70320)	F	50	Parótida	Epitelial/Mioepitelial	Franca/e invasivo
15. (45988)	F	74	Palato	Mioepitelial	Franca/e invasivo

* Dados não disponíveis

Minim/e = minimamente

Franca/e=francamente

5 RESULTADOS

A expressão imunohistoquímica foi avaliada nos três casos de adenoma pleomórfico (AP) e nos casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) com componente epitelial apenas, sendo quatro casos intracapsulares, cinco minimamente invasivos e três francamente invasivos, três casos de CXAP francamente invasivos com componente epitelial e mioepitelial, e um caso de CXAP francamente invasivo com componente mioepitelial apenas. A co-expressão do FGF-2 e seu receptor FGFR-1 foi evidente no AP, enquanto que no CXAP ocorre a expressão do FGF-2 e ambos receptores, com exceção de células mioepiteliais benignas em áreas *in situ* do CXAP com componente epitelial apenas. A positividade da expressão de todos imunomarcadores utilizados neste estudo foi presente tanto no núcleo como no citoplasma das células neoplásicas tanto no AP como no CXAP. Logo abaixo segue a descrição de cada tipo histológico estudado e resultados da contagem de células resumidos nas tabelas 4 e 5 e gráficos 1, 2 e 3.

Glândula Salivar Normal Menor (figuras 4a, c e e)

A glândula salivar menor observada neste estudo apresentava componentes glandulares seromucosos. O FGF-2 foi expresso no citoplasma das células do sistema ductal. Células basais dos ductos excretorios e células mioepiteliais apresentaram positividade para o FGF-2 no núcleo (raras células) e citoplasma. O FGFR-1 e FGFR-2 estavam presentes no núcleo e citoplasma de algumas células do sistema ductal. Alguns núcleos e citoplasmas das células

serosas de estruturas semilunares apresentaram positividade para o FGFR-2. As células mucosas foram negativas ao FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2.

Glândula Salivar Normal Maior (figuras 4b, d e f)

O FGF-2 estava presente no citoplasma de células luminiais de ductos intercalares e excretoras, sendo negativo nos ácinos serosos. O FGFR-1 e FGFR-2 foram fortemente expressos no núcleo e citoplasma das células do sistema ductal. As células serosas apresentaram positividade ao FGFR-1 apenas.

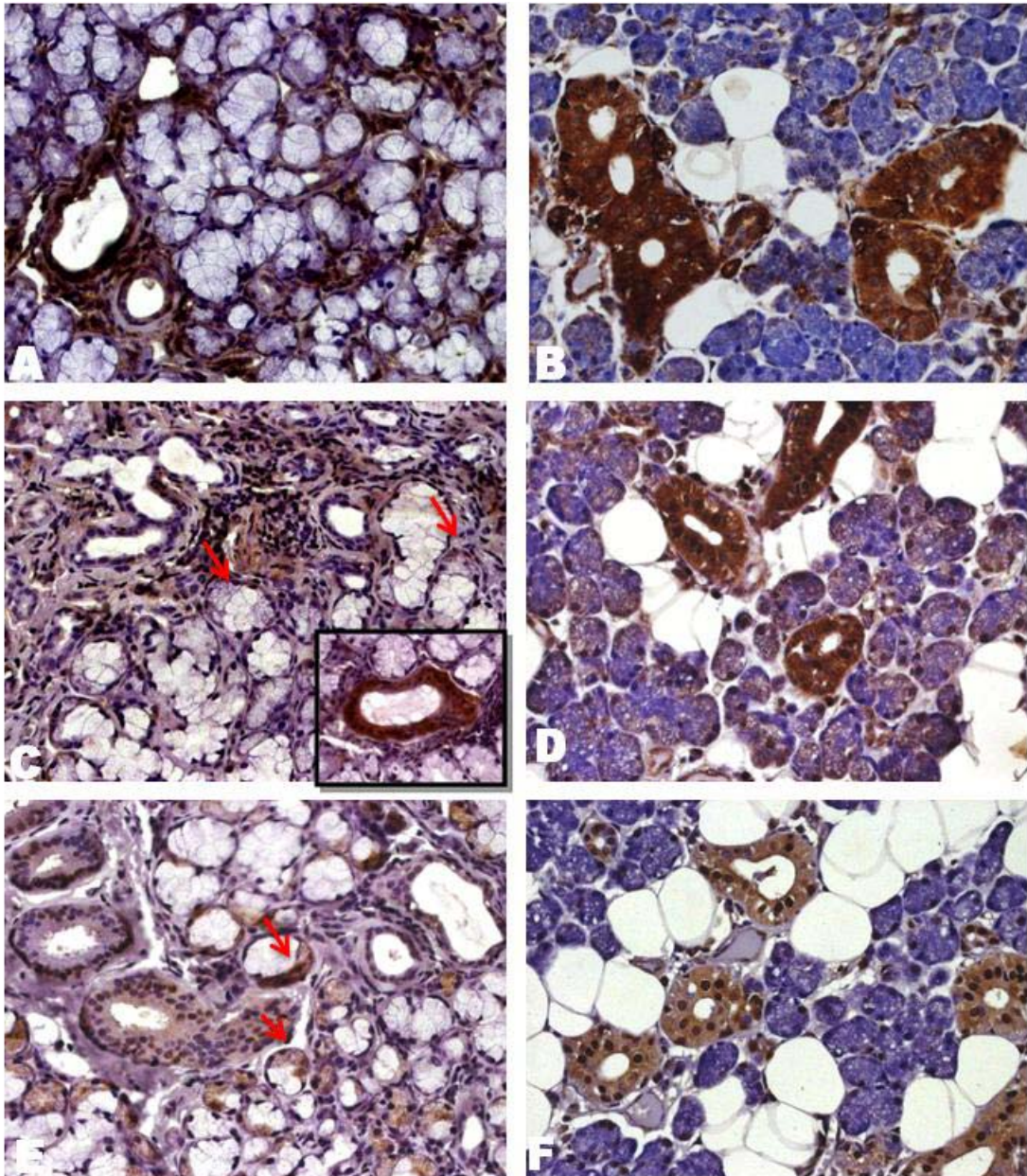


Figura 4 - Expressão imunoistoquímica de FGF e seus receptores em glândula salivar normal: A, C e E: glândula salivar menor com componente glandular mucoso e seroso; B, D e F: glândula salivar maior. A e B: expressão do FGF-2 nas estruturas ductiformes. C, expressão do FGFR-1 nas estruturas ductiformes da glândula salivar normal menor, setas indicam estruturas semilunares negativas ao FGFR-1, no detalhe observa-se forte expressão em ducto excretor. D: expressão do FGFR-1 nas estruturas ductiformes e células serosas. E: expressão do FGFR-2 nas estruturas ductiformes e semilunares (setas). F: expressão do FGFR-2 nas estruturas ductiformes em glândula salivar normal maior. Figuras em aumento de 400x.

Adenoma Pleomórfico (figura 5a à f)

O FGF-2 mostrou expressão uniforme e intensa em todos os três casos estudados. Nas estruturas ductiformes foi positivo em algumas células luminais, estando presente no núcleo e no citoplasma das células mioepiteliais plasmocitóides, fusiformes e hialinas. A média da porcentagem da expressão do FGF-2 no citoplasma foi de 85,08% (variando de 74,34% a 90,46%), no núcleo foi de 46,70% (variando de 21,71% a 90,38%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente foi de 34,21% (variando de 7,23% a 85,20%).

O FGFR-1 foi expresso focalmente, sendo positivo no citoplasma e núcleo de algumas células luminais das estruturas ductiformes, expresso no citoplasma e raros núcleos de células mioepiteliais plasmocitóides e citoplasma de células hialinas. A média da porcentagem da expressão do FGFR-1 no citoplasma foi de 46,43% (variando de 2,61% a 81%), no núcleo foi de 4,07% (variando de 0,20% a 9,56%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente foi de 3,30% (variando de 0% a 7,32%).

O FGFR-2 apresentou discreta positividade em áreas focais do AP, com baixa porcentagem de positividade em todos os casos de AP. Sendo a porcentagem média da expressão no citoplasma de 2,66% (variando de 0,52% a 5,97%), no núcleo foi de 9,67% (variando de 0,36% a 15,71%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente foi de 0,73% (variando de 0% a 1,42%).

O único caso com estroma condróide encontrado foi em área remanescente de AP em CXAP, apresentando negatividade por todos imunomarcadores utilizados neste estudo, assim como as células estromais.

Os casos de AP remanescente, presentes nos casos de CXAP intracapsulado e minimamente invasivo, apresentaram a expressão do FGF-2 e de ambos receptores semelhante aos três casos de AP sem presença de carcinoma.

A porcentagem da expressão no citoplasma, no núcleo, e núcleo e citoplasma simultaneamente, em cada caso de AP estudado, estão especificadas na tabela 4, logo abaixo.

Tabela 4 - Distribuição da expressão do FGF e seus receptores no AP, de acordo com a localização no núcleo e/ou citoplasma das células.

