



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO



Carcinoma Adenóide Cístico de Glândula Salivar:
Estudo Clinicopatológico e da Expressão de
Metalotioneína

MARCO TÚLLIO BRAZÃO SILVA

Uberaba-MG
Novembro/2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MARCO TÚLLIO BRAZÃO SILVA

***Carcinoma Adenóide Cístico de Glândula Salivar:
Estudo Clinicopatológico e da Expressão de
Metalotioneína***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, área de concentração Patologia Geral, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

**Uberaba-MG
Novembro/2010**

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S579c Silva, Marco Túlio Brazão
Carcinoma adenóide cístico de glândula salivar: estudo clínico-patológico
e da expressão de metalotioneína / Marco Túlio Brazão Silva. -- 2010.
113 f. : tab. ; graf. ; fig.

Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2010.
Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola.

1. Carcinoma adenóide cístico. 2. Metástase neoplásica. 3.
Metalotioneína. I. Título. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III.
Loyola, Adriano Mota.

CDU 616.31-006

Dedicatória

Dedico o meu trabalho de mestrado,

A Deus, refúgio e fortaleza...

... Aos meus pais, Marizete Caldeira Brazão da Silva e João Batista da Silva Junior, pela maneira que me educaram, mostrando-me as virtudes da humildade, respeito e persistência... Ao meu irmão Marllos Leandro Brazão Silva pelo companheirismo...

... À minha avó Estelita e aos meus familiares que estiveram do meu lado, sempre me confortando com incentivos e admiração...

... À amorosa Anne, que foi minha companheira em todos os momentos, fundamental apoio na busca do sonho da docência...

... aos professores Adriano Mota Loyola e Sérgio Vitorino Cardoso.

Agradecimientos

Agradeço a Deus, que a todo o momento me dá forças e abre minhas portas... meu verdadeiro orientador.

À minha mãe, que com muita luta investiu nos meus estudos e com muito carinho e dificuldade manteve a casa sempre em ordem... compreende minha busca por este título tão respeitoso... Obrigado mãe! Eu te amo! Tenho muito orgulho de você! Estou aprendendo sua maneira de amar sem esperar nada em troca... Está aí mãe, este trabalho é fruto da educação que a senhora me deu. Ensinou-me a confiar em Deus e não desistir dos meus sonhos! O seu esforço com a nossa família é um exemplo.

Ao meu irmão Marlos... como não agradecer-lhe, você também me ensinou muito na vida... espero poder retribuí-lo no que precisar!

Ao meu pai... sei que me mantém em todas suas orações... agradeço-lhe por nunca negar um pedido! Tenho certeza que o senhor também sente muita vontade de ficar mais próximo. Tenho muito orgulho de você.

À Anne, que tornou estes momentos muito mais agradáveis... Esta vitória também é sua meu amor! Obrigado por me incentivar em cada instante. Obrigado por agendar muitos dos seus trabalhos em Uberaba, o que me proporcionou sua maravilhosa companhia e muitas vezes foram primordiais para viabilizar minha presença na UFTM. Agradeço também à minha sogra Fátima Helena, ao cunhado Marlon e à Joana, que nos recebem com tanto carinho no Rio de Janeiro aos finais de ano. “Uma recarga de bateria!”

A toda minha família, especialmente à vovó Estelita, que é uma mulher que vive para amar ao próximo. Como é bom ir aos domingos à sua casa vovó! Eu também me empenho para te alegrar! Também agradeço à tia Maria (*in memorian*), Helena, Alexandre, Almir, Ana Lúcia, José Joaquim... todos meus primos. Do tio Júlio, não me esqueci, porque ele é muito especial. Me espelho muito em sua pessoa. Um verdadeiro companheiro. Todas às vezes recebe a mim e aos meus colegas para nos ajudar na confecção de nossos painéis científicos. Inclusive este trabalho, é também fruto da nossa amada Copiadora Brazão (Obrigado ao funcionário e amigo Ney). Não posso me esquecer de agradecer minha cachorrinha Bibi. Que ser abençoado! Ama, perdoa, acompanha e se alegra. Enfim, a toda minha família, não me esquecendo da Vilma, uma segunda mãe.

Aos amigos de laboratório Lara, Thais, Marília e Talita, que compartilharam trabalhos de grande seriedade e momentos de cafezinho e conversas agradáveis.. Lembro-me de como foram agradáveis os congressos da JOME e da SOBE. Agradeço especialmente ao Sérgio Sargenti, companheiro nos momentos mais difíceis de nossa pós-graduação. Aos colegas da Pós-Graduação da UFTM, Laura, Frederico, Humberto, que também participaram desta jornada. À nossa fiel companheira, a técnica Ângela, sempre amiga e cuidadosa com nossos trabalhos. À Kellen, que também foi muito importante no início de minha carreira com suas orientações. Ao prof. Paulo Rogério de Faria que compartilhou seu profissionalismo e amizade durante todo o tempo.

Aos colegas da Patologia da Medicina da UFU, Alencar, Sérgio, Lúcia, Kivio, Sandra, Frederico, Rafael, João e ao sempre alegre Marcão. Obrigado pelo companheirismo.

Agradeço aos professores Arnaldo, Tânia e Holétia, que me emprestaram seus microscópios para estudo e captura de imagens, e que foram sempre receptivos.

Ao prof. Adriano Mota Loyola pelas oportunidades de trabalho (trabalho intenso!) e por acreditar no meu potencial. Seus conselhos até hoje me fazem amadurecer como homem, como professor e como pessoa. Você é um exemplo de esforço e dedicação. Tenho muito orgulho de ter-lo como orientador. Quanta sabedoria! Agradeço também todo o carinho da sua família, Cibele, Felipe e Lila.

Ao Prof. Sérgio Vitorino Cardoso. Obrigado por proporcionar os desafios na medida certa pra que eu buscasse o melhor de mim. Você se preocupou com cada etapa da minha formação profissional. Tenho em você um referencial de profissionalismo e ética. Agora, tenho muito orgulho de defender este trabalho, do qual você teve fundamental participação. Obrigado... meu amigo! Registro minha grande estima por sua pessoa.

Ao INCA por abrir as portas às nossas pesquisas, especialmente à Profa. Ana Lúcia Amaral Eisenberg, ao prof. Fernando Luís Dias e ao pessoal do arquivo médico (Sr. Ildalio, Eleonor...).

Aos professores da Pós-Graduação em Patologia Geral da UFTM pelos conhecimentos compartilhados, em especial à Prof. Maria das Graças à Prof. Virgínia Crema. Registro também meu agradecimento pelos técnicos da microscopia eletrônica João e José. Uma dupla camarada.

A CAPES, por me conceder a bolsa de estudos.

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram e participaram positivamente desta jornada!

*... "Se o senhor não construir a casa,
é inútil o cansaço dos pedreiros" ... (Salmo 126, 1)*

*" Quem caminha nas trevas não sabe para onde está
indo. Enquanto vocês têm a luz, acreditem na luz, para
que vocês se tornem filhos da luz. Depois de dizer isto,
Jesus foi embora. " (João 12, 35-36)*

Sumário

Lista de figuras.....	8
Lista de tabelas.....	9
Lista de abreviaturas e símbolos	10
Resumo	11
<i>Abstract</i>	12
1. Introdução	14
2. Revisão de Literatura.....	16
2.1 Carcinoma Adenóide Cístico.....	16
2.1.1 Características histopatológicas	18
2.1.2 Metástases	20
2.1.3 Tratamento	21
2.2 Metalotioneína.....	23
2.3 Fisiopatologia da MT	26
2.3.1 Mecanismo Antioxidante / Resistência Celular.....	27
2.3.2 Proliferação Celular	28
2.3.3 Apoptose	30
2.3.4 Angiogenese.....	31
2.4 Expressão da MT em Neoplasias	32
2.4.1 Expressão da MT em Tumores de Glândula Mamária	34
2.4.2 Expressão de MT em Glândulas Salivares e seus tumores	36
3. Objetivo Geral.....	40
3.1 Objetivos específicos.....	40
4. Hipótese	42
5. Metodologia	44
5.1 Amostra	44
5.2 Imunohistoquímica.....	45
5.3 Análise Microscópica da Imunomarcção.....	46
2.3.1 Avaliação qualitativa	46
2.3.2 Avaliação semiquantitativa	46

5.3.3 Análise dos dados e análise estatística.....	50
6. Resultados.....	54
6.1 Características Clínico-Patológicas e Dados de Seguimento.....	54
6.1.1 Avaliação e análise dos dados Clínico-patológicos.....	58
6.1.2 Avaliação e análise dos dados Clínico-patológicos <i>versus</i> metástases.....	60
6.2 MT <i>versus</i> dados Clínico-patológicos.....	61
6.2.1 Análise qualitativa da expressão de MT.....	61
6.2.2 Análise semiquantitativa da expressão de MT.....	61
6.3 Expressão de MT <i>versus</i> Comportamento Metastático.....	65
6.3.1 Comportamento metastático precoce.....	67
7. Discussão.....	72
7.2 Dados Clínico-patológicos.....	72
7.2 Imunomarcção da MT.....	81
8. Conclusão.....	91
9. Referências.....	93
10. Anexos.....	103

Lista de figuras

Figura 1. Modelo ilustrativo dos padrões de expressão da MT nos casos de CAC segundo os códigos utilizados para avaliação semiquantitativa dos casos.	49
Figura 2. Distribuição dos casos de CAC segundo glândulas salivares acometidas.....	55
Figura 3. Curvas de sobrevida segundo comportamento metastático dos CAC.	57
Figura 4. Padrão de CAC predominantemente tubular e expressão da MT.	62
Figura 5. Padrão de CAC predominantemente cribriforme e expressão da MT.....	63
Figura 6. Padrão de CAC predominantemente sólido.e expressão da MT.....	64
Figura 7. Visão geral dos escores distribuídos segundo o subtipo histológico do CAC. Valores mais altos são observados em tumores sólidos.	65
Figura 8. Visão geral da distribuição da MT segundo o comportamento metastático (PM e PNM).....	66
Figura 9. Distribuição dos valores entre os grupos PM e PNM segundo o <i>Quickscore</i> dos tumores.....	67
Figura 10. Visão geral dos escores, convertidos em porcentagem, e distribuídos segundo a cronologia do comportamento metastático (PNM x PMp x PMt).	68
Figura 11. Curva de sobrevida considerando a média de Escore Geral dos tumores PMp como cut-off (p=0,0349).....	70

Lista de tabelas

Tabela 1. Características bioquímicas da MT (adaptado de Nordberg et al 1998).....	24
Tabela 2. Expressão de MT nos diversos tecidos normais em humanos e nos tumores deles derivados.....	33
Tabela 3. Principais dados Clínico-patológicos dos 49 casos de CAC provenientes do INCA (1997-2004).....	55
Tabela 4. Valores de p para as comparações entre os diferentes tipos de dados Clínico-patológicos estudados.	59
Tabela 5. Avaliação e análise dos dados clinico-patológicos com o comportamento metastático.....	60
Tabela 6. Variações da expressão de MT segundo comportamento metastático. Método semiquantitativo.....	66
Tabela 7. Diferenças clinico-patológicas e de expressão da MT segundo a cronologia do comportamento metastático (PMp x PMt).	69

Lista de abreviaturas e símbolos

ApoMT – Forma de Metalotioneína livre de átomos metálicos, imatura.