Imunomarcador	FGF-2			FGFR-1			FGFR-2		
	C	N	C/N	C	N	C/N	C	N	C/N
Localização da expressão em cada caso (nº Lâmina)									
1 (005)	90,44%	90,38%	85,20%	2,61%	0,20%	0%	1,51%	12,95%	0,77%
2 (401)	90,46%	21,71%	10,20%	81%	2,44%	2,59%	0,52%	0,36%	0%
3 (2149)	74,34%	28,02%	7,23%	55,87%	9,56%	7,32%	5,97%	15,71%	1,42%
MÉDIA (%)	85,08%	46,70%	34,21%	46,43%	4,07%	3,30%	2,66%	9,67%	0,73%

C= citoplasma

N= núcleo

C/N= citoplasma e núcleo

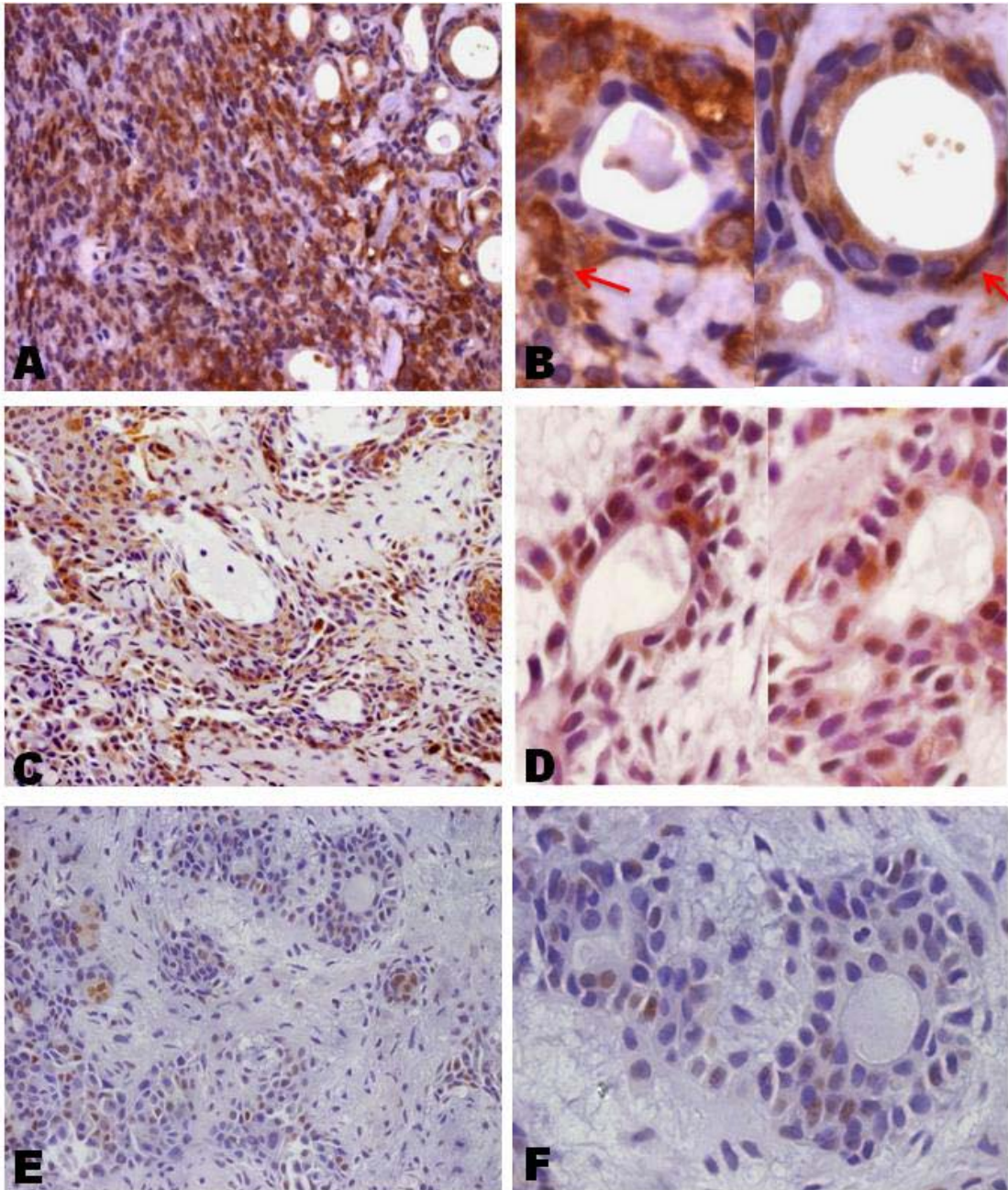


Figura 5 - Expressão imunoistoquímica de FGF e seus receptores FGFR-1 e FGFR-2 em AP: A, C, E: expressão do FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em aumento de 200x. B, D e F: detalhe da expressão dos imunomarcadores utilizados nas estruturas ductiformes. B: expressão do FGF-2, no núcleo (setas) e citoplasma de algumas células mioepiteliais em torno das estruturas ductiformes e expressão, ora positiva, ora negativa, nas células luminais. D: detalhe da expressão positiva do FGFR-1 em algumas células luminais e mioepiteliais, tanto em núcleo como no citoplasma das células. F: expressão do FGFR-2 no núcleo de algumas células luminais e mioepiteliais.

Carcinoma ex-adenoma pleomórfico com componente epitelial apenas

a) intracapsular e minimamente Invasivo

Nas áreas *in situ*, as células mioepiteliais benignas, em torno das células luminais malignas, apresentaram forte expressão do FGF-2 no núcleo e citoplasma, porém a expressão dos receptores foi negativa nestas células. As células luminais malignas apresentaram expressão de FGF-2 e FGFR-2 no citoplasma e forte expressão de FGFR-1 no núcleo e citoplasma (figuras 6a à f)

Nas áreas de invasão, o FGF-2 e ambos receptores foram fortemente expressos no citoplasma e alguns núcleo das células nos ninhos celulares maiores. Nos ninhos celulares menores, observou-se a ausência parcial da expressão destes fatores, sendo o FGF-2 expresso no citoplasma das células e raros núcleos, notadamente nos grupos celulares mais próximos à cápsula (figuras 7a, c e e)

Nos quatro casos de CXAP intracapsular, o FGF-2 foi fortemente expresso em 89,94% dos citoplasmas (variando de 66,22% a 91,37%), 44,05% dos núcleos (variando de 18,62% a 58,56%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente foi de 41,99 % (variando de 17,34% a 51,87%). O FGFR-1 foi fortemente expresso em 79,17% dos citoplasmas (variando de 45,36% a 95,14%), 48,51% dos núcleos (variando de 21,61% a 88,32%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente foi de 42,96 % (variando de 10,42% a 79,62%). O FGFR-2 foi positivo em 90,68% dos citoplasmas (variando de 84,39% a 97,91%), em 81,67% dos núcleos (variando de 68,80% a 97,72%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente em 80,05% (variando de 65,66% a 93,31%)

Nos quatro casos de CXAP minimamente invasivo, a porcentagem da expressão de FGF-2 foi de 88,47% no citoplasma (variando de 81,21% a 92,39%),

44,90% no núcleo (variando de 14,48% a 70,12%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente em 45,60% (variando de 14,40% a 74,72%). O FGFR-1 foi fortemente expresso em 79,55% dos citoplasmas (variando de 75,68% a 85,57%), 48,59% dos núcleos (variando de 29,34% a 63,31%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente foi de 41,74 % (variando de 25,10% a 57,79%). O FGFR-2 foi positivo em 61,37% dos citoplasmas (variando de 1,70% a 90,47%), em 31,44% dos núcleos (variando de 1,53% a 94,64%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente em 32,63% (variando de 0,12% a 89,66%)

A porcentagem da expressão em cada caso de CXAP intracapsular e de CXAP minimamente invasivo está na tabela 5.

b) francamente invasivo

Nos três casos do tipo invasivo ocorreu forte expressão de todos imunomarcadores estudados. O FGF-2 foi positivo no citoplasma em 80,15% das células carcinomatosas (variando de 67,49% a 89,59%), no núcleo, em 17,88% (variando de 8,84% a 29,26%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente em 13,56% das células carcinomatosas (variando de 6,59% a 27,29%). O FGFR-1 foi expresso no citoplasma em 63,76% das células (variando de 60,22% a 69,47%), no núcleo em 49,92% (variando de 43,87% a 60,63%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente em 32,37% (variando de 23,42% a 38,41%). O FGFR-2 esteve presente no citoplasma de 81,42% das células (variando de 70,45% a 91,66%), sendo a sua expressão no núcleo em 25,74% (variando de 2,46% a 72,22%) e núcleo com citoplasma simultaneamente em 24,45% (variando de 1,52% a 69,84%). A porcentagem da expressão de cada caso de CXAP francamente invasivo com componente epitelial apenas se encontra também na tabela 5 (figuras 7a, c e e).

Carcinoma ex-adenoma pleomórfico francamente invasivo com componente epitelial e mioepitelial.

Nos três casos do tipo invasivo com componente epitelial e mioepitelial, o FGF-2 foi positivo nas células luminais e áreas focais nas células mioepiteliais neoplásicas. Esteve presente em 73,70% no citoplasma das células (variando de 61,81% a 82,82%), 61,55% no núcleo (variando de 58,11% a 69,36%), e em 53,07% no núcleo e citoplasma simultaneamente (variando de 36,17% a 64,16%). Enquanto que o FGFR-1 esteve presente de forma uniforme nas células luminais e mioepiteliais, em média de 81,30% no citoplasma (variando de 64,50% a 88,43%), no núcleo em 45,74% (variando de 33,95% a 73,49%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente em 35,27% (variando de 23,94% a 43,60%). O receptor FGFR-2 foi observado em células luminais, presente em 60,81% no citoplasma (variando de 46,36% a 77,66%), núcleo em 80,45% (variando de 70,45% a 86,14%) e em 46,01% no núcleo e citoplasma simultaneamente (variando de 31% a 55,53%). (figuras 8A, C e E). A contagem de células inclui células mioepiteliais e luminais malignas e estão especificadas na tabela 5.

Carcinoma ex-adenoma pleomórfico com componente mioepitelial apenas

No único caso do tipo invasivo com componente mioepitelial apenas o FGF-2 apresentou positividade no citoplasma em 99,46%, no núcleo em 0,36% e no núcleo e citoplasma em 0,16% das células neoplásicas. Ambos receptores foram fortemente expressos tanto no citoplasma (99,52% para o FGFR-1 e 100% para o FGFR-2) como no núcleo das células (86,44% para o FGFR-1 e 91,66% para o FGFR-2). A expressão núcleo /citoplasma para o FGFR-1 foi de 86,20% e para FGFR-2 de 91,66% (figuras 8b, d e f).

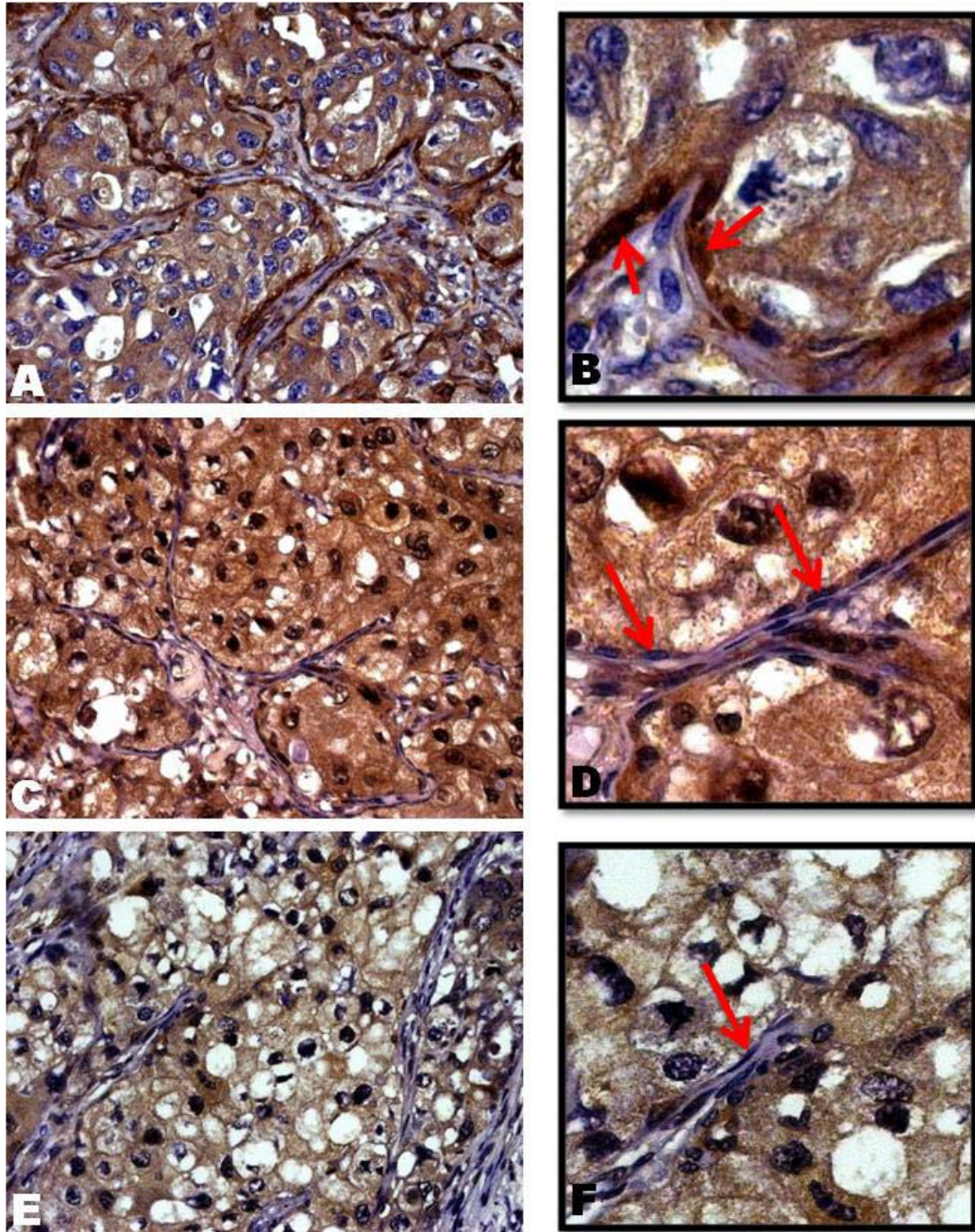


Figura 6 - Expressão imunoistoquímica de FGF e seus receptores FGFR-1 e FGFR-2 em áreas *in situ* do CXAP minimamente invasivo: A, C e E: células carcinomatosas positivas para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em aumento de 400x. B, D e F: detalhe em maior aumento das células mioepiteliais benignas (setas). B: células mioepiteliais benignas positivas ao FGF-2. D e F: células mioepiteliais benignas negativas aos receptores FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em áreas *in situ*.

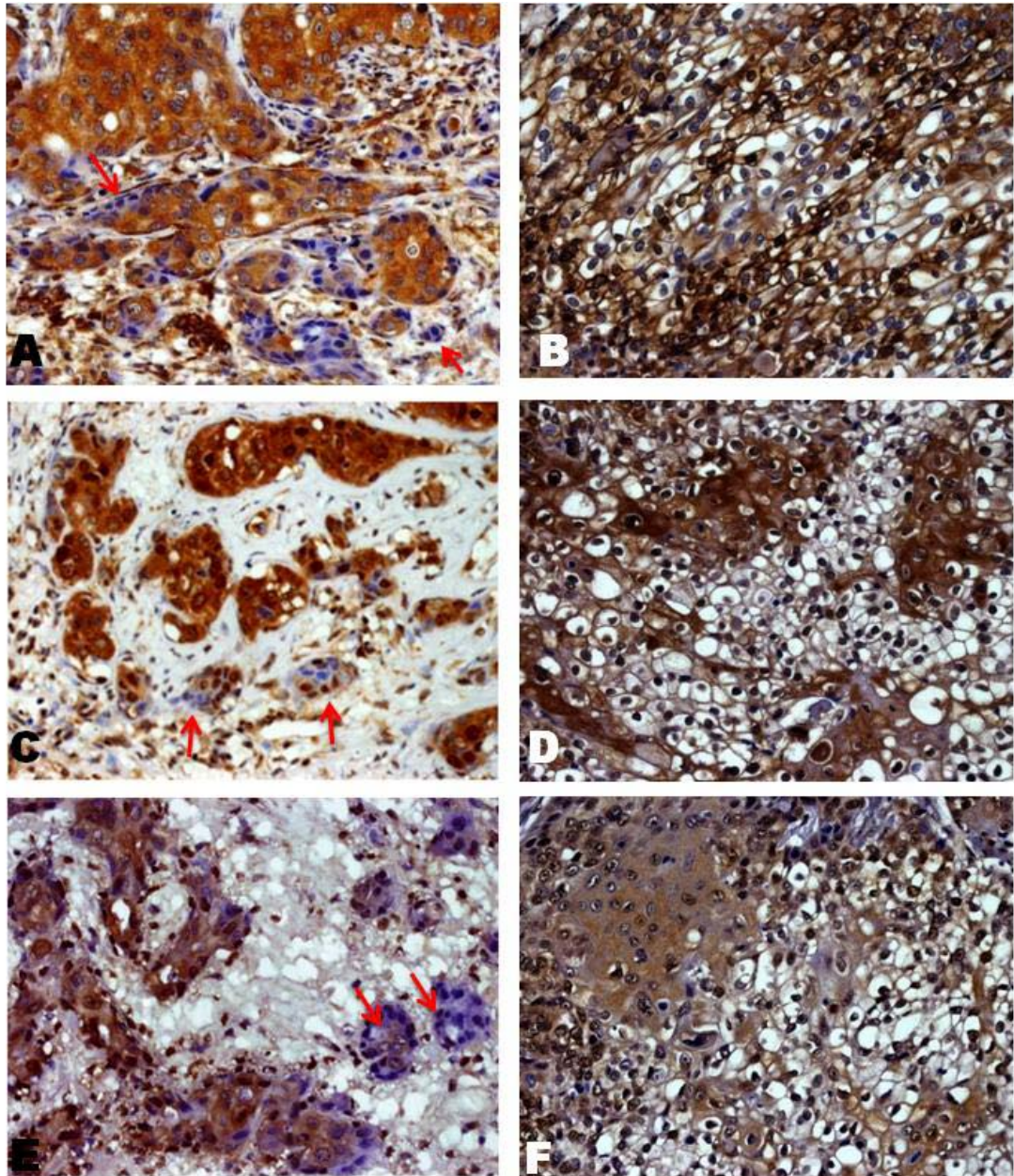


Figura 7- Expressão imunoistoquímica de FGF e seus receptores em CXAP minimamente invasivo e francamente invasivo com componente epitelial apenas: A, C e E: expressão positiva para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em ninhos de células carcinomatosas de CXAP minimamente invasivo e expressão parcial em blocos celulares menores (setas). B, D e F: expressão positiva para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, em extensos lençóis de células carcinomatosas no CXAP francamente invasivo com componente epitelial apenas. Figuras em aumento de 400x.

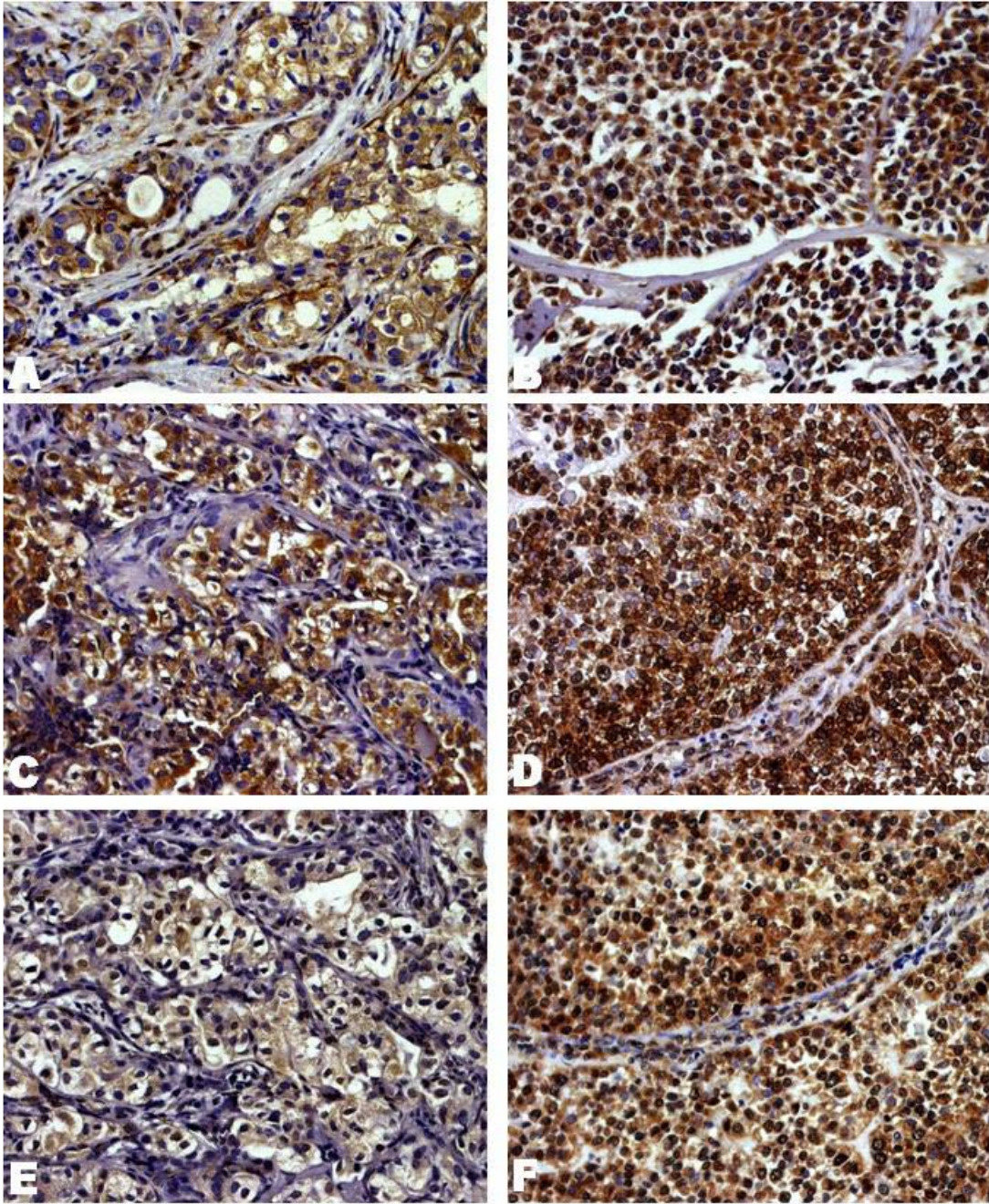


Figura 8 - Expressão imunistoquímica de FGF e seus receptores em CXAP francamente invasivo com componente epitelial e mioepitelial: A, C e E: apresentando expressão positiva para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, nas células neoplásicas no CXAP francamente invasivo com componente epitelial e mioepitelial. B, D e F: expressão positiva para o FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2, respectivamente, nas células neoplásicas de CXAP francamente invasivo com componente mioepitelial apenas. Figuras em aumento de 400x.