CAC – Carcinoma Adenóide Cístico

MT – Metalotioneína

OMS – Organização Mundial de Saúde

Cd – Cádmio

Zn – Zinco

aa – Aminoácidos

MT-1 – Isoforma proteína da Metalotioneína 1

MT-2 – Isoforma proteína da Metalotioneína 2

MT-3 – Isoforma proteína da Metalotioneína 3 ou para o gene regulador desta isoforma

MT-4 – Isoforma proteína da Metalotioneína 4 ou para o gene regulador desta isoforma

MT-1-A, -B, -E, -F, -G, -H, -X, -1C, -D, -I, -J, -K e -L – Genes reguladores de MT-1

MT-2A – Gene regulador da MT-2

cAMP – AMP cíclico

MRE – Receptor da MT induzível por metais

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

O₂⁻ – Superóxidos

NO – Óxido nítrico

PM – Primário Metastático

PNM – Primário Não Metastático

PMp – Primário Metastático precoce

PMt – Primário Metastático tardio

Resumo

O carcinoma adenóide cístico (CAC) representa o tumor maligno mais comum de glândulas salivares, sendo dotado de elevado potencial metastático, mesmo muitos anos após o tratamento. A Metalotioneína (MT) é uma proteína rica em cisteína que está superexpressa em tumores metastáticos de mama, esôfago, intestino, Carcinoma Epidermóide bucal, dentre outros. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os dados clinicopatológicos e a expressão da MT nos casos de CAC diagnosticados no Instituto Nacional de Câncer no período 1996-2004, considerando o evento metástase para agrupamento dos casos. Foi obtido um total de 49 casos, 14 primários metastáticos (PM) e 35 primários não metastáticos (PNM). Dentro do grupo PM, havia nove casos de comportamento metastático precoce (PMp) e cinco casos de comportamento metastático tardio (PMt), descobertos durante o *follow-up*. Para a interpretação da expressão da MT, foram estabelecidos seis escores semiquantitativos, avaliados para cada caso a partir da seleção de 10 campos num aumento de 4000 x, a saber: A) compartimento celular de expressão (1, citoplasmática; 2, nuclear; 3, nuclear e citoplasmática); B) intensidade de marcação (1, fraca; 2, moderada; 3, forte); C) proporção de células positivas (1, 1-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4, 76-100%); D) proporção de núcleos positivos em relação ao total de células marcadas (1, 0-25%; 2, 26-75%; 3, >75%); E) média de todos os escores; F) *Quickscore* (Detre *et al.*, 1995). Foi observado que a presente amostra representa características epidemiológicas já descritas para o CAC. Com relação ao comportamento metastático, houve um predomínio de tumores maiores no grupo PM ($p = 0,048$), com frequente acometimento de glândulas salivares maiores ($p = 0,024$) e predomínio de padrão histológico sólido ($p = 0,096$). Quanto à expressão da MT, foram observadas médias semelhantes dentre os grupos PM e PNM, porém todos os escores baixos pertenceram ao grupo PNM, enquanto os maiores ao grupo PM. Diferença estatisticamente significativa entre PM e PNM foi observada apenas pelo *Quickscore* ($p = 0,044$). Observou-se ainda, que todos os escores mais elevados de PM, referiram-se a casos PMp, enquanto valores baixos estiveram restritos a PMt. A sobrevida foi significativamente reduzida para PM ($p = 0,001$), sendo que os óbitos deste grupo, concentraram-se nos tumores PMp (90%). Os presentes achados permitem concluir que a MT pode ser um marcador promissor de prognóstico para o CAC, possivelmente por associação com o comportamento metastático do CAC, principalmente quando considerado o comportamento metastático precoce, imediato e agressivo.

Abstract

The Adenoid Cystic Carcinoma (ACC) represents the most common malignant salivary gland tumor. It has high metastatic potential, even after many years of follow-up. The Metallothionein (MT) is a cysteine rich protein overexpressed in several tumors, including mammary, oesophageal, intestinal and oral squamous cell carcinoma. The objective of this work was to evaluate the clinico-pathologic data and the expression profile of MT among ACC diagnosed at INCA (1996-2004), considering the metastatic event to group all of the cases. There were 49 cases: 14 primary metastatic (PM) and 35 non-metastatic (PNM). Inside PM, there were 9 precociously metastatic and 5 lately metastatic. To evaluate MT expression, six parameters were created: A) Cell compartment of expression (1, cytoplasm; 2, nuclear; 3, nuclear and cytoplasm); B) Intensity of stain (1, weak; 2, moderate; 3, Strong); C) proportion of positivity (1, 1-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4, 76-100%); D) proportion nuclear positivity among stained cells (1, 0-25%; 2, 26-75%; 3, >75%); E) General mean of scores; F) *Quickscore* (Detre *et al.*, 1995). It was observed in our sample the same epidemiological characteristics found among the already published series of ACC. Regarding metastatic event, there was a predomination of larger tumors among PM ($p = 0,048$), often involving major salivary glands ($p = 0,024$) and arranged in solid pattern ($p = 0,096$). With regard to MT expression, it was observed similar scores among PM and PNM, although all higher scores were found among PM and all lower scores were found among PNM. Statistically significant difference was only obtained using the *Quickscore* ($p = 0,044$). All higher scores from PM were seen among precociously metastatic tumors. Inversely, the lower scores were seen among lately metastatic PM tumors. The survival rate was shorter for PM ($p = 0,001$), and the majority of dead cases was seen among precociously metastatic tumors (90%). The present findings allow concluding MT as a promissory marker of prognosis, specially associated with metastasis, and mainly for precociously metastasis.

Introdução

1. Introdução

1 O carcinoma adenóide cístico (CAC) tem sido relatado como o tumor maligno
2 mais comum de glândulas salivares por diversos estudos epidemiológicos, algumas
3 vezes sendo apenas menos frequente que o Carcinoma Mucoepidermóide. Trata-se de
4 um tumor agressivo e recidivante que possui alto potencial metastático, mesmo após
5 muitos anos de acompanhamento. Fatores como a idade, estágio clínico, subtipo
6 histológico, e acometimento metastático, são fatores utilizados na determinação do
7 prognóstico do mesmo. Não obstante, ainda persistem dificuldades quanto à utilização
8 destes marcadores, tendo em vista os resultados variáveis quanto a sua eficácia na
9 predição do comportamento biológico tumoral. Neste sentido, maior atenção tem sido
10 dada na busca de marcadores moleculares que possam suprir estas lacunas, procurando
11 favorecer de uma forma mais precisa a determinação do prognóstico.

12 A Metalotioneína (MT) é uma proteína rica em cisteína associada à
13 neutralização intracelular de compostos tóxicos, em especial a metais pesados e radicais
14 livres, e, principalmente, ao controle da disponibilidade e distribuição intracelular de
15 zinco. Tais características tornam possível sua atuação numa série de processos
16 celulares, incluindo o funcionamento de enzimas e hormônios envolvidos na
17 multiplicação e desenvolvimento celular. Diversos trabalhos associam sua
18 superexpressão a um comportamento mais agressivo de células tumorais. Existe
19 evidência de que a MT possa estar associada à perda da diferenciação tumoral do CAC.
20 Desta forma, o presente trabalho aprofunda estas observações, procurando investigar o
21 valor discriminador da expressão da MT em casos de CAC de comportamento biológico
22 distinto.

24 **2. Revisão de Literatura**

2.1 Carcinoma Adenóide Cístico

25 O carcinoma adenóide cístico (CAC) foi inicialmente descrito por Billroth em 1856
26 com o termo cilindroma. Atualmente, o termo cilindroma designa um tumor de anexos
27 cutâneos que tem apresentação clínica e prognóstico marcadamente diferentes do visto
28 para CAC (NEVILLE *et al.*, 2004). Autores como Conley e Dingman (1974) já descreviam
29 o CAC como um dos tumores mais imprevisíveis e biologicamente destrutivos de cabeça e
30 pescoço (CONLEY e DINGMAN, 1974). No entanto, durante um longo período, seu
31 potencial de malignidade foi subestimado devido àquele aspecto histológico aparentemente
32 indolente e ao sucesso em curto prazo dos tratamentos (KOKEMUELLER *et al.*, 2004).
33 Trata-se de um tumor basaloide, constituído por grupos de células que, em termos gerais,
34 ora apresentam fenótipo epitelial ora apresentam fenótipo mioepitelial. Os padrões
35 morfológicos são variados, incluindo tipo tubular, cribriforme e sólido. A doença
36 geralmente progride ao longo dos anos com um potencial metastático tardio e um curso
37 clínico após os 10 anos que quase sempre culmina em óbito (BARNES *et al.*, 2005).

38 O CAC situa-se entre os quatro tumores malignos mais comuns de glândulas
39 salivares, compreendendo cerca de 1% de todos os tumores malignos da região oral e
40 maxilofacial, e cerca de 22% de todos os tumores malignos das glândulas salivares maiores
41 e menores (KOKEMUELLER *et al.*, 2004; ENEROTH, 1971; SPIRO, 1986; ITO *et al.*,
42 2005; TIAN *et al.*, 2010). Acomete com maior frequência glândulas salivares menores, não
43 havendo discordância quanto à maior prevalência de envolvimento de glândulas menores
44 palatinas (LOYOLA *et al.*, 1995; BUCHNER *et al.*, 2007; KO *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*,
45 2006). Não há o mesmo consenso com relação ao seu acometimento em glândulas maiores,

46 havendo relatos de maior incidência em parótida (KHAN *et al.*, 2001), outros de maior
47 incidência em submandibular (EVESON e CAWSON, 1985; KO *et al.*, 2007), e, ainda,
48 aqueles mostrando incidência igual entre as glândulas (BOUKHERIS *et al.*, 2009).

49 O CAC mostra predileção por pacientes na quinta e sexta décadas de vida
50 (BUCHNER *et al.*, 2007; LOYOLA *et al.*, 1995), sendo a predileção entre os gêneros
51 controversa (BUCHNER *et al.*, 2007; KO *et al.*, 2007; BOUKHERIS *et al.*, 2009;
52 KOKEMUELLER *et al.*, 2004; PEREZ *et al.*, 2006). Queixas de dor e desconforto não são
53 incomuns, sendo muitas vezes atribuídas ao comportamento invasivo do tumor. As células
54 tendem a invadir e disseminar periféricamente aos fascículos nervosos. Os tumores tendem
55 a crescer lentamente, mimetizando comportamento clínico indolente, o que pode acabar
56 gerando longos períodos prévios aos procedimentos visando o diagnóstico (ELLIS *et al.*,
57 1991; COHEN *et al.*, 2004).