Tabela 5 - Distribuição da expressão do FGF e seus receptores no CXAP, de acordo com a localização no núcleo e/ou citoplasma das células.

	Imunomarcador	FGF-2			FGFR-1			FGFR-2		
		C	N	C/N	C	N	C/N	C	N	C/N
	Localização da expressão em cada caso (nº Lâmina)									
Intracapsular com Componente Epitelial Apenas	1. (9337)	66,22%	21,26%	17,34%	45,36%	21,61%	10,42%	85,68%	71,01%	68,09%
	2. (7695/96)	89,48%	58,56%	51,87%	84,25%	25,56%	25,52%	84,39%	68,80%	65,66%
	3. (62586)	91,37%	39,97%	40,65%	95,14%	88,32%	79,62%	94,75%	93,15%	93,15%
	4. (48707)	87,14%	18,62%	18,14%	91,94%	58,56%	56,30%	97,91%	97,72%	93,31%
	Média*	89,94%	44,05%	41,99%	79,17%	48,51%	42,96%	90,68%	81,67%	80,05%
Minimamente Invasivo com Componente Epitelial Apenas	5. (6599)	92,39%	52,47%	54,45%	77,28%	66,31%	57,79%	73,56%	2,42%	15,25%
	6. (27907)	89,29%	14,48%	14,40%	75,68%	29,34%	25,10%	90,47%	94,64%	89,66%
	7. (8899/94)	91,00%	70,12%	74,72%	85,57%	51,47%	42,55%	79,77%	27,17%	25,50%
	8. (36710)	81,21%	42,52%	38,82%	79,67%	47,24%	41,51%	1,70%	1,53%	0,12%
	Média*	88,47%	44,90%	45,60%	79,55%	48,59%	41,74%	61,37%	31,44%	32,63%
Francamente Invasivo com Componente Epitelial Apenas	9. (2011/03)	89,59%	29,26%	27,29%	69,47%	45,26%	35,26%	91,66%	2,46%	2%
	10. (12079/96)	67,49%	8,84%	6,79%	60,22%	43,87%	23,42%	70,45%	2,53%	1,52%
	11. (IO4-6657)	83,37%	15,54%	6,59%	61,59%	60,63%	38,41%	82,14%	72,22%	69,84%
	Média*	80,15%	17,88%	13,56%	63,76%	49,92%	32,37%	81,42%	25,74%	24,45%
	Francamente Invasivo com Componente Epitelial e Mioepitelial	12. (23257)	61,81%	59,45%	36,17%	69,58%	44,87%	30,38%	77,66%	84,76%
13. (1164)		82,82%	58,11%	64,16%	88,43%	33,95%	23,94%	46,36%	70,45%	31,00%
14. (70320)		76,47%	69,36%	58,88%	64,50%	73,49%	43,60%	58,41%	86,14%	51,48%
Média*		73,70%	61,55%	53,07%	81,30%	45,74%	35,27%	60,81%	80,45%	46,01%
Francamente Invasivo com Componente Mioepitelial apenas		15. (45988)	99,46%	0,36%	0,16%	99,52%	86,44%	86,20%	99,80%	91,66%

C= citoplasma

N= núcleo

C/N= citoplasma e núcleo

*Porcentagem média dos casos

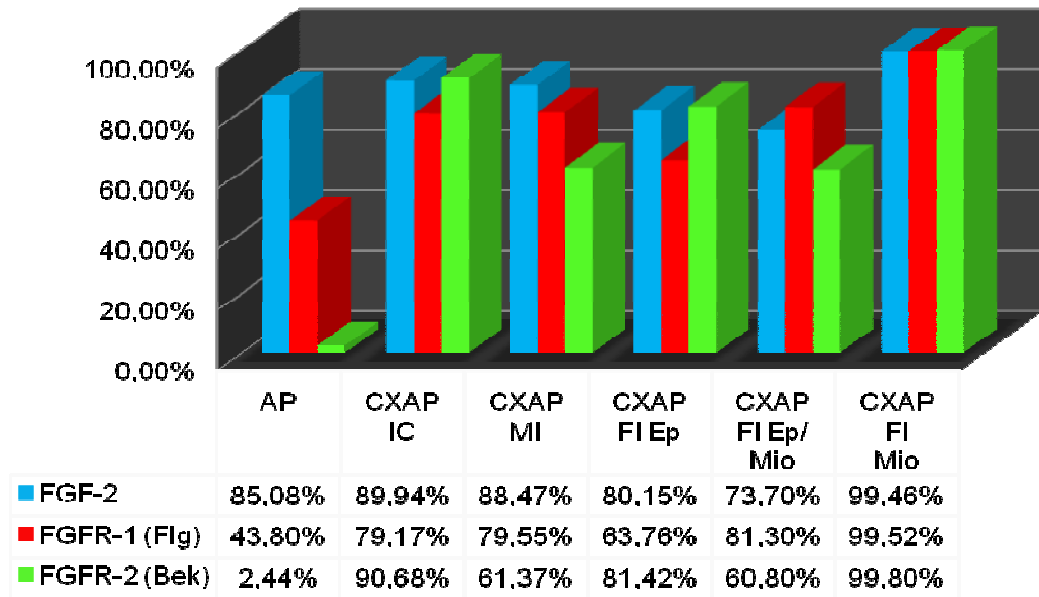


Gráfico 1 - Expressão de FGF-2 e seus receptores no citoplasma das células de AP e CXAP.

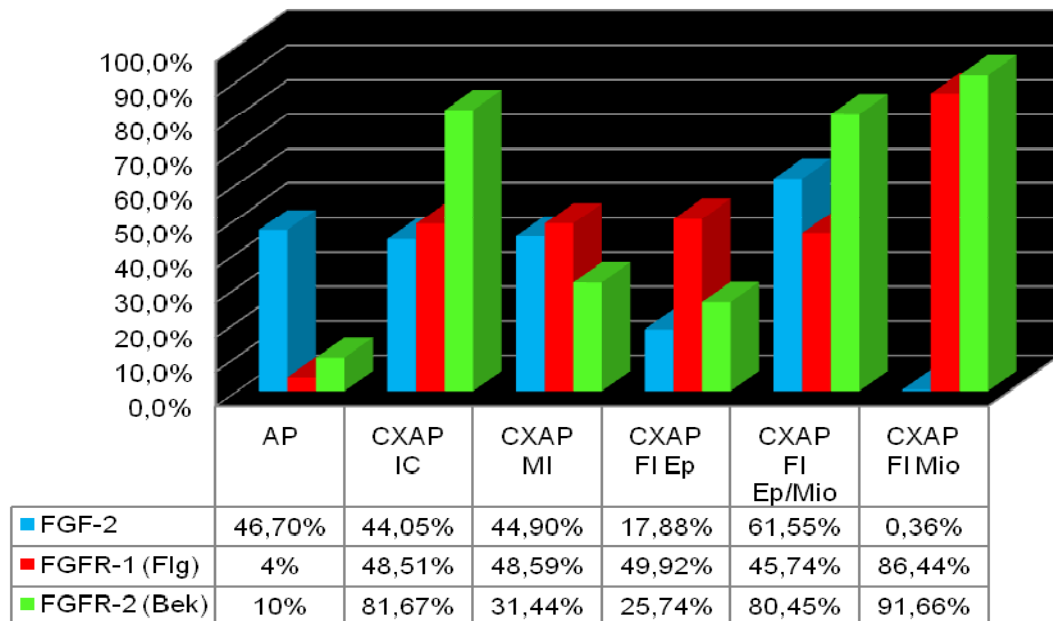


Gráfico 2 - Expressão do FGF-2 e seus receptores no núcleo das células de AP e CXAP

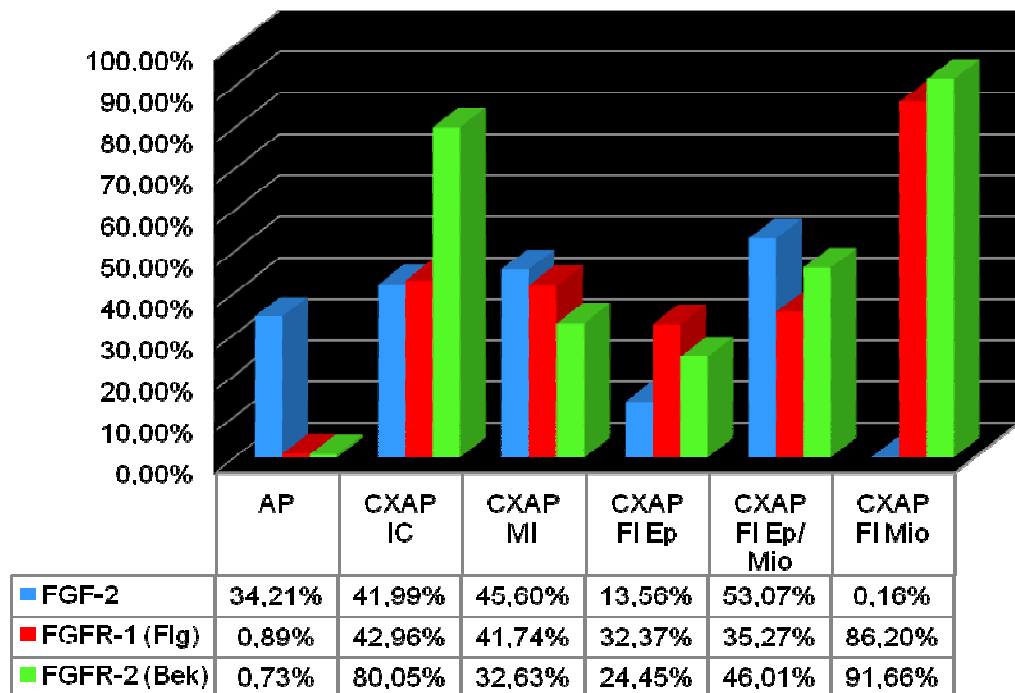


Gráfico 3 - Expressão do FGF-2 e seus receptores simultaneamente no citoplasma e núcleo das células de AP e CXAP

Gráficos 1, 2 e 3:

IC= Intracapsular

MI= Minimamente invasivo,

FI Ep= Francamente Invasivo com componente epitelial apenas,

FI Ep/Mio= Francamente Invasivo com componente epitelial e mioepitelial,

FIMio= Francamente Invasivo com componente mioepitelial apenas.