58 Metástases tardias e recorrências locais são freqüentes. Alguns estudos demonstram
59 que essa lesão tem um potencial para desenvolver metástases à distância desde as fases
60 precoces do desenvolvimento tumoral (WAHLBERG *et al.*, 2002; KOKEMUELLER *et al.*
61 2004; GARDEN *et al.*, 1995). Segundo Guzzo *et al* (2010), as metástases direcionam-se
62 preferencialmente para pulmões (80%), ossos (15%), fígado e outros sítios (5%), podendo
63 surgir até mesmo depois de 20 anos após a ressecção do tumor primário, o que representa a
64 principal causa de falhas no tratamento (GUZZO *et al.*, 2010).

65 A sobrevida em cinco anos para o CAC é relativamente alta, porém cai
66 consideravelmente após 10 a 20 anos. Em uma série de tumores submandibulares, a
67 sobrevida global foi de 76,4% aos três anos, caindo de 70% para 37% após cinco e dez
68 anos, respectivamente (COHEN *et al.*, 2004). Outros autores mostraram queda de 20% na
69 sobrevida comparando o período de 5 anos com o de 10 anos (PEREZ *et al.*, 2006).

2.1.1 Características histopatológicas

70 O CAC caracteriza-se histologicamente pela proliferação de células neoplásicas em
71 dois fenótipos. As de fenótipo ductal (epitelial) são morfologicamente cuboidais ou
72 colunares, apresentando moderada quantia de citoplasma eosinofílico, núcleo arredondado
73 vesicular, e nucléolo pequeno ou indistinto. Adicionalmente, participam também
74 quantidades variáveis de células cancerosas de fenótipo mioepitelial, morfologicamente
75 menores, de núcleo hiper cromático e angulado ou poligonal (BARNES *et al.* 2005;
76 CHHIENG e PAULINO, 2002; SHIBUYA *et al.*, 1999; PRASAD *et al.*, 2007). As células
77 podem se arranjar em três padrões distintos de organização: tubular, cribriforme e sólido.
78 Entretanto, os três subtipos podem coexistir no mesmo tumor. Neste caso, o diagnóstico do
79 tumor é dado pela predominância de um dos subtipos (BARNES *et al.*, 2005).

80 O padrão tubular é o mais encontrado dentre os subtipos. É considerado o padrão
81 histológico em melhor estado de diferenciação, pois o arranjo das células simula aquele
82 visto no tecidual normal, onde células de fenótipo ductal formam a camada luminal
83 (interna) e células de fenótipo mioepitelial formam a camada abluminal (externa) (KO *et*
84 *al.*, 2007).

85 A variante cribriforme é constituída por ilhotas ou verdadeiros lençóis tumorais que
86 apresentam formações pseudocísticas em seu interior, frequentemente delineadas por
87 células achatadas de fenótipo mioepitelial, e preenchidos por matriz basofílica mucóide,
88 que é composta por fibras colágenas, elastina e glicosaminoglicanas de origem tumoral.
89 (FREITAS *et al.*, 2004; SHIBUYA *et al.*, 1999). Estruturas ductais preservadas podem ser
90 vistas no interior das ilhotas.

91 O padrão sólido é caracterizado pela formação de massas celulares agregadas,
92 formando ilhotas e lençóis tumorais sem a formação tubular ou pseudocística. Apesar

93 disto, algumas vezes ainda é possível o reconhecimento de formações ductais permeando a
94 massa celular sólida, que podem inclusive mimetizar pseudocistos quando estão dilatadas.
95 Neste padrão, as células neoplásicas parecem perder a polaridade, adquirindo formato
96 irregular e estreito, sendo aderidas umas às outras através de superfícies lisas ou através de
97 numerosos processos citoplasmáticos finos. Existem alguns desmossomos, porém
98 dispostos de forma irregular (DARDICK, 1996; BARNES *et al.*, 2005; SHIBUYA *et al.*,
99 1999). Este subtipo está frequentemente relacionado a um prognóstico pior quando
100 comparado com tubulares e cribriformes (KO *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2006;
101 KOKEMUELLER *et al.*, 2004). Neste sentido, alguns autores acreditam que os tumores
102 podem ser classificados em sólidos e “não-sólidos” (tubulares e cribriformes) quando do
103 estabelecimento do prognóstico (FORDICE *et al.*, 1999).

104 A invasão perineural é um achado histológico comum, sendo considerada uma
105 possível via de disseminação das células tumorais (BARRETT e SPEIGHT, 2009; KO *et*
106 *al.*, 2007). Entretanto, o seu valor prognóstico tem sido questionado (GARDEN *et al.*,
107 1995; BARRETT e SPEIGHT, 2009; KO *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2006). De acordo
108 com a revisão de BARRETT e SPEIGHT (2009), o envolvimento perineural acontece em
109 22% a 46% dos CAC, sendo este em nível macro ou microscópico.

2.1.2 Metástases

110 Há um consenso geral de que o sítio metastático mais comum seja o pulmão,
111 embora cérebro, ossos, fígado e rins também possam ser acometidos (KO *et al.*, 2007;
112 PEREZ *et al.*, 2006; SPIRO, 1997). FORDICE *et al.* (1999) afirmam que o curso da
113 doença é usualmente fulminante quando as metástases ocorrem nos ossos, especialmente
114 na coluna vertebral. SUNG *et al.* (2003) compartilham esta teoria ao observar que os
115 pacientes com envolvimento ósseo com ou sem metástase pulmonar tiveram um
116 prognóstico pior do que aqueles com metástases restritas ao pulmão. As metástases ósseas
117 podem ser encontradas em vértebras, costelas e ossos pélvicos (SUNG *et al.*, 2003).

118 De acordo com a OMS, a incidência de metástase regional varia de 5% a 25%, e a
119 de metástase à distância de 25 a 55% (BARNES *et al.*, 2005). Embora os casos possam
120 apresentar uma sobrevida global de 12,8 anos, esta contagem de tempo decai para 4,9 anos
121 após o descobrimento de metástase (KHAN *et al.*, 2001; KO *et al.*, 2007). O tempo de
122 descoberta das metástases gira em torno de 30 meses após a intervenção inicial, podendo
123 ser evidenciadas dentre 1 a 109 meses após a terapia inicial (COHEN *et al.*, 2004; KO *et*
124 *al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2006). Finalmente, como já mencionado, as metástases podem
125 surgir até 20 anos após o tratamento da doença primária (KOKEMUELLER *et al.*, 2004).

126 O tamanho da lesão pode influenciar o comportamento metastático. Até 67% dos
127 casos de tamanho tumoral avançado¹ (T3 e T4) desenvolvem metástases, enquanto que nos
128 casos de doença inicial (T1 e T2) as metástases acontecem em 31% (COHEN *et al.*, 2004).
129 Neste sentido, um cut-off de 3cm para o tamanho clínico tumoral também pode ser
130 utilizado, determinando que tumores acima deste valor possuam risco significativamente
131 maior de desprendimento metastático (SPIRO, 1997; KO *et al.*, 2007). Outros dados como

¹ Vide classificação TNM dos tumores de glândulas salivares em ANEXOS.

132 gênero, sexo e local de origem ou duração de sintomas não parecem predispor à metástase
133 (SPIRO, 1997).

134 Considerando aspectos histológicos, é digna de nota a identificação do subtipo
135 histológico predominante na predição do comportamento metastático, sendo que as
136 variantes sólidas têm maior propensão para emissão de metástases (SPIRO, 1997). Uma
137 maior incidência de invasão perineural também pode relacionar-se a este comportamento
138 (COHEN *et al.*, 2004; KO *et al.* 2007), porém este padrão não é reproduzido em muitas
139 outras séries (SUNG *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2001; TERHAARD *et al.*, 2004).

2.1.3 Tratamento

140 A maioria dos autores concorda que o CAC é radiosensível e não radiocurável,
141 sendo atualmente a ressecção cirúrgica seguida por radioterapia o tratamento de escolha,
142 principalmente em casos com invasão perineural, margens cirúrgicas positivas, tumores T2
143 ou maiores, e metástases regionais (COHEN *et al.*, 2004; GARDEN *et.*, 1995). A
144 quimioterapia também pode ser usada contiguamente com a radioterapia, o que se
145 denomina quimio-radioterapia, onde a cisplatina (100 mg/m²) é administrada por via
146 endovenosa durante as três semanas de radioterapia (KO *et al.*, 2007). O valor da
147 quimioterapia adjuvante após a cirurgia ainda não foi sistematicamente explorado
148 (ALEXANDER, 1996)

149 Embora a radioterapia pós-operatória minore os índices de recidiva, o risco de
150 morte não foi reduzido em muitos estudos, principalmente pelo fato de que muitos
151 pacientes já apresentam metástases ocultas desde etapas iniciais, e que permanecerão sem
152 tratamento até que esta metástase encontre uma condição ecológica favorável para atingir

153 significância clínica (COHEN *et al.*, 2004; SUR *et al.*, 1997). A raridade de metástases
154 para os linfonodos levou a crer que a dissecação radical dos nódulos linfáticos é
155 desnecessária. Apesar disto, sabe-se que o prognóstico para os casos com metástase
156 regional é significativamente menor (KO *et al.*, 2007). Finalmente, o aparecimento de
157 metástases é imprevisível, podendo desenvolver-se mesmo sobre as melhores condições
158 disponíveis de controle local e regional da doença, o que implica na realização de exames
159 periódicos por toda a vida do paciente (KOKEMUELLER *et al.*, 2004; SPIRO, 1997).

2.2 Metalotioneína

160 A história científica da Metalotioneína (MT) iniciou-se há mais de 50 anos, quando
161 em forma de resumo, um estudo utilizando órgãos humanos revelou a presença de cádmio
162 (Cd) em tecidos e fluidos corporais. Os estudos tentavam explicar se o Cd estaria ligado a
163 uma macromolécula e assim possuiria uma função fisiológica, ou se aquilo representava
164 uma intoxicação (NORDBERG, 1998). Mais adiante, MARGOSHES (1957) descreveu em
165 maiores detalhes que a presença de Cd nos tecidos renais equinos se dava de forma
166 conjugada a uma proteína (MARGOSHES e VALLEE, 1957). Entretanto, apenas em 1960
167 esta proteína ligante de Cd foi novamente isolada por KAGI e VALLEE a partir de cinco
168 tecidos renais equinos, sendo designada pela primeira vez por *Metalotioneína*. Tal
169 nomenclatura deu-se devido ao seu conteúdo extremamente alto de enxofre (4.1% g⁻¹ de
170 peso seco), Cd (2,9%) e Zn (0,6%) (NORDBERG, 1998). O conjunto de enxofre e metais
171 colabora para 20% do peso molecular da proteína que é de 6-7 KDa (NORDBERG e
172 NORDBERG, 2009).

173 A MT também possui composição peculiar de aminoácidos, não contendo
174 usualmente aminoácidos aromáticos e não apresentando, ou possuindo apenas um,
175 aminoácido de histidina (THIRUMOORTHY *et al.*, 2007; THEOCHARIS *et al.*, 2004).
176 Além disso, possui alto conteúdo de cisteína (20 dos 61-68 aminoácidos de sua
177 composição), e ausência de ligações dissulfeto, sendo considerada termoestável
178 (NORDBERG & NORDBERG, 2009) (Tabela 1). Assim, etimologicamente, o prefixo
179 “*metalo*” retrata a afinidade da proteína por ligações metálicas e o radical “tio” a sua
180 riqueza em grupamentos tiol (também designados grupos mercaptano ou grupos sulfidril),
181 que são estruturas constituídas por hidrogênio e enxofre (-SH).

182

Tabela 1. Características bioquímicas da MT (adaptado de Nordberg *et al* 1998).

-
1. Peso molecular 6000-7000, 61-68 aminoácidos;
 2. aa: 20 cisteínas (30%), N-acetilmetionina, C-alanina, sem aromáticos, sem histidina;
 3. sequência única de aa;
 4. Conteúdo metálico: Cd, Zn, Cu, Hg;
 5. Absorção a 250nm (Cd), 225nm (Zn), 275nm (Cu), 300 nm (Hg);
 6. Síntese induzida por Cd e Zn;
 7. Sem ligações dissulfito
 8. Estabilidade térmica
 9. Localização citoplasmática
 10. Existência de quatro isoformas: MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4
-

183 As MTs são codificadas em humanos pela família dos genes localizados no braço
 184 longo do cromossomo 16q13, determinando diferentes isoformas. Todos os organismos
 185 mamíferos expressam pelo menos os tipos MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4. A MT-1 possui
 186 como genes funcionais o MT-1-A, -B, -E, -F, -G, -H, e -X, enquanto os genes MT-1C, -D,
 187 I, -J, -K e -L são considerados não-funcionais. Para as outras isoformas, tem-se apenas um
 188 gene, a saber: MT-2A, MT-3 e MT-4, que codificam as isoformas MT-2, MT-3, e MT-4,
 189 respectivamente (THEOCHARIS *et al.*, 2004; CHERIAN *et al.*, 2003). A heterogeneidade
 190 das isoformas resulta de uma acetilação pós-transcricional e/ou variações na composição
 191 metálica (COYLE *et al.*, 2002).

192 Embora as propriedades físico-químicas sejam semelhantes, existem algumas
 193 especializações de suas funções biológicas. A MT-3 é encontrada principalmente no
 194 hipocampo, amígdala e córtex (HOEY *et al.*, 1997). Seu gene tem sido identificado em
 195 neurônios ricos em Zn e em astrócitos, tornando-se superexpresso após injúria cerebral,

196 como já demonstrado em doenças degenerativas como doença de Alzheimer (MASTERS
197 *et al.*, 1994; KELLY *et al.*, 1994; HOZUMI *et al.*, 1996). A MT-4 ainda é pouco conhecida
198 e parece também exercer papel diferente de MT-1 e -2 nas funções celulares. Sua presença
199 foi descrita em epitélio estratificado da mucosa bucal, principalmente restrita às camadas
200 mais superficiais do epitélio, ao contrário das isoformas MT-1 e MT-2, expressas apenas
201 nas camadas basal e parabasal (QUAIFE *et al.*, 1994). As MTs são ubíquas, porém apenas
202 MT-1 e MT-2 são altamente induzíveis, sendo que os eventos que induzem MT-1 e MT-2
203 geralmente não se refletem na indução de MT-3 e MT-4 (HAQ *et al.*, 2003).

204 Até a presente data, as isoformas MT-1 e MT-2 são as mais bem estudadas e
205 caracterizadas. São as que se encontram mais amplamente distribuídas pelos diferentes
206 sistemas orgânicos, além de serem as mais responsivas aos estímulos indutores de sua
207 expressão. Está naturalmente presente em maior quantidade nos tecidos sadios tais como
208 fígado, rins, pulmões, células epiteliais do timo, eritrócitos, e em muitas células
209 pancreáticas exócrinas e endócrinas. Diferem-se apenas pela presença de uma carga
210 negativa, sendo que a MT-1 e a MT-2 possuem 61 e 62 aminoácidos, respectivamente
211 (MILES *et al.*, 2000; SIMPKINS *et al.*, 1998; COYLE *et al.*, 2002; HAQ *et al.*, 2003).²

²O presente trabalho utiliza números indo-arábicos ao invés de romanos quando cita as isoformas da MT, pois esta forma é mais aceita e está de acordo com a designação oficial da base de dados da SwissProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/P02795>), MCBI (Medical Center for Biotechnology Information), e da base de dados da Human Genome Organization.

2.3 Fisiopatologia da MT

212 Fisiologicamente, os níveis celulares de MT são baixos e aumentam em resposta à
213 presença de metais pesados, estresse, hormônios (glucagon, glicocorticóides), bem como
214 cAMP, interleucinas 1 e 6, interferon, e fator de necrose tumoral (DAVIS e COUSINS,
215 2000). Os receptores metalinduzidos (MRE) são os principais responsáveis pela iniciação
216 da transcrição da MT, porém, o mecanismo como um todo é complexo, sendo que diversos
217 fatores não vinculados aos MREs podem estar envolvidos em conjunto ou isoladamente.
218 Assim, diversas formas de estresse, sendo ele trauma físico ou até mesmo infecção
219 microbiana também podem induzir MT, pois ainda existem elementos responsivos a
220 agentes oxidantes como H₂O₂, elementos responsivos a glicocorticóides e elementos
221 ativados por STAT (Transdutores de sinal e ativadores de transcrição) na região promotora
222 da MT (DAVIS e COUSINS, 2000).

223 Vários estudos já demonstraram a participação das MTs no transporte, estoque e
224 distribuição do zinco, sendo consideradas proteínas responsáveis pelo sequestro do
225 mineral, quando o mesmo está presente em níveis elevados, protegendo a célula contra a
226 toxicidade (DUFNER-BEATTIE *et al.*, 2003; TOM *et al.*, 2003). O Zn é um componente
227 de várias proteínas e está envolvido em muitos aspectos do metabolismo, sendo parte
228 integral de aproximadamente 300 enzimas em diferentes espécies de todos os filós,
229 indispensáveis a suas funções, as quais envolve o início e a síntese e/ou a degradação da
230 maioria dos metabólitos. O Zn estabiliza a estrutura de proteínas e ácidos nucleicos,
231 preserva a integridade de organelas celulares, participa em processos de transporte, e
232 desempenha um importante papel em fenômenos imunológicos (FRASSINETTI *et al.*,
233 2006).

234 Em suma, os estudos mostram evidências do papel da MT em muitos processos
235 fisiopatológicos, incluindo homeostasia e desintoxicação de metais, proteção ao dano
236 oxidativo, resistência a drogas utilizadas no tratamento oncológico e radioterapia,
237 proliferação celular e apoptose, e muitos outros aspectos envolvidos no processo
238 carcinogênico.

2.3.1 Mecanismo Antioxidante / Resistência Celular

239 Devido ao seu conteúdo rico em cisteína, A MT pode funcionar como um potente
240 inativador contra radicais livres derivados do oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio
241 (H_2O_2), superóxidos (O_2^-), óxido nítrico (NO) e os radicais de hidroxila (OH), protegendo
242 as macromoléculas celulares destes compostos altamente reativos que são constantemente
243 gerados *in vivo* por vários processos metabólicos. Uma das características que permitem a
244 MT desempenhar função efetiva contra os radicais livres, é a sua estrutura de dois
245 domínios, que permite ligações metálicas rápidas e eficientes, tornando a MT superior às
246 outras proteínas “scavengers”³ (NGU, EASTON, e STILLMAN, 2008).

247 O controle sobre a distribuição e armazenamento de Zn também confere à MT um
248 papel antioxidante, visto que o Zn por si só possui esta função. Por outro lado, está bem
249 estabelecido que o Cd e outros metais pesados induzem danos oxidativos pela produção de
250 radicais livres e ainda causando prejuízos na atividade de outras enzimas antioxidantes
251 como a superóxido desmutase, catalase e glutathione peroxidase, as quais têm importante
252 papel antioxidante. Assim, a MT ao agir como quelante destes metais também favorece
253 indiretamente na proteção contra os radicais livres (BREMNER, 1998).

³ Do inglês, significa proteínas que agem na “limpeza”, no caso, dos radicais livres.

254 Como a MT protege as células dos radicais livres, sua expressão tem sido associada
255 ao insucesso de tratamentos oncooterápicos. O papel da MT na resistência à cisplatina é
256 frequentemente visto para tumores de ovário, onde pacientes com aumento de MT-1/2
257 anteriormente à iniciação da quimioterapia mostraram resposta inadequada ao tratamento,
258 associada a altas taxas de mortalidade (SUROWIAK *et al.*, 2005). Adicionalmente, o
259 aumento da expressão de MT em tumores de bexiga, esôfago, fígado e língua também
260 resultaram em aumento da resistência à cisplatina (THEOCHARIS *et al.*, 2004). As
261 células expostas à cisplatina mostram tipicamente uma expressão nuclear ao invés de
262 citoplasmática, sugerindo a participação da MT na proteção do DNA (THEOCHARIS *et*
263 *al.*, 2004; KONDO *et al.*, 1997).

2.3.2 Proliferação Celular

264 Tem sido proposto que altos níveis de MT podem estar presentes em tecidos que
265 estejam em rápido crescimento e desenvolvimento, possivelmente para fornecer Zn^{++} e
266 Cu^{++} para o metabolismo de ácidos nucleicos, síntese de proteínas, e outros processos
267 (DAVIS e COUSINS, 2000; NORDBERG, 1998; NORDBERG e NORDHERG, 2009;
268 RICHARDS, 1989; VASCONCELOS *et al.*, 2002). Estudos recentes indicam que a
269 expressão de MT pode ativar várias metaloenzimas e fatores de transcrição requeridos para
270 regeneração celular e reparo tecidual, como por exemplo: aconitase, aldolase, fosfatase
271 alcalina, anidrase carbônica, colagenase, sorbitol desidrogenase, termolisina, receptores de
272 estrógeno, Gal4, Sp1, TFIIIA (POSEWITZ e WILCOX, 1995; MARET *et al.*, 1999;
273 JIANG *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2004; CHERIAN e KANG, 2006). Em linha com estes
274 achados, comprovou-se que a MT estimula a progressão do ciclo celular (MIYASHITA &
275 SATO, 2005) e ativa ciclina D (CHERIAN e KANG, 2006). Adicionalmente, a MT pode

276 estimular expressão de citocinas anti-inflamatórias, fatores de crescimento, neutrofinas e
277 seus receptores, incluindo IL-10, FGF, receptor de FGF, TGF- β , receptor de TGF- β ,
278 VEGF, NGF, NT-3-5, fator neurotrófico cerebral (BDNF), e fator neurotrófico derivado de
279 células gliais (GDNF) (PENKOWA, 2006). A microinjeção de apoMT (MT livre de
280 metais, é o estágio inicial da proteína) em células hepáticas vivas mostrou que a MT é
281 capaz de remover o Zn das proteínas com dedos de Zn ligadas ao DNA, de Sp1, do fator de
282 transcrição IIIA e da proteína p53 (ZENG *et al.*, 1991). Estes dados sugerem que uma
283 superexpressão persistente de apo-MT pode promover crescimento acelerado e
284 sobrevivência celular (JASANI e SCHMID, 1997).