6 DISCUSSÃO

A diversidade estrutural do CXAP (carcinoma ex-adenoma pleomórfico) permite-nos um perfeito modelo de estudo da evolução da carcinogênese, desde a transformação maligna de um tumor benigno, no caso o AP (adenoma pleomórfico) em CXAP, até a evolução de um carcinoma *in situ* em invasivo.

Diversas famílias de fatores de crescimento estão envolvidas na iniciação e progressão do carcinoma (Myoken et al., 1997; Konig et al., 1997; Sumitomo et al., 1999; Fernig et al., 2000; Cavallaro et al., 2001; Gabrilove, 2001; Kusafuka et al., 2001; Yura et al., 2001; Bhowmick, Moses, 2005; Grose, Dickson, 2005; Yang et al., 2007) e entre elas encontra-se a família de FGF. O FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos-2) e seus receptores têm sido amplamente estudados na tumorigênese (Grose, Dickson, 2005) de carcinomas de mama, próstata, bexiga (Volm et al., 1997, Wakulich et al., 2002, Chaffer et al., 2007, Korah et al., 2007), neoplasias sanguíneas (Konig et al., 1997; Gabrilove, 2001) e neurais como o astrocitoma (Yamaguchi et al., 1994) além de tumores de glândula salivar (Sumitomo et al., 1999, Yura et al., 2001). Sendo expresso em células mioepiteliais normais e células mioepiteliais modificadas (do inglês, *myoepithelial-like*) de mama (Ke et al., 1993, Rudland et al., 1995), é considerado produto proveniente destas células, associado a diferenciação das células epiteliais em um fenótipo mioepitelial (Ke et al., 1993).

As células mioepiteliais são componentes importantes de vários tumores benignos e malignos de glândula salivar, contribuindo para a diversidade de padrões histológicos e baixo grau de malignidade destes tumores (Araújo et al., 2006). Em áreas de carcinoma intraductal de CXAP as células mioepiteliais benignas sofrem modificações provocadas pelas células epiteliais malignas, e tornam-se bem

diferenciadas, produzindo importantes proteínas relacionadas à supressão tumoral (Barsky, 2003, Barsky, Karlin, 2005, Araújo et al., 2006).

A fim de elucidar o papel do FGF-2 (ou FGFb) e seus receptores FGFR-1 (ou Flg) e FGFR-2 (ou Bek) na tumorigênese do CXAP, e possível atuação na diferenciação das células mioepiteliais benignas, foi utilizado a técnica imunistoquímica, observando as estruturas ductiformes e componentes celulares epiteliais e mioepiteliais que compõem estas neoplasias.

Para quantificar a expressão imunistoquímica nos casos estudados foi efetuado a porcentagem de células positivas a imunomarcação, segundo recomendações dos membros do Comitê Ad-Hoc de padronização em imunistoquímica (Goldstein et al., 2007), de acordo com a expressão no núcleo e/ou citoplasma das células tumorais.

O FGF-2 faz parte de uma família de polipeptídios heparina-ligantes, localizado na matriz extracelular, citoplasma e núcleo das células (Delrieu et al., 2000, Itoh, Ornitz, 2001). Atua de forma intrácrina, parácrina e autócrina nas células (Maher, 1996, Arese et al., 1999, Delrieu et al., 2000) ativando vias de sinalizações intracelulares através de receptores transmembrana tirosina quinase (FGFR-1 e FGFR-2) (Ornitz et al. 1996, Ornitz, Itoh, 2001, Itoh, Ornitz, 2004, Eswarakumar et al., 2005), ou através da internalização do fator no citoplasma, e posterior translocação para o núcleo e direta ação no nucléolo participando da transcrição do RNAr (Sheng et al., 2005). No núcleo promove função mitogênica, diferenciação celular, angiogênese, transformação fenotípica (Yu et al., 1993, Baldin et al., 1990), além de aumentar a sobrevivência de células tumorais e células tronco (Dow, deVere White, 2000; Gabilove, 2001; Presta et al., 2005; Yeoh, Haan, 2007).

Em células endoteliais foi demonstrado que o FGF-2 media a migração e adesão celular, através do aumento da expressão de integrinas e degradação de caderinas, (Florkiewicz, Sommer, 1989; Allouche, Bikfalvi, 1995; Dow, deVere White, 2000). É considerado como a chave para progressão de tumores primários para metastáticos (Dow, deVere White, 2000) através de sua habilidade angiogênica (Javerzat et al., 2002, Presta et al., 2005), atua na transformação maligna (Yamaguchi et al., 1994), e na mitogênese (Florkiewicz, Sommer, 1989; Allouche, Bikfalvi, 1995; Dow, deVere White, 2000; Chaffer et al., 2007; Grose, Dickson, 2005) estimulando o crescimento celular, além de exercer função antiapoptótica (Konig et al., 1997; Gabilove, 2001) e diferenciação celular (Chen et al., 2000).

Na embriogênese da glândula salivar o FGFR-1 é necessário para o desenvolvimento do epitélio inicial de glândula salivar em desenvolvimento e sobrevivência celular (Alzeimer, Werner, 2005), enquanto que o FGFR-2 é essencial para o desenvolvimento dos primórdios glandulares. Ratos em formação, sem FGFR-2 apresentam agenesia de glândula salivar, e com baixas expressões deste receptor originam glândulas hipoplásicas (Ohuchi et al., 2000; Patel et al., 2006). Devido ao fato do tumor de glândula salivar conter componentes glandulares neoplásicos em variados graus de diferenciação ou representados pelas suas células precursoras (Araújo et al., 1996, Furuse et al., 2005), procurou-se estudar ambos receptores FGFR-1 e FGFR-2 nestes tumores, inclusive as células mioepiteliais benignas.

Em glândula salivar normal observou-se a expressão do FGF-2 e seus receptores no sistema de ductos e ácinos serosos (FGFR-1 em glândula salivar maior e FGFR-2 em glândula salivar menor), porém os ácinos mucosos apresentaram expressão negativa a todos imunomarcadores utilizados,

corroborando com resultados encontrados por Sumitomo et al. (1999) e Myoken et al. (1996). Estudo prévio (Araújo et al., 2008) demonstrou, através da expressão de STAT-3 em glândula salivar normal e tumores de glândula, que células acinares mucosas são células terminais bem diferenciadas, sendo o único tipo celular a não apresentar expressão de STAT-3 em glândula salivar normal. Estas células perdem a capacidade de proliferação, enquanto que células acinares serosas são capazes de duplicar, apresentando positividade ao STAT-3. O STAT-3 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription-3*) é uma proteína de transcrição citoplasmática que transmite sinais, usualmente provenientes de receptores transmembrana, para o núcleo onde se liga a específicas sequências promotoras de DNA, regulando a expressão gênica, atuando na proliferação, sobrevivência, diferenciação e desenvolvimento celular (Araújo et al., 2008). Este fato reforça a ação do FGF na proliferação celular das estruturas da glândula salivar.

O presente estudo mostrou que o AP e o AP remanescente (presente nos casos de CXAP) apresentaram a expressão dos imunomarcadores estudados de forma semelhante, independentemente da presença ou não de um carcinoma. O FGF-2 esteve presente nas estruturas ductiformes e no núcleo e citoplasma das células mioepiteliais neoplásicas, principalmente nas células mioepiteliais plasmocitóides e fusiformes, apresentando co-expressão do receptor FGFR-1 e discreta expressão do FGFR-2 localizada no núcleo de algumas células das estruturas ductiformes, e em áreas focais de células mioepiteliais plasmocitóides, sugerindo a ação do fator por mecanismo autócrino via receptor FGFR-1. Estes resultados corroboram com os resultados de Myoken et al. (1997) e Kusafuka et al. (1998, 2001), que observaram a expressão de FGF-1, FGF-2 e FGFR-1 em AP, através da técnica imunoistoquímica, observando a imunomarcagem do FGF-2 e

FGFR-1 no citoplasma e membrana das células tumorais, porém não observaram a expressão de FGFR-2. Kusafuka et al. (1998) citaram que a presença do FGFR-1 é necessário para a indução autócrina do FGF-2 na proliferação de células neoplásicas e mioepiteliais modificadas em AP.

Embora em mama seja descrito que células luminais não expressam FGF-2 (Rudland et al., 1995), no AP algumas células luminais são positivas, sugerindo que isso pode ser devido ao fato destas células luminais serem células transicionais. Myoken et al. (1996) observaram a expressão positiva, de FGF-2 e FGFR-1, nas células luminais de quatro casos, dos doze casos de glândula salivar normal estudados, sendo a imunolocalização dos fatores predominantemente intracelular, sugerindo que estes fatores são produzidos de forma endógena.

É interessante observar que o único caso com estroma condróide foi em área remanescente de CXAP, apresentando negatividade para todos imunomarcadores utilizados neste estudo. Podemos incluir este caso nos 50% dos casos negativos ao fator, nestas áreas de AP, citados por Kusafuka et al. (1998).

Apesar da alta expressão do FGF-2 no AP (Myoken et al., 1997; Kusafuka et al., 1998), através de estudo imunoistoquímico em AP, Kusafuka et al. (2001) relataram, que a pouca vascularização em áreas condróides destes tumores se dá pela inibição da função angiogênica do FGF-2, pela presença de ChM-I (do inglês, *Chondromodulin-I*), que é uma glicoproteína da matriz cartilagem específica capaz de inibir a neovascularização.

De acordo com Maher (1996), fibroblastos em cultura na qual é adicionado FGF-2, sofrem a translocação do FGFR-1, presente na membrana celular, para o núcleo das células. Isso explica a expressão do FGFR-1 ora positivo no núcleo ora positivo no citoplasma de algumas células nos casos estudados na

presente pesquisa. A ativação do FGFR-1 na superfície celular desencadeia a indução da expressão da c-Jun, que é um componente do fator de transcrição AP-1 (do inglês, activator protein 1), e aumenta a expressão da ciclina D1 (uma das ciclinas responsáveis pelo ciclo celular), componentes necessários para a proliferação celular, seguido da translocação do receptor para o núcleo (Reilly, Maher, 2001). Estudo anterior do grupo (Etges et al., 2004), ao analisar a expressão de reguladores de ciclo celular na fase G1 em variados tumores benignos e malignos de glândula salivar, observou que tumores de glândula salivar apresentam desregulação do controle do ciclo celular Rb (retinoblastoma), expressando ciclina D1 nos tumores estudados, inclusive no AP, comparado a glândula salivar normal, o qual apresentou expressão negativa, comprovando que ocorre uma desregulação no ciclo celular para a proliferação tumoral.

Observando as áreas *in situ* de CXAP, onde células mioepiteliais benignas circundam áreas carcinomatosas, os resultados demonstram que as células mioepiteliais benignas sofrem alteração fenotípica com expressão aumentada de FGF-2. Estudo prévio do grupo, já citado anteriormente, tem demonstrado que estas células sofrem alteração fenotípica, tornando-se bem diferenciadas quando em contato com células carcinomatosas em áreas de CXAP intraductais (Araújo et al., 2006). E comparado a outros fatores de crescimento (dados não publicados) o FGF-2 foi o único expresso nestas células, podendo o mesmo estar implicado, entre suas variadas funções, na diferenciação destas células.

A atuação do FGF-2 nas células mioepiteliais, de acordo com os dados obtidos, atua de forma independente de FGFR-1 e FGFR-2, pois ambos se apresentaram negativos nas células mioepiteliais benignas nas áreas *in situ*. Este

resultado é encontrado por Ke et al. (1993), os quais observaram a expressão do FGF-2 e seus receptores (de alta e baixa afinidade, respectivamente o FGFR-1 e HSPG) em duas linhagens de células derivadas de glândula mamária humana, sendo uma das linhagens derivadas de células epiteliais de glândula mamária normal transformadas com vírus SV40 (*Simian Virus 40*) que originam células epiteliais (Huma 7) e myoepithelial-like (Huma 62) e a outra linhagem derivada de lesão benigna de mama humana, a qual dá origem a células myoepithelial-like espontaneamente. Ambas as linhagens apresentaram abundantes níveis de RNAm de FGF-2, constatando que o FGF-2 é produzido por estas células, não sendo detectado RNAm de receptores para FGF-2 na linhagem Huma 62.

A via de atuação do fator nas células mioepiteliais benignas pode ser via intrácrina (Arese et al., 1999, Okada-Ban et al., 1999, Delrieu, 2000), através da isoforma de FGF-2 nuclear, visto que foi encontrada a expressão do FGF-2 no núcleo destas células. A isoforma nuclear pode promover sobrevivência celular, proliferação, radiorresistência, estabilização do fenótipo endócrino, transdiferenciação de células Schwann precursoras em melanócitos (Delrieu, 2000). Porém para tal evidência é necessário um estudo mais profundo, pois o imunomarcador utilizado para o FGF-2, de acordo com o fabricante, é inespecífico para as variadas isoformas de FGF-2 existentes. Também não podemos descartar a hipótese da atuação de outras isoformas de FGFR não utilizados no estudo, como o FGFR-3, FGFR-4 e FGFR-5 no mecanismo autócrino das células mioepiteliais. Estudos são necessários sobre a atuação do FGF-2 por estas vias.

Nossos resultados mostraram que áreas malignas dos CXAPs com componente epitelial apenas expressam abundantemente ambos receptores em área onde o FGF-2 está presente. É importante focar que a superexpressão do

receptor FGFR-2 no CXAP, comparado ao AP, sugere a indução para um fenótipo maligno. O FGF-2 pode direcionar a migração das células endoteliais (Allouche, Bikfalvi, 1995, Myoken et al., 1997, Dow, deVere White, 2000, Ornitz, Itoh, 2001, Yura et al., 2001, Presta et al., 2005), através da indução da produção de uPA (ativador de plasminogênio tipo uroquinase ou do inglês, *urokinase-type plasminogen activator*) e metaloproteinases (MMPs), os quais contribuem para a degradação da matriz extracelular. O FGF-2 modula a expressão do receptor de uPA na superfície das células endoteliais, permitindo a localização da atividade proteolítica, direcionando as células para o fronte de migração (Presta et al., 2005). Em carcinoma de bexiga de ratos, o FGF-2, em específico o de 24kD, confere propriedades metastáticas ao tumor (Okada-Ban et al., 1999).

Nos frentes de invasão de CXAP minimamente invasivo, ocorre expressão parcial do FGF-2 e seus receptores nos pequenos blocos celulares. Korah et al. (2007), observando a expressão de FGF-2 e laminina na estrutura ductal em variados tecidos de glândula mamária (normal, com hiperplasia benigna, hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo), observaram que a perda da expressão de FGF-2 correspondia a perda da estrutura ductal da glândula mamária. Em células endoteliais a inibição do FGF-2 se dá pela atuação do fator de crescimento transformante beta-1 (TGF β -1) (Allouche, Bikfalvi, 1995, Ramsauer, D'Amore, 2007). Através de um modelo *in vitro* 3D para investigar a atuação do FGF-2, TGF β -1 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na formação de vasos, Ramsauer & D'Amore (2007) observaram que o FGF-2, juntamente com o VEGF, promoveu o aumento da formação de capilares, porém quando o TGF β -1 era adicionado ao meio, o mesmo inibiu a formação tubular.

Os casos de CXAP com componente epitelial e mioepitelial apresentaram a expressão do fator pouco menor que no AP, porém a expressão dos receptores, tanto em núcleo como no citoplasma, foi maior comparado ao AP. E entre os tipos histológicos de CXAP o tipo francamente invasivo epitelial/mioepitelial foi o que apresentou menor expressão de FGFR-2 no citoplasma das células. Em tumores de próstata a queda de expressão de FGFR-2 se dá pelo aumento de produção de FGFR-1 por células malignas, que permite uma interação desequilibrada entre epitélio e estroma (Feng et al., 1997; Grose, Dickson, 2005).

O CXAP com componente mioepitelial apenas foi o que apresentou maior expressão de todos imunomarcadores utilizados, comparado ao AP e outros tipos histológicos de CXAP, sugerindo ser necessário a superexpressão de FGF-2 no citoplasma das células e a superexpressão de FGFR-1 e FGFR-2 no núcleo e citoplasma das células para um fenótipo tumoral de células mioepiteliais malignas, visto que células mioepiteliais benignas apresentaram negatividade a ambos receptores em áreas *in situ* e pouca expressão de FGFR-2 em AP. No desenvolvimento da glândula salivar, ambos receptores são expressos no epitélio branquial, sendo o FGFR-2 responsável pela morfogênese ductal (Steinberg et al., 2005).

Comparando o AP ao CXAP, o FGF-2 é expresso fortemente nos tumores, tanto no núcleo como no citoplasma das células, porém a expressão no núcleo diminui conforme a invasão tumoral. Estudos revelam que células cultivadas em condições de baixa concentração de soro, como em cultura de fibroblastos (Arese et al., 1999) e cultura de hepatocarcinoma (Taverna et al., 2008), o FGF-2 exógeno sofre translocação para o núcleo das células e estimula a mitose celular

(Arese et al., 1999). Sugere-se que o aumento de produção de FGF-2 proveniente das próprias células tumorais, promove um ambiente rico em FGF-2.

É evidente a diferenciação das células mioepiteliais, frente à presença de células tumorais em áreas *in situ*, na sua função supressora de tumor (Barsky, 2003, Barsk, Karlin, 2006, Araújo et al., 2006). Através deste estudo foi possível evidenciar a presença do FGF-2, podendo o mesmo ser um possível promotor deste evento, independente de receptores transmembrana. Porém, apesar de a célula mioepitelial tentar conter o tumor, apresentando aumentada expressão de proteínas supressoras e de FGF-2, ao mesmo tempo as células carcinomatosas se aproveitam do FGF-2 para proliferar-se, através da alta expressão de receptores. Desta forma os receptores de FGF podem ser alvos no tratamento terapêutico destes tumores. Estudos prévios, em tumores de pulmão e próstata, têm sido relatados sobre o sistema de FGF como possível alvo na terapia destes tumores (Kuhn et al., 2004, Gowardhan et al., 2005). Frente a esta evidência o FGF pode ser um promotor da supressão tumoral, através da inibição dos receptores, e promoção das células mioepiteliais benignas/normais.

Ambos receptores são ótimos imunomarcadores para distinguir células epiteliais neoplásicas, podendo também ser adjuvantes no prognóstico dos tumores com componente epitelial apenas, provavelmente sendo em maior quantidade nos de pior prognóstico. Em estudo comparativo do valor prognóstico de tumores de mama e a expressão de FGFR-1, observou-se que indivíduos que apresentaram maior expressão do receptor apresentaram uma sobrevida menor (Blanckaert et al., 1998).

Nosso trabalho permitiu identificar a expressão do FGF e dos seus receptores FGFR-1 e FGFR-2, tanto na glândula salivar normal, como no AP e no

AP residual presente no CXAP e no CXAP em seus variados graus de invasão. Frente ao fato de que o FGF-2 e FGFR-1 estão fortemente expressos no AP, é lícito sugerir que o FGF-2 pode estar relacionado à proliferação do AP via FGFR-1. Além disso, a forte expressão do FGFR-2 no CXAP comparado a sua quase ausência no AP levanta a possibilidade que ele possa estar implicado na malignização do CXAP. Não menos importante, o estudo também permitiu identificar a forte expressão do FGF-2 nas células mioepiteliais benignas ao redor das células malignas nas áreas *in situ*, realçando a visualização das mesmas nestes tumores.

7 CONCLUSÃO

Através dos resultados foi evidenciado que:

- a) os adenomas pleomórficos estudados, assim como os adenomas pleomórficos remanescentes apresentaram forte expressão do FGF-2 e FGFR-1, e baixa expressão de FGFR-2;
- b) no CXAP todos os fatores estudados (FGF-2, FGFR-1 e FGFR-2) foram fortemente expressos;
- c) as células mioepiteliais benignas que circundam áreas *in situ* mostram forte expressão do FGF-2 com ausência dos receptores;
- d) baseado na baixa expressão do FGFR-2 no AP e alta expressão no CXAP, sugere-se que o FGFR-2 pode estar implicado no processo de transformação maligna do AP em CXAP.