285 Suporta as hipóteses da MT como promotora de proliferação, o fato de que terapia
286 com oligonucleotídeos específicos contra o gene da MT causa paralisação do crescimento
287 celular e induz apoptose em células ductais de carcinoma mamário (ABDEL-MAGEED e
288 AGRAWAL, 1997). Seu papel na promoção de crescimento e multiplicação celular é
289 frequentemente acompanhado por sua translocação intracelular do citoplasma para o
290 núcleo, fato que tem sido observado em tecidos com alta atividade proliferativa, como já
291 demonstrado em várias linhagens tumorais (CHERIAN E APOSTOLOVA, 2000;
292 DUTSCH-WICHEREK *et al.*, 2008). Considera-se que a MT seja uma proteína
293 citoplasmática em tecidos adultos ou células em repouso (G0), enquanto sua localização
294 nuclear é detectada em células no período fetal/neo-natal (CHAN e CHERIAN, 1993;
295 CHERIAN *et al.*, 2003). Durante a fase G0 e a fase G1, detecta-se a MT situada
296 principalmente no citoplasma, enquanto durante a fase S e a G2, sua expressão nuclear
297 torna-se evidente (MILES *et al.*, 2000; COYLE *et al.*, 2002; SATO e KONKOH, 2002;
298 THEOCHARIS *et al.*, 2004; CHERIAN e KANG, 2006). Ao final de G2 e início de M, a
299 MT tende a retornar ao compartimento citoplasmático (COYLE *et al.*, 2002; SATO e
300 KONKOH, 2002).

2.3.3 Apoptose

301 Muitos estudos apontam o papel da MT como reguladora de apoptose por meio de
302 interação com a p53 (SHIMODA *et al.*, 2003; MEPLAN *et al.*, 2000; BUTLER E LOH,
303 2003; RAINWATER, 1995; CARDOSO *et al.*, 2009). A proteína p53 é uma proteína
304 nuclear que desencadeia estímulo apoptótico a partir de ativação de p21. Em diferentes
305 tipos de tumores, a proteína p53 tem sido identificada com níveis elevados, todavia
306 mutada. Desta forma, não participa da regulação funcional por meio de sua atividade pró-
307 apoptótica (ALSAFADI *et al.*, 2009; ADHIKARI e IWAKUMA, 2009).

308 Estudos *in vitro* mostraram que a MT pode modular a conformação da p53 por sua
309 atividade quelante de zinco, propiciada graças aos seus radicais tiol (MEPLAN *et al.*,
310 2000). A p53 possui um domínio ligante de DNA que é estabilizado por um íon de Zn, o
311 qual é necessário para uma configuração funcional ativa da p53 nativa. A MT neste caso
312 age quelando o Zn da p53, o que leva ao rompimento da arquitetura no domínio ligante de
313 DNA da p53, induzindo à adoção de um fenótipo imunológico idêntico àquele de muitas
314 formas mutadas da p53 (BUTLER E LOH, 2003; RAINWATER, 1995). Células tumorais
315 desprovidas do gene da MT são significativamente mais sensíveis ao estímulo apoptótico,
316 possuindo uma quantia três a quatro vezes maior de p53 funcional do que as células *in*
317 *natura* (KONDO *et al.*, 1997). Em imunohistoquímica, uma localização
318 predominantemente citoplasmática de MT está associada a baixo índice de marcação para
319 p53, enquanto uma marcação nuclear restrita de MT esteve associada a casos positivos
320 para p53 (CARDOSO *et al.*, 2009). Este achado sugere que a MT apenas exerce este papel
321 quando translocada para o núcleo.

322 A MT também tem sido implicada na modulação da apoptose através da inibição de
323 outras proteínas pró-apoptóticas como a caspase 1 e caspase 3, bem como inibindo o

324 escape do citocromo c da mitocôndria (PEDERSEN *et al.*, 2009; MILES *et al.*, 2000;
325 PENKOWA, 2006). Uma redução significativa da ativação de caspase 3, inibição de
326 escape do citocromo c e clivagem do DNA é observado em camundongos transgênicos
327 com superexpressão de MT-1 em comparação aos selvagens (CAI *et al.*, 2006). Estudos
328 têm demonstrado ainda que a inibição de MT-2 resulta em uma queda dose-dependente de
329 Bcl-2 e c-myc, seguindo-se para um aumento na taxa de apoptose em carcinomas de
330 próstata e ovário (TEKUR e HO, 2002; THEOCHARIS *et al.*, 2004).

2.3.4 Angiogenese

331 A presença de vasos sanguíneos é fundamental para o suprimento celular tanto em
332 tecidos normais como em tecidos tumorais (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007). O aumento de
333 MT tem sido implicado no aumento da síntese *de novo* e expressão aumentada de
334 numerosos fatores de crescimento implicados no processo angiogênico, incluindo FGF,
335 TGF β , e VEGF (NIELSEN *et al.*, 2007; PENKOWA, 2006). A relação entre o aumento de
336 MT e a progressão tumoral por meio da angiogênese é suportada pelo estudo de
337 MIYASHITA e SATO (2005), os quais mostraram que a MT-1 está expressa em células
338 endoteliais na mesma região em que ocorre a angiogênese *in vivo*, e que a desregulação de
339 MT-1 na célula endotelial inibe a proliferação, migração, e formação de rede *in vitro*, bem
340 como a angiogênese *in vivo*. A desregulação da MT-1 também causa paralisação do ciclo
341 celular em fase G1 nas células endoteliais (MIYASHITA e SATO, 2005).

2.4 Expressão da MT em Neoplasias

342 O padrão de marcação da MT nos diversos tumores humanos dependerá da origem
343 tecidual, do tipo tumoral, do tipo histológico, da heterogeneidade morfológica, do padrão
344 de diferenciação e ainda podendo ser influenciada pelo estágio de crescimento. A **Tabela 2**
345 representa uma visão geral da relevância da MT enquanto marcadora de prognóstico em
346 tumores de órgãos compostos por tecidos com origem embrionária e funções diversas.
347 Uma atenção especial será dada aos tumores das glândulas mamárias no presente estudo,
348 pois possuem constituição e função semelhante às das glândulas salivares, considerando
349 também a escassez de estudos sobre a expressão da MT em glândulas salivares e
350 neoplasias delas derivadas.

351

Tabela 2. Expressão de MT nos diversos tecidos normais em humanos e nos tumores deles derivados.

Origem	Expressão da MT	Associação com prognóstico	Referências
<i>Glândulas Salivares</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumentada ● Células mioepiteliais e basais 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pior grau histológico; apoptose 	(ALVES <i>et al.</i> , 2007; SUNARDHI-WIDYAPUTRA <i>et al.</i> , 1995)
<i>Mama</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumentada ● Células mioepiteliais e basais 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pior grau histológico e nuclear; estágio clínico avançado, proliferação celular, carcinogênese, metástase linfonodal, pior prognóstico 	(YAP <i>et al.</i> , 2009; JIN <i>et al.</i> , 2001)
<i>Mucosa oral</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumentada ● Camada basal e parabasal 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Alta proliferação celular, pior sobrevida e metástase linfonodal 	(CARDOSO <i>et al.</i> , 2009; LEE <i>et al.</i> , 2008)
<i>Esôfago</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumentada ● Topografia não mencionada nos trabalhos 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pior estágio clínico, metástase regional e à distância, pior sobrevida, resistência à cisplatina 	(HISHIKAWA <i>et al.</i> , 1999; DUTSCH-WICHEREK <i>et al.</i> , 2008)
<i>Estômago</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Controversa ● células epiteliais do antro e corpo de forma difusa, e em regiões das fossetas ou foveas gástricas 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Importante na carcinogênese, proliferação celular, estágio clínico avançado, 	(JANSSEN <i>et al.</i> , 2000; MITANI <i>et al.</i> , 2008)
<i>Mucosa Intestinal/ colorretal</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Controversa ● Enterócitos 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Alto grau histológico, pior sobrevida, metástase regional e à distância 	(JANSSEN <i>et al.</i> , 2000; LI <i>et al.</i> , 2005)
<i>Nasofaringe/ Laringe</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumentada ● camada basal e nos centros germinativos associados 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Proliferação celular, carcinogênese, estágio clínico avançado 	(JAYASURYA <i>et al.</i> , 2000)
<i>Tireóide</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Diminuída ● Apenas nas células foliculares normais 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Carcinogênese 	(FERRARIO <i>et al.</i> , 2008; SCHMID <i>et al.</i> , 2008)
<i>Testículos</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Depende do tipo tumoral ● Topografia não mencionada nos trabalhos 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Seminomas marcam apenas nas regiões de proliferação celular, não-seminomas marcam intensamente, principalmente nos avançados 	(KONTOZOGLU <i>et al.</i> , 1989; CHIN <i>et al.</i> , 1993)
<i>Próstata</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Diminuída ● Células epiteliais glandulares; intensa na zona periférica, moderada na zona transicional e fraca na zona central 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Relação inversa com o grau de Gleason, homeostasia do Zn 	(MOUSSA <i>et al.</i> , 1997; WEI <i>et al.</i> , 2008)
<i>Fígado</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Diminuída ● variados núcleos e mais frequente citoplasma apenas dos hepatócito 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Relação inversa com aumento do grau histológico e o estágio tumoral, tamanho tumoral, relação direta com resistência à quimioterapia 	(TAO <i>et al.</i> , 2007; DATTA <i>et al.</i> , 2007)
<i>Rins</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Diminuída ● Túbulos proximais 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumenta com o grau histológico 	(MIDIDODDI <i>et al.</i> , 1996; NGUYEN <i>et al.</i> , 2000)
<i>Bexiga</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumentada ● Usualmente não apresenta níveis detectáveis de MT 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Correlação com aumento do grau histológico e estágio clínico, pior prognóstico 	(SOMJI <i>et al.</i> , 2001; IOACHIM <i>et al.</i> , 2001)
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Expressão da MT nos tumores em relação ao tecido normal de origem ● Expressão e topografia da MT nos tecidos normais correspondentes 		○

2.4.1 Expressão da MT em Tumores de Glândula Mamária

354 A expressão de MT por imunohistoquímica em carcinomas de mama tem sido
355 muito bem documentada. Sua expressão tem sido observada em células mioepiteliais
356 normais, fato que motivou a discussão sobre a utilização da mesma como marcador
357 mioepitelial, visto que ductos e ácinos normais são usualmente negativos para MT
358 (FRESNO *et al.*, 1993; BIER *et al.*, 1994; YAP *et al.*, 2009). Diferentes estudos têm
359 demonstrando uma associação entre a superexpressão de MT e pior prognóstico (BAY *et*
360 *al.* 2006; JIN *et al.*, 2004; JIN, *et al.*, 2002; GOMULKIEWICZ *et al.* 2010; ZHANG *et al.*
361 2000; HAERSLEV *et al.*, 1995).

362 O fato da maior expressão da MT estar relacionado com tumores menos
363 diferenciados e de maior gradação de malignidade é quase unânime na literatura
364 relacionada aos tumores mamários (FRESNO *et al.* 1993; HAERSLEV *et al.* 1995; EL
365 SHARKAWY e FARRAG 2008; IOACHIM *et al.*, 1999; JIN *et al.*, 2001; YAP *et al.*, 2009).
366 Também tem sido evidenciada sua maior expressão nas regiões de pleomorfismo nuclear
367 acentuado, bem como nas de intensa atividade mitótica (HAERSLEV *et al.*, 1995;
368 ZHANG *et al.*, 2000; FRESNO *et al.* 1993). Nestes casos, observou-se coincidência de
369 marcação para MT e Ki-67, um potente marcador da proliferação celular (OYAMA *et al.*,
370 1996). Estes resultados permitem concluir que a MT é um marcador de prognóstico
371 promissor para os tumores mamários, dada a sua associação com menor diferenciação
372 tumoral e com alta atividade proliferativa celular.

373 A expressão da MT pode ser nuclear, citoplasmática ou nuclear-citoplasmática
374 (FRESNO *et al.*, 1993). Em geral, as marcações intratumorais tendem a ser mais intensas
375 junto ao componente tumoral invasivo (SCHMID *et al.*, 1993). Esta marcação também se
376 destaca de forma nítida nas regiões intratumorais de carcinoma *in situ* (IOACHIM *et al.*,

377 1999; GALLICCHIO *et al.* 2005). Outros autores também demonstraram uma
378 superexpressão em casos recidivantes e metastáticos, revelando ainda, que as metástases
379 apresentam índices aumentados de expressão em relação ao tumor primário (SCHMID *et*
380 *al.* 1993; HAERSLEV *et al.* 1994, 1995). Neste sentido, a MT tem sido implicada no
381 desenvolvimento metastático.

382 Um estudo de expressão gênica funcional utilizando PCR em tempo real numa
383 amostra de 79 carcinomas mamários congelados demonstrou atividade para MT-1A, MT-
384 1E, MT-1F, MT-1G, MT-1H, MT-1X e MT-3. Entretanto, o RNA mensageiro do gene
385 MT-1B não foi detectado, fato que merece melhor investigação. O MT-2A parece ser o
386 gene mais ativo nestes tumores, correlacionando-se com a proliferação celular e o grau
387 histológico avançado (JIN *et al.*, 2002). O mesmo achado foi relatado para o gene MT-1F
388 em outro estudo (JIN *et al.*, 2001). Alguns estudos mostraram ainda, que existe uma alta
389 expressão de MT-1E nos casos negativos para o receptor de estrógeno (RE) (JIN *et al.*
390 2000; TAI *et al.*, 2003). Considerando que o RE tem sua importância consolidada na
391 avaliação do prognóstico para neoplasias de mama, esta associação também reflete que a
392 avaliação da expressão de MT-1E pode ser promissora como marcador de prognóstico (EL
393 SHARKAWY e FARRAG, 2008). Utilizando imunohistoquímica, também está
394 amplamente demonstrado que altos índices de marcação para MT correlacionam-se com
395 menor marcação de receptor de estrógeno e perda de diferenciação celular (IOACHIM *et*
396 *al.* 1999; FRESNO *et al.* 1993; OYAMA *et al.* 1996; EL SHARKAWY e FARRAG,
397 2008).

398 BIER e colaboradores (1994) avaliaram uma variedade de casos de lesões benignas,
399 pré-invasivas, e lesões malignas. Nos papilomas mamários e em tecidos normais a MT
400 marcou apenas células mioepiteliais. Já nas epitelioses, ambas as células luminiais e as

401 mioepiteliais expressaram MT. Nas hiperplasias lobulares atípicas e no carcinoma lobular
402 *in situ* a MT esteve fortemente expressa. Os autores demonstraram ainda que os
403 componentes *in situ* dos carcinomas ductais invasivos, refletiram o status de MT da sua
404 contraparte maligna. Desta forma, sugeriu-se que MT fosse importante nos eventos da
405 carcinogênese (BIER *et al.*, 1994).

406 Por fim, foi demonstrado que a desregulação da MT com oligonucleotídeos
407 *antisense* induz paralisação de proliferação e apoptose nas células cancerígenas mamárias
408 que superexpressam MT (ABDEL-MAGEED e AGRAWAL, 1997; YAP *et al.*, 2009).
409 Estes dados sugerem que a MT pode ser um alvo terapêutico para o tratamento das
410 neoplasias mamárias.

2.4.2 Expressão de MT em Glândulas Salivares e seus tumores

411 As glândulas salivares normais, assim como já discutido para mama, somente
412 expressam naturalmente MT nas células mioepiteliais e nas células basais dos ductos
413 excretores (SUNARDHI-WIDYAPUTRA *et al.*, 1995; MURAMATSU *et al.*, 2000). Um
414 trabalho inicial avaliou a marcação de MT em tumores benignos e no Carcinoma
415 Mucoepidermóide (SUNARDHI-WIDYAPUTRA *et al.*, 1995). Nos Adenomas
416 Pleomórficos e no tumor de Warthin, uma marcação na camada externa das estruturas
417 ductais foi encontrada. No Adenoma Pleomórfico, a MT também destacou algumas células
418 embebidas em estroma mixóide e em estroma condróide. Já no Tumor de Warthin,
419 algumas células ductais marcaram fracamente em conjunto com componentes linfóides. Os
420 autores mencionam alta marcação de MT somente nos Mioepiteliomas. Certa positividade
421 foi também observada em células cuboidais que margeavam ilhotas oncocíticas dos
422 oncocitomas e células que margeavam grupos de células tumorais do Carcinoma

423 Mucoepidermóide. Tais resultados estão de acordo com outros, que demonstram que as
424 células mioepiteliais expressam MT (SUNARDHI-WIDYAPUTRA *et al.*, 1995). Um
425 estudo publicado em literatura chinesa relatou esta maior expressão de MT nos
426 Mioepiteliomas e em carcinomas mioepiteliais (GAO *et al.*, 1997). Outros autores também
427 relataram a presença de MT nas células mioepiteliais de adenomas pleomórficos, porém
428 ressaltam a maior expressão desta em casos de CAC (CHAUVIN *et al.*, 1992).

429 ALVES e colaboradores (2007) avaliaram a expressão da MT em CAC,
430 demonstrando ausência de casos com índice de positividade inferior a 40%. Os autores
431 observaram ausência de expressão nas estruturas ductais e alta frequência de marcação nas
432 células abluminais. Para os subtipos cribriformes, as células que margeavam pseudocistos
433 e aquelas localizadas na periferia das ilhotas tumorais marcaram com maior frequência.
434 Para os casos sólidos, os autores destacam a ocorrência do mais alto índice de marcação
435 dentro da amostra, sendo ela em padrão de mosaico e mais frequentemente citoplasmática
436 (ALVES *et al.*, 2007). Desta forma, sugere-se que a MT tenha papel importante na
437 progressão neoplásica, visto que os tumores sólidos são mais agressivos e estão
438 relacionados a um pior prognóstico (KO *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2006;
439 KOKEMUELLER *et al.*, 2004; FORDICE *et al.*, 1999).

440 IRIE e colaboradores estudaram a expressão de MT-3 nas glândulas salivares,
441 demonstrando um padrão de marcação completamente diferente daquele visto para MT-1 e
442 MT-2, onde as células ductais são intensamente marcadas e as células acinares em
443 intensidade mais fraca (IRIE *et al.*, 2004). Os autores também avaliaram o NGF (Fator de
444 crescimento dos neurônios), mostrando muitas vezes uma co-localização deste com MT-3,
445 o que implica concluir que a MT-3 pode coordenar o crescimento e diferenciação das
446 glândulas salivares, pois esta função é exercida pela mesma nos tecidos cerebrais (Irie *et*

447 *al.*, 2004). Novos estudos devem considerar a avaliação de MT-3 para os tumores de
448 glândulas salivares.

Objetivos

3. Objetivo Geral

449 Considerando a carência de dados sobre o comportamento metastático do CAC e os
450 indícios literários que favorecem a MT como uma marcadora de agressividade tumoral, o
451 presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a expressão da MT nos seus
452 diferentes aspectos imunohistoquímicos em uma amostra de CAC, considerando dois
453 grupos de comportamentos biológicos distintos: tumores primários metastáticos (PM) e
454 tumores primários não metastáticos (PNM).

3.1 Objetivos específicos

- 455 • Investigar os dados Clínico-patológicos e de seguimento de uma amostra de 49
456 casos de CAC;
- 457 • Avaliar a expressão da MT qualitativa e semiquantitativamente na amostra de 49
458 casos de CAC,
- 459 • Analisar a associação da expressão de MT com comportamentos biológicos
460 metastáticos distintos e com o prognóstico da doença;
- 461 • Verificar diferenças na expressão de MT nos tumores segundo as diferentes
462 características clínicas estudadas e os subtipos histológicos dos tumores;

Hipótese

4. Hipótese

463 O CAC é considerado uma neoplasia de glândula salivar com padrão de
464 agressividade que o identifica como uma neoplasia de alto grau de malignidade. Não
465 obstante, possui comportamento heterogêneo, mostrando diferentes progressões clínicas,
466 especialmente em relação ao comportamento metastático. Vários fatores clinicopatológicos
467 têm sido apontados como potenciais discriminadores de comportamento biológico,
468 incluindo capacidade metastática, e de prognóstico. Todavia, a literatura ainda carece de
469 um parâmetro que, unanimemente, considere definitiva a possibilidade de separar lesões de
470 comportamento e prognóstico distintos.

471 A MT tem se mostrado viável como marcadora de prognóstico em diversos
472 tumores, notadamente os de glândulas mamárias, muito semelhantes estruturalmente com
473 os de glândulas salivares. Ademais, sua expressão tem se mostrado diferente dentre os
474 diferentes graus histológicos de CAC de glândulas salivares, mostrando uma aparente
475 relação entre a maior expressão e o menor grau de diferenciação tumoral. Desta forma, o
476 aprofundamento desta avaliação qualitativa com instrumentos que nos permitam estimar
477 semiquantitativamente o padrão de expressão tumoral predominante, poderia nos
478 possibilitar a distinção entre casos metastáticos e não metastáticos, e, ainda, determinar
479 aqueles casos metastáticos mais agressivos, correlacionando-se também com casos de pior
480 sobrevida.

5. Metodologia

481 5.1 Amostra

482 As amostras de tumores de glândulas salivares utilizadas no trabalho foram
483 provenientes de biópsias ou ressecções cirúrgicas realizadas no período entre 1997 e 2004,
484 de pacientes atendidos no Instituto Nacional de Câncer (INCA). Todos os casos
485 encontrados foram primeiramente revistos objetivando definir o diagnóstico de Carcinoma
486 Adenóide Cístico segundo a última classificação da Organização Mundial de Saúde
487 (Barnes et al, 2005), a partir de cortes histológicos de fragmentos teciduais fixados em
488 formalina a 10% e incluídos em parafina.