REFERÊNCIAS ¹

- Allouche M, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factor-2(FGF-2) in hematopoiesis. *Progress in Growth Factor Research*. 1995;6:35-48.
- Altemani A, Martins MT, Freitas L, Soares F, Araújo NS, Araújo VC. Carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXAP): immunoprofile of the cells involved in carcinomatous progression. *Histopathology*. 2005 June;46(6):635-41.
- Alzheimer C, Werner S. Fibroblast growth factor [texto na internet]. 2005 [citado 2007]. Disponível em: <http://www.landesbioscience.com/>
- Aoki T, Tsukinoki K, Kurabayashi H, Sasaki M, Yasuda M, Ota Y, Watanabe Y, Kaneko A. Hepatocyte growth factor expression correlates with cyclooxygenase-2 pathway in human salivary gland tumors. *Oral Oncol*. 2006 Jan;42(1):50-5.
- Araújo VC, Altemani A, Furuse C, Martins MT, Araújo NS. Immunoprofile of reactive salivary myoepithelial cells in intraductal areas of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Oral Oncol*. 2006;42:1011-16.
- Araujo VC, Carvalho YR, Araújo NS. Actin versus vimentin in myoepithelial cells of salivary gland tumors: a comparative study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:387-91.
- Araújo VC, de Sousa SOM, 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, Araújo NS. STAT3 expression in salivary gland tumours. *Oral Oncol*. 2008 May;44(5):439-45.
- Araújo VC, Martins MT, Leite KRM, Gomez RS, Araújo NS. Immunohistochemical Mdm2 expression in minor salivary gland tumours and its relationship to p53 gene status. *Oral Oncol*. 2000 Jan;36(1):67-9.
- 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, Sousa SOM. Expression of different keratins in salivary gland tumours. *Oral Oncol Eur J Cancer*. 1996;32B(1):14-8.
- Arese M, Chen Y, Florkiewicz RZ, Gualandris A, Shen B, Rifkin DB. Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol Biol Cell*. 1999 May;10(5):1429-44.

¹ De acordo com o Manual de Normalização para Dissertações e Teses do Centro de Pós-Graduação CPO São Leopoldo Mandic, baseado no estilo Vancouver 2007, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus

Baldin V, Roman A, Bosc-Bierne I, Amalric F, Bouche G. Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO J.* 1990;9(5):1511-7.

Barsky SH, Karlin NJ. Myoepithelial Cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005 July;10(3):249-60.

Barsky SH. Myoepithelial mRNA expression profiling reveals a common tumor-suppressor phenotype. *Exp Mol Pathol.* 2003 Apr;74(2):113-22.

Bissel MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nature Reviews* 2001 Oct;1:46-54.

Blanckaert VD, Hebbar M, Louchez MM, Vilain MO, Schelling ME, Peyrat JP. Basic fibroblast growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998 Dec;4(12):2939-47.

Bossard C, Laurell H, Berghe LV, Meunier S, Zanibellato C, Prats H. Translokin an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nat Cell Biol.* 2003 May;5(5):433-9.

Bowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Feb;15(1):97-101.

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 June;81(6):655-64.

Bryant DM, Wylie FG, Stow JL. Regulation of endocytosis, nuclear translocation, and signaling of fibroblast growth factor receptor 1 by E-cadherin. *Mol Biol Cell.* 2005 Jan;16(1):14-23.

Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M, Christofori G. N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol.* 2001 July;3(7):650-7.

Chaffer CL, Dopheide B, Savagner P, Thompson EW, Williams ED. Aberrant fibroblast growth factor receptor signaling in bladder and other cancers. *Differentiation.* 2007 Nov;75(9):831-42.

Chen Y, Li X, Eswarakumar VP, Seger R, Lonai P. Fibroblast growth factor (FGF) signaling through PI 3-kinase and Akt/PTB is require for embryoid body differentiation. *Oncogene.* 2000 Aug;19(33):3750-6.

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

Chua CC, Rahimi N, Forsten-Williams K, Nugent MA. Heparan sulfate proteoglycans function as receptors for fibroblast growth factor-2 activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Circ Res.* 2004 Feb 20;94(3):316-23.

Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques.* 2007 July;43(1 Suppl):25-30.

Delrieu I. The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett.* 2000 Feb 18;468(1):6-10.

Dow JK, deVere White RW. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology*. 2000 June;55(6):800-6.

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Apr;16(2):139-49.

Etges A, Nunes FD, Ribeiro KCB, Araújo VC. Immunohistochemical expression of retinoblastoma pathway proteins in normal salivary glands and in salivary gland tumours. *Oral Oncol*. 2004;40(3):326-31.

Eveson JW, Kusafuka K, Stenman G, Nagao T. Pleomorphic adenoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D eds. *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours*. IARC Press: Lyon 2005; 254-58.

Félix A, Rosa JC, Fonseca I, Cidadão A, Soares J. Laminin and collagen IV in pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol*. 1999 Aug;30(8):964-9.

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.

Feng S, Wang F, Matsubara A, Kan M, McKeenan WL. Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. *Cancer Res*. 1997;57(23):5369-78.

Fernig DG, Chen H, R, Rahmoune H, Descamps S, Boilly B, Hondermarck H. Differential regulation of FGF-1 and -2 mitogenic activity is related to their kinetics of binding to heparan sulfate in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan 27;267(3):770-6.

Florkiewicz RZ, Anchin J, Baird A. The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem*. 1998 Jan;273(1):544-51.

Florkiewicz RZ, Sommer A. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 June;86(11):3978-81.

Foschini MP, Scarpellini F, Gown AM, Eusebi V. Differential expression of myoepithelial markers in salivary, sweat and mammary glands. *Int J Surg Pathol*. 2000;8(1):29-37.

Freitas LLL, Araújo VC, Martins MT, Chone C, Crespo A, Altemani A. Biomarkers analysis in carcinoma ex pleomorphic adenoma at early phase of carcinomatous transformation. *Int J Surg Pathol*. 2005;13(4):337-42.

Furuse C, Souza AOM, Nunes FD, Magalhães MHCG, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *Int J Surg Pathol*. 2005;13(1):57-65.

Gabrilove JL. Angiogenic growth factors: autocrine and paracrine regulation of survival in hematologic malignancies. *Oncology*. 2001;6(5):4-7.

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

Goldstein NS, Hewitt SM, Taylor CR, Yaziji H, Hicks DG, Members of Ad-Hoc Committee On Immunohistochemistry Standardization. Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007 June;15(2):124-33.

Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. Purification of a Growth Factor for Ovarian Cells from Bovine Pituitary Glands. *Proc Nat Acad Sci*. 1974 June;71(6):2295-9.

Gospodarowicz D, Moran JS. Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage cultures of human and murine fibroblasts. *J Cell Biol*. 1975 Aug;66(2):451-7.

Gospodarowicz D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*. 1974 May;249(5453):123-7.

Gospodarowicz D. Purification of a Fibroblast Growth Factor from Bovine Pituitary. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975 April;250(7):2515-20.

Gowardhan B, Douglas DA, Mathers ME, McKie AB, McCrackern SRC, Robson CN, Leung HY. Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. *Br J Cancer*. 2005 Jan;92(2):320-7.

Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Apr;16(2):179-86.

Groth C, Lardelli M. The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1. *Int J Dev Biol*. 2002;46(4):393-400.

Gugliotta P, Sapino A, Macri L, Skalli O, Gabbiani G, Bussolati G. Specific Demonstration of Myoepithelial Cells by Anti-alpha Smooth Muscle Actin Antibody. *J Histochem Cytochem*. 1988 June;36(6):659-63.

Harmer NJ, Chirgadze D, Kim KH, Pellegrini L, Blundell TL. The structural biology of growth factor receptor activation. *Biophys Chem*. 2003;100(1-3):545-53.

Heldin C, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews* 1999 Oct;79(4):1283-316.

Hellquist H, Micahels L. Malignant mixed tumor: a salivary gland tumor showing carcinomatous and sarcomatous features. *Virchows Arch[Pathol Anat]*. 1986;409:93-103.

Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and FGFR gene families. *Trends in genetics* 2004 Nov; 20(11):563-9.

Iwafuchi H, Mori N, Takahashi T, Yatabe Y. Phenotype composition of salivary gland tumors: an implication of principle component analysis to tissue microarray data. *Mod Pathol*. 2004 July;17(7):803-10.

Jaskoll T, Witcher D, Toreno L, Bringas P, Moon AM, Melnic M. FGF8 Dose-dependent regulation of embryonic submandibular salivary gland morphogenesis. *Dev Biol*. 2004 April 15; 268(2): 457-469.

Javerzat S, Auguste P, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med*. 2002 Oct;8(10):483-9.

Kamio N. Coexpression of p53 and c-erbB-2 proteins is associated with histological type, tumor stage, and cell proliferation in salivary gland tumours. *Virchows Arch*. 1996 May;428(2):75-83.

Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Increased expression of cyclooxygenase-2 and Ki-67 are associated with malignant transformation of pleomorphic adenoma. *Auris Nasus Larynx*. 2007 Mar;34(1):79-84.

Ke Y, Fernig DG, Wilkinson MC, Winstanley JHR, Smith JA, Rudland PS et al. The expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in cell lines from normal human mammary gland and a benign mammary lesion. *J Cell Sci*. 1993 Sept;106(Pt 1):135-43.

König A, Menzel T, Lynen S, Wrazel L, Rosén A, Al-Katib A, Raveche E, Gabrilove JL. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia*. 1997 Feb;11(2):258-65.

Korah R, Das K, Lindy ME, Hameed M, Wieder R. Coordinate loss of fibroblast growth factor 2 and laminin 5 expression during neoplastic progression of mammary duct epithelium. *Human Pathol* 2007; 38: 154-60.

Kuhn H, Köpff C, Konrad J, Riedel A, Gessner C, Wirtz H. Influence of basic fibroblast growth factor on the proliferation of non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*. 2004 May;44(2):167-74.

Kusafuka K, Hiraki Y, Shukunami C, Yamaguchi A, Kayano T, Takemura T. Cartilage-specific matrix protein chondromodulin-i is associated with chondroid formation in salivary pleomorphic adenomas. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1465-72.

Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Takemura T. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors (FGFs) and FGF receptor-1 in human normal salivary glands and pleomorphic adenomas. *J Oral Pathol Med*. 1998 Aug;27(7):287-92

Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Takemura T. Immunohistochemical localization of members of the transforming growth factor (TGF)-beta superfamily in normal human salivary glands and pleomorphic adenomas. *J Oral Pathol Med*. 2001 Aug;30(7):413-20.

Lappi DA. Tumor targeting through fibroblast growth factor receptors. *Semin Cancer Biol*. 1995 Oct;6(5):279-88.

Maher PA. Nuclear Translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptors in response to FGF-2. *J Cell Biol* 1996 July;134(2):529-36.

Majno G, Joris I. *Cells, Tissue and Disease. Principles of General Pathology*. Massachusetts: Blackwell Science; 1996.

Martins MT, Altemani A, Freitas L, Araújo VC. Maspin expression in carcinoma ex pleomorphic adenoma. *J Clin Pathol*. 2005;58:1311-14.

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

Melnick M, Jaskoll T. Mouse submandibular gland morphogenesis: a paradigm for embryonic signal processing. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(2):199-215.

Mori M, Naito R, Tsukitani K, Okada Y, Hayashi T, Kato K. Immunohistochemical distribution of human epidermal growth factor in salivary gland tumours. *Virchows Arch A.* 1987;411:499-507.

Myoken Y, Myoken Y, Okamoto , Sato JD, Kan M, McKeenan WL et al. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1) in human malignant salivary gland tumors. *J Oral Pathol.* 1996;178:429-36.

Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Kan M, McKeenan WL et al. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1) in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *J Oral Pathol Med.* 1997 Jan;26(1):17-22.

Nakano K, Watanabe T, Shimizu T, Kawakami T. Immunohistochemical Characteristics of Bone Forming Cells in Pleomorphic Adenoma. *Int J Med Sci.* 2007 Oct 16;4(5):264-6.

Nakazato Y, Ishida Y, Takahashi K, Suzuki K. Immunohistochemical distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and neoplastic salivary glands. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1985;405(3):299-310.

Neri LM, Borgattia P, Capitania S, Martelli AM. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Oct 10;1584(2-3):73-80.

Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion: a current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem.* 2003 May;270(10):2109-19.

Ogawa Y, Kishino M, Atsumi Y, Kimoto M, Fukuda Y, Ishida T, Ijuhin N. Plasmacytoid cells in salivary-gland pleomorphic adenomas: evidence of luminal cell differentiation. *Virchows Arch.* 2003 Nov;443(5):625-34.

Ogawa Y. Immunocytochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. *Progr Histochem Cytochem.* 2003;38(4):343-426.

Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Nov 2;277(3):643-9.

Okada-Ban M, Moens G, Thiery JP, Jouanneau J. Nuclear 24kD fibroblast growth factor (FGF)-2 confers metastatic properties on rat bladder carcinoma cells. *Oncogene.* 1999 Nov 18;18(48):6719-24.

Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000 Mar;32(3):263-7.

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors - Protein family review. *Genome Biol.* 2001;2(3):reviews3005.

- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of fibroblast growth factor family. *The Journal of Biological Chemistry* 1996 June;271(25):15292-7.
- Patel VN, Rebutini IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. *Differentiation*. 2006 Sept;74(7):349-64.
- Pederson T. Growth factors in the nucleolus? *J Cell Biol*. 1998 Oct;143(2):279-81.
- Plotnikov AN, Hubbard SR, Schlessinger J, Mohammadi M. Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell*. 2000 May;101(4):413-24.
- Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M. Structural basis for fgf receptor dimerization and activation. *Cell* 1999 Sep 3; 98: 641–50.
- Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell*. 1999 Sept;98(5):641-50.
- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast Growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Apr;16(2):159-78.
- Radisky D, Hagios C, Bissell MJ. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol*. 2001 Apr;11(2):87-95
- Ramsauer M, D'Amore PA. Contextual role for angiopoietins and TGF β 1 in blood vessel stabilization. *J Cell Sci*. 2007 May;120(Pt 10):1810-7.
- Rasband WS, Image J. U. S. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, USA. 1997-2007. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Reilly JF, Maher PA. Impotin β -mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: Role in cell proliferation. *J Cell Biolo*. 2001 Mar;152(6):1307-12.
- Reilly JF, Mizukoshi E, Maher PA. Ligand dependent and independent internalization and nuclear translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1. *DNA and Cell Biology*. 2004;23(9):538-48.
- Röijer E, Nordkvist A, Ström A, Ryd W, Behrendt M, Bullerdiek J, Mark J, Stenman G. Translocation, deletion/amplification, and expression of HMGIC and MDM2 in carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Am J Pathol*. 2002 Feb;160(2):433-9.
- Rudland PS, Fernig DG, Smith JA. Growth factors and their receptors in neoplastic mammary glands. *Biomed & Pharmacother*. 1995; 49: 389-99.
- Savera AT, Zarbo RJ. Defining the role of myoepithelium in salivary gland neoplasia. *Adv Anat Pathol*. 2004 Mar;11(2):69-85.
- Schmahl J, Raymond CS, Soriano P. PDGF signaling specificity is a mediated through multiple immediate early genes. *Nature Genetics*. 2007 Jan;39(1):52-60.
- Sheng Z, Liang Y, Lin CY, Comai L, Chirico WJ. Direct regulation of rRNA transcription by fibroblast growth factor 2. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(21):9419-26.

Shirasuna K, Watatani K, Sugiyama M, Morioka S, Miyazaki T. Isolation and characterization of different clones including myoepithelial-like variants from a clonal neoplastic epithelial duct cell line of human salivary gland origin. *Cancer Res.* 1986 Mar;46:1418-26.

Simons M, Horowitz A. Syndecan-4-mediated signaling. *Cell Signal.* 2001 Dec;13(12):855-62.

Sleeman M, Fraser J, MacDonald M, Yuan S, White D, Grandison P, Kumble K, Watson JD, Murison JG. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene.* 2001 June;271(2):171-82.

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.

Steinberg Z, Myers C, Heim VM, Lathrop CA, Rebutini IT, Stewart JS, Larsen M, Hoffman MP. FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development.* 2005 Mar;132(6):1223-34.

Sumitomo S, Okamoto Y, Mizutani G, Kudaken W, Mori M, Takai Y. Immunohistochemical study of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and fibroblast growth factor receptor (FGF-R) in experimental squamous cell carcinoma of rat submandibular gland. *Oral Oncol.* 1999 Jan;35(1):98-104.

Swelam W, Ida-Yonemochi H, Maruyama S, Ohshiro K, Cheng J, Saku T. Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. *Virchows Arch.* 2005 June;446(6):653-62.

Takai Y, Dardick I, Mackay A, Burford-Mason A, Mori M. Diagnostic criteria for neoplastic myoepithelial cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas: Immunocytochemical detection of muscle-specific actin, cytokeratin 14, vimentin, and glial fibrillary acidic protein. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79:330-41.

Takeuchi J, Sobue M, Yoshida M, Esak T, Katoh Y. Pleomorphic adenoma of the salivary gland with special reference to histochemical and electron microscopic studies and biochemical analysis of glycosaminoglycans in vivo and in vitro. *Cancer.* 1975 Nov;36(5):1771-89.

Taverna S, Gherzi G, Ginestra A, Rigogliuso S, Pecorella S, Alaimo G, Saladino F, Dolo V, Dell'Era P, Pavan A, Pizzolanti G, Mignatti P, Presta M, Vittorelli ML. Shedding of membrane vesicles mediates fibroblast growth factor-2 release from cells. *J Biol Chem.* 2003 Dec;278(51):51911-9.

Taverna S, Rigogliuso S, Salamone M, Vittorelli ML. Intracellular trafficking of endogenous fibroblast growth factor-2. *FEBS J.* 2008 Apr;275(7):1579-92.

Tlsty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol.* 2001 Apr;11(2):97-104.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 July;2(7):489-501.

Volm M, Koomägi R, Mattern J, Stammier G. Prognostic value of basic fibroblast growth factor and its receptor (FGFR-1) in patients with non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer*. 1997 Apr;33(4):691-3.

Voz ML, Agten NS, van de Ven WJM, Kas K. *PLAG1*, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Research* 2000 Jan;60:106-13.

Wakulich C, Jackson-Boeters L, Daley TD, Wysocki GP. Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 May;93(5):573-9.

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

Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM, Morrison RS. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jan;91(2):484-8.

Yamanishi DT, Graham MJ, Florkiewicz RZ, Buckmeier JA, Meyskens Junior FL. Differences in basic fibroblast growth factor rna and protein levels in human primary melanocytes and metastatic melanoma cells. *Cancer Res*. 1992 Sept;52(18):5024-9.

Yang F, Strand DW, Rowley DR. Fibroblast growth factor-2 mediates transforming growth factor-b action in prostate cancer reactive stroma. *Oncogene* 2007; 1-10.

Yeoh JSG, Haan G. Fibroblast growth factors as regulators of stem cell self-renewal and aging. *Mech Ageing Dev*. 2007 Jan;128(1):17-24.

Yu Z, Biro S, Fu Y, Sanchez J, Smale G, Sasse J, Ferrans VJ, Casscells W. Localization of basic fibroblast growth factor in bovine endothelial cells: immunohistochemical and biochemical studies. *Exp Cell Res*. 1993 Feb;204(2):247-59.

Yura Y, Yoshioka Y, Yamamoto S, Kusaka J, Bando T, Yoshida H et al. Enhancing effects of fibroblast growth factor on the proliferation of salivary gland carcinoma cells and salivary gland carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2001 Mar;30(3):159-67.

Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med*. 1998;49:407-24.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO CEP



SÃO LEOPOLDO MANDIC
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Aprovado pelo CEP

Campinas, 24 de setembro de 2007.

A

C.D. Lucyene Miguita

Curso: Mestrado em Patologia

Prezado (a) Aluno (a):

O projeto de sua autoria: "ESTUDO DO FATOR DE CRESCIMENTO FGF E SEU RECEPTOR NO ADENOMA PLEOMÓRFICO E CARCINOMA EX-ADENOMA PLEOMÓRFICO".

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

Entregue na Secretaria de Pós-Graduação do CPO - São Leopoldo Mandic, no dia 01/06/2007, com número de protocolo nº. **07/124** foi APROVADO pelo Comitê de Ética e Pesquisa, instituído nesta Universidade de acordo com a resolução 196 / 1.996 do CNS – Ministério da Saúde, em reunião realizada no dia 24/09/2007.

Cordialmente

Prof. Dr. Thomaz Wassall
Coordenador de Pós-Graduação