489 Para caracterização sociodemográfica e clinicopatológica da amostra, dados
490 pertinentes foram levantados a partir de registros de prontuários médicos. Foram coletados
491 dados referentes à idade, gênero, cor da pele, exposição ao fumo e álcool, localização do
492 tumor primário, sintomatologia, extensão, e tempo de sintomas, existência de metástases
493 regionais ou distantes e suas respectivas localizações, estadiamento das lesões (UICC,
494 1997), tratamento, e dados de seguimento. Os dados de sobrevida foram retirados dos
495 prontuários a partir dos registros da última consulta do paciente no INCA, sendo
496 considerada como data limite, a data da última revisão, ocorrida em março de 2010. Para
497 todos os casos foi permitido um período de seguimento mínimo de cinco anos.

498 Os casos que não apresentaram registros satisfatórios sobre os dados referidos, que
499 mostravam limitação de material histológico para confirmação do diagnóstico e que foram
500 previamente tratados em outra Instituição foram excluídos do estudo.

501 Adicionalmente, os tumores foram ainda revistos e classificados histologicamente
502 segundo o padrão histológico predominante (tubular, cribriforme ou sólido) (Barnes *et al.*,

2005). Procedimento similar foi também utilizado para o estabelecimento da gradação histológica de malignidade (Greiner *et AL.*, 1989). Assim, tumores grau I: tumores não apresentando nenhum componente sólido; Grau II: tumores nos quais predominavam arranjos tubulares ou cribriformes, podendo mostrar até 30% de áreas sólidas; e Grau III: tumores contendo mais de 30% de componente sólido. Para todos os tumores avaliados, foram registrados dados sobre a presença de invasão neural e comprometimento marginal. A invasão neural foi considerada positiva quando da identificação de ilhotas neoplásicas invadindo os filetes neurais ou circunscrevendo-os. Para a definição de comprometimento marginal, foram considerados positivos aqueles casos em que ilhotas neoplásicas foram identificadas faceando a margem do tecido examinado.

5.2 Imunohistoquímica

Ensaio imunohistoquímico foram realizados para detecção do antígeno MT, utilizando-se para tal o anticorpo monoclonal (E9, fabricado por Dako, Carpinteria, CA, EUA), conforme padronização laboratorial prévia. Para tanto, cortes teciduais dispostos em lâminas pré-tratadas com organossilano foram desparafinados, hidratados. A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se EDTA (0,3722g em 1000ml de água destilada) tamponado com NaOH (pH 8.0) e submetidos a três ciclos de cinco minutos cada em forno de microondas. Após resfriamento e lavagem em água destilada, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena (10 volumes, 2 banhos de 15 minutos) e os cortes lavados (15 banhos em água destilada). Na sequência procedeu-se para bloqueio de avidina [Solução de avidina 0,1% em solução Tris-HCL tampão salino contendo 0.015 mol/L de sódio (Dako, código X0590 lote 8220); por 10 minutos. Lavagem com água destilada]. O bloqueio da biotina foi realizado com solução de biotina 0,01% em Tris-HCL tampão contendo 0.015

525 mol/L de sódio azide (Dako, 0590 lote 8220) por 10 minutos. Os cortes foram incubados
526 com o anticorpo primário diluído (1:800 de TRIS-HCL), por 18 horas em geladeira. Após
527 lavagem em água destilada, os cortes foram incubados em anticorpo secundário biotilado
528 (diluição 1:100, por 30' a 4° C) seguido de nova lavagem e incubação em solução de
529 estreptavidina-biotina-peroxidase. A reação de coloração foi desenvolvida com a imersão
530 dos cortes histológicos em solução de 3.3'tetrahidrocloro de diaminobenzidina por três
531 minutos. Carcinomas epidermóides com reatividade reconhecida para MT foram utilizados
532 como controle, e a omissão dos anticorpos primários foi empregada como controle
533 negativo.

5.3 Análise Microscópica da Imunomarcação

534 5.3.1 Avaliação qualitativa

535 A análise qualitativa foi baseada na descrição topográfica da expressão de MT,
536 considerando os diferentes tipos celulares componentes das lesões e os arranjos
537 arquiteturais das neoplasias, tomando cada subtipo histológico em particular: tubular,
538 cribriforme e sólido.

5.3.2 Avaliação semiquantitativa

539 Para esta análise, foi considerado um número de 500 células, correspondendo a 10
540 campos microscópicos visualizados com objetiva de 40x e ocular de 10x. Estes valores
541 foram obtidos considerando um coeficiente de variância estável e abaixo de 20%,
542 conforme trabalhos previamente desenvolvidos com esta metodologia (ALVES *et al.*,

543 2007). Foram analisados campos histológicos contendo células tumorais, identificados de
544 forma periódica e não repetida no corte histológico disponível, conforme descrito abaixo.

545 Foram considerados campos histológicos presentes em um único eixo de
546 movimento no charriot (x ou y). Inicialmente, com objetiva de baixa ampliação (4× ou
547 10×), foi identificada uma área de marcação mais evidente e intensa, denominada *hot spot*.
548 Tendo essa área como referência, a avaliação seguiu o eixo de maior dimensão do corte
549 tecidual (horizontal ou vertical), passando necessariamente pela área de *hot spot*, ou por
550 uma área contendo o maior número de *hot spots* possíveis. A partir de uma observação em
551 objetiva de 100x foi estimado o número de campos microscópicos possíveis de se avaliar
552 neste longo eixo, calculando posteriormente o valor correspondente de campos para a
553 avaliação em aumento de 4000x. Como apenas 10 campos foram avaliados por cada caso,
554 o seguinte cálculo foi realizado para determinar o período entre um campo a ser avaliado e
555 o outro, dentro do eixo selecionado previamente:

$$I = (n/10) - 1$$

(onde “I” é o número de campos que constituem o intervalo entre dois campos a serem analisados, e “n” é o número total de campos constantes do longo eixo orientado pelo *hot spot*, sendo considerados apenas números inteiros, sem arredondamento)

556 Inicialmente, foram definidos quatro parâmetros na presente análise, a saber:

557 1) Localização da expressão da MT no interior da célula: citoplasmática, nuclear e
558 citoplasmática ou apenas nuclear;

559 2) Intensidade de expressão, considerada fraca, moderada ou intensa;

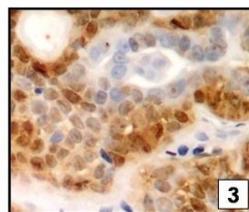
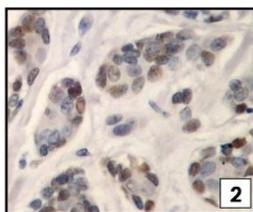
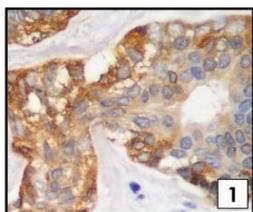
560 3) Proporção de células tumorais expressando MT independentemente da
561 intensidade e de sua compartimentalização celular;

562 4) Proporção de marcação nuclear, independentemente de sua intensidade ou
563 mesmo se esta é restrita ou simultânea com a citoplasmática.

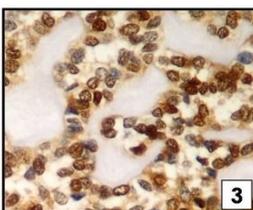
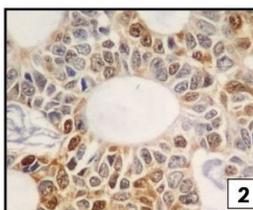
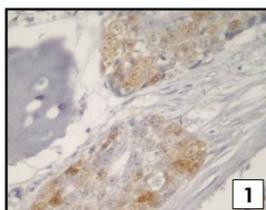
564 A Figura 1 ilustra cada um dos parâmetros utilizados mencionados anteriormente,
565 considerando os diferentes escores e suas definições semiquantitativas.

566

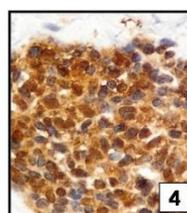
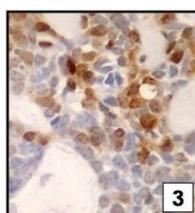
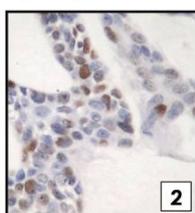
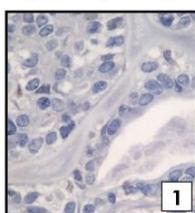
567

A) Padrão de marcação (predominante por campo)

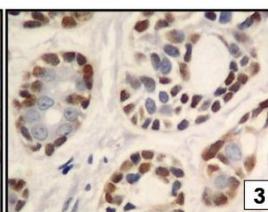
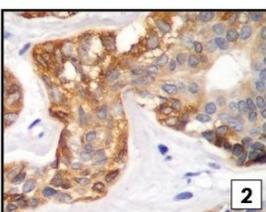
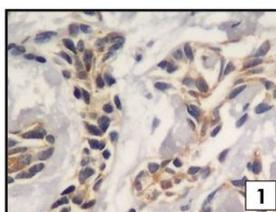
0 – Ausência de marcação
 1 – Citoplasmática.
 2 – Nuclear.
 3 – Citoplasmática e nuclear.

B) Intensidade (predominante por campo)

0 – Ausência de marcação
 1 – Fraca
 2 – Moderada
 3 – Forte

C) Proporção (frequência de positividade dentre todas as células neoplásicas)

0 – Ausência de marcação
 1 – > 0% até 25%.
 2 – > 25% até 50%
 3 – > 50% até 75%
 4 – > 75%.

D) Núcleo (frequência de positividade dentre as células marcadas)

0 – Ausência de marcação
 1 – > 0% até 25%.
 2 – > 25% até 75%
 3 – > 75%

Figura 1. Modelo ilustrativo dos padrões de expressão da MT nos casos de CAC segundo os códigos utilizados para avaliação semiquantitativa dos casos.

568 A partir dos valores atribuídos a cada um dos 10 campos histológicos avaliados,
569 obteve-se uma média final por parâmetro, que foi considerada representativa do caso. A
570 partir destes resultados, um quinto escore foi definido como sendo a média dos quatro
571 escores considerados anteriormente e representados na Figura 1, designado como **escore**
572 **geral**.

573 Um sexto índice de avaliação de expressão de MT foi utilizado, designado como
574 método do *Quickscore*. Este índice é definido como sendo o resultado de uma
575 multiplicação do parâmetro intensidade pelo parâmetro proporção (parâmetros *b* e *c* da
576 Figura 1) (DETRE *et al.*, 1995).

5.3.3 Análise dos dados e análise estatística

577 Definiu-se neste estudo, para fins de análise estatística, o início do tempo de
578 seguimento dos pacientes como a data do primeiro tratamento e, como eventos em estudo,
579 as metástases e os óbitos relacionados ao câncer. Os pacientes que evoluíram a óbito por
580 causas não relacionadas aos tumores de glândulas salivares, ou ainda aqueles que
581 estiveram vivos ao final da observação (definida como fevereiro de 2010), foram incluídos
582 no estudo como dados “censurados”, e para estes casos a data final foi considerada como
583 sendo aquela do óbito ou de último registro em prontuário, respectivamente. O período
584 entre as datas inicial e final (data do evento ou do final da observação) foi considerado
585 como o período de sobrevivência global dos pacientes, e a partir deste dado foi construída a
586 curva de Kaplan-Meier (curva tempo-evento) para cada variável em estudo.

587 Para avaliação dos diferentes parâmetros clínicos e de expressão da MT
588 relacionadas às metástases, os casos foram separados em dois grandes grupos: 1)
589 tumores primários metastáticos (PM) e 2) primários não metastáticos (PNM).

590 Considerando que as metástases constituem-se num fenômeno biológico relacionado à
591 progressão neoplásica e de pesarem negativamente na formulação do prognóstico, o
592 grupo PM foi ainda subdividido, considerando a cronologia das metástases em: 1)
593 tumores primários metastáticos precoces (PMp), que corresponde aos casos em que as
594 metástases estavam identificáveis à época dos exames de admissão (clínicos e
595 imagiológicos, confirmados histologicamente após o tratamento); e 2) primários
596 metastáticos tardios (PMt), que corresponde aos casos em que o evento metastático foi
597 observado nos exames subseqüentes de acompanhamento do paciente.

598 Todas as análises estatísticas e o desenho das Figuras e Gráficos foram
599 realizados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San
600 Diego, CA, USA). Para todas as análises propostas, a hipótese de nulidade foi rejeitada
601 quando os valores de p foram menores que 0,05.

602 Estatística descritiva foi empregada para caracterizar a amostra nas diferentes
603 variáveis estudadas, considerando média, desvio padrão e frequências relativas dadas
604 em percentuais. Todas as análises foram precedidas da realização do teste de
605 normalidade de D'Agostino e Pearson, conforme orientação do *software* estatístico
606 mencionado.

607 As variáveis quantitativas (idade, tempo de queixa, tamanho dos tumores,
608 escores de marcação da MT) foram analisadas utilizando o teste t de Student para dados
609 paramétricos e o Mann-Whitney para dados não paramétricos, quando da comparação
610 entre dois grupos independentes. Para as comparações entre três grupos independentes
611 ou mais (tipo e o grau histológico de malignidade; grupos metastáticos nas suas
612 diferentes cronologias de metástases) os testes utilizados foram o Anova para os dados
613 paramétricos e o Kruskal-Wallis para os não paramétricos, seguidos de pós-teste de
614 Bonferroni. Correlação entre variáveis foram avaliadas segundo a normalidade dos

615 dados, considerando os testes de Spearman e de Pearson. Variáveis categóricas foram
616 comparadas pelo teste Exato de Fisher ou do Qui-quadrado, sempre considerando a
617 opção dada pelo *software* de análise.

618 As curvas de sobrevida foram estabelecidas por meio do método de Kaplan-
619 Meier e comparadas pelo teste de Cox-Mantel utilizando-se do tempo total de estudo.
620 Sua construção baseou-se nas variáveis metástases e expressão de MT.

Resultados

6. Resultados

6.1 Características Clinicopatológicas e Dados de Seguimento

621 Dos 49 pacientes com CAC avaliados no presente trabalho, 17 foram homens e 32
622 mulheres (M:F = 1:2.6), com idades variando de 17 a 87 anos (media 56.67 ± 26.6). As
623 glândulas salivares menores foram mais comumente afetadas, tendo o palato como o sítio
624 mais envolvido (11/49, 22,4%). Das glândulas salivares maiores, a submandibular foi a
625 mais comumente afetada (10/49, 20,4%) (Figura 2). O tempo de queixa variou de 1 mês a
626 15 anos (180 meses) e o tamanho tumoral variou de 0,5cm a 10cm no maior diâmetro
627 (media 3.6 ± 2.3 cm). O sintoma mais comum foi a tumoração (87,7%), que esteve
628 algumas vezes combinada com dor (36,7%), parestesia (4,0%), ou ambos (4,0%). O
629 sintoma de dor foi visto isoladamente em 12,3% dos casos. Outros registros identificados
630 para a lesão foram disfagia (16,3%), otalgia (16,3%), sangramento (8,1%), odinofagia
631 (6,1%) e úlcera (4,0%). A doença avançada, ou seja, casos classificados como estágios
632 clínicos III e V, foi discretamente prevalente, correspondendo a 51,1% dos casos.

633 Considerando dados histopatológicos, o padrão cribriforme (53,0%) foi
634 predominante, seguido de tubular (28,5%) e sólido (18,4%). O grau histológico também foi
635 avaliado para todos os casos, prevalecendo os de grau moderado, que perfizeram,
636 aproximadamente, 47,0% dos casos. A invasão perineural foi vista em menos da metade
637 dos casos. Margens comprometidas foram detectadas em 21 casos dos 37 em que a mesma
638 foi avaliada (Tabela 3).

Tabela 3. Principais dados Clínico-patológicos dos 49 casos de CAC provenientes do INCA (1997-2004).

Variáveis	N. (%)	
Idade	50 (\pm 14)	
Gênero (masculino:feminino)	1:1.9	
Tempo de sintomas	26.7 (\pm 26,1)	
Tamanho do tumor (cm)	3.6 (\pm 1,7)	
Estágio clínico	Inicial (I e II)	22 (49.9%)
	Avançado (III e IV)	27 (51.1%)
Tipo histológico	Tubular	14 (28.6%)
	Cribriforme	25 (51%)
	Sólido	10 (20.4%)
Grau histológico*	Grau I	16 (32.6%)
	Grau II	23 (46.9%)
	Grau III	10 (20.4%)
Invasão perineural	13 (26.5%)	
Margem	Livre	16 (43.3%)
	Comprometida	21 (57.7%)

*Grau histológico de acordo com Greiner *et al.* (1989)

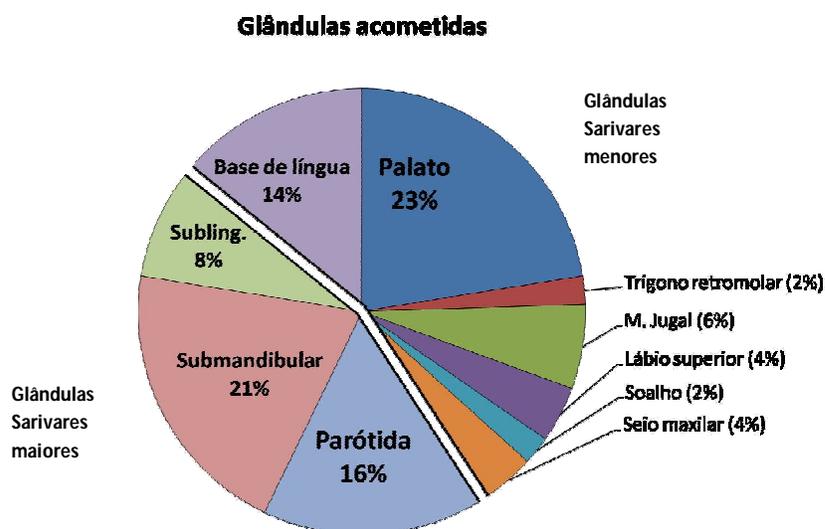


Figura 2. Distribuição dos casos de CAC segundo glândulas salivares acometidas

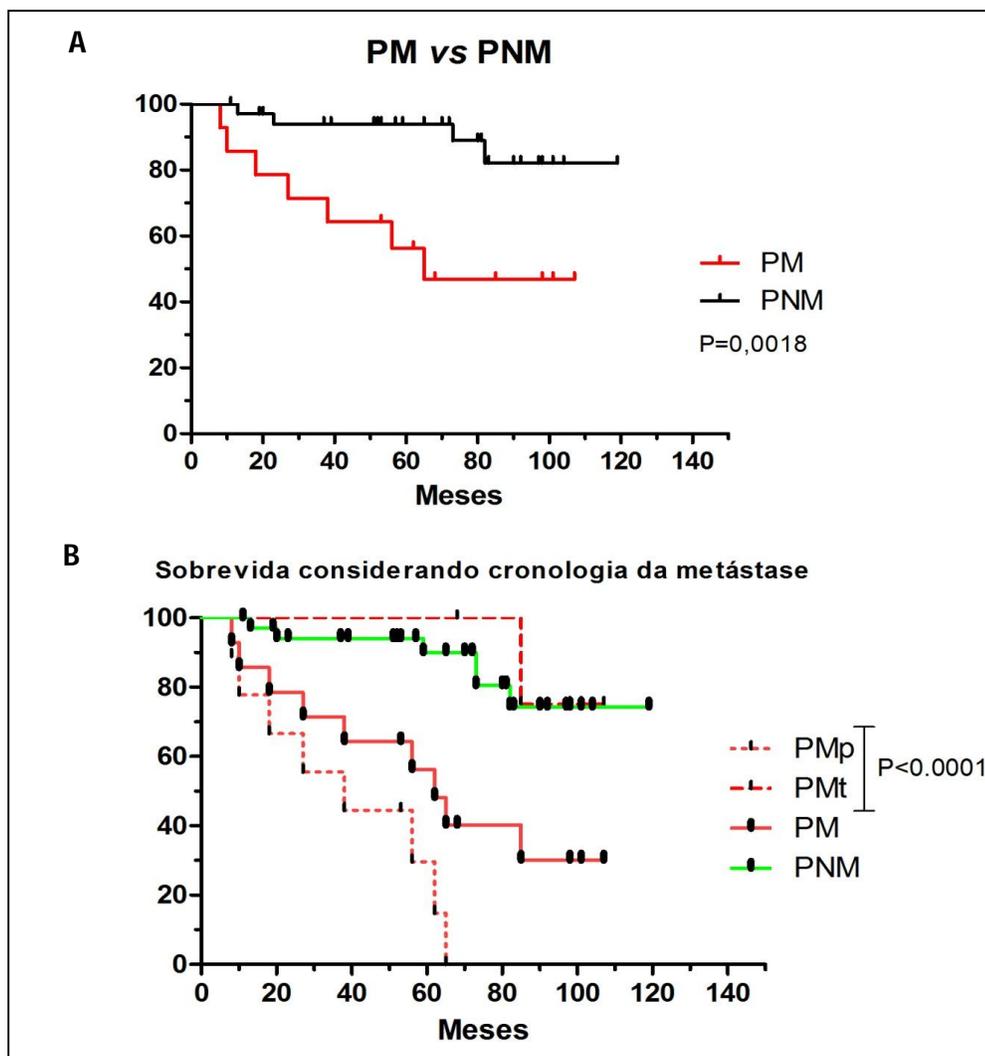
639 Todos os tumores foram tratados por ressecção cirúrgica, sendo que 36.7% tiveram
640 esvaziamento cervical. Além da cirurgia, 37 casos (75,5%) tiveram tratamento
641 complementar por radioterapia com fonte de cobalto (49,0%), alumínio (20,4%) ou ambos
642 (6.1%).

643 O período de acompanhamento dos pacientes variou entre 12 a 137 meses. Durante
644 este período foi observado recidiva em oito casos (16.3%), sendo todos os tumores
645 provenientes de glândulas salivares menores. Dos casos recidivantes, cinco (62,5%)
646 receberam radioterapia, quatro com finalidade adjuvante e um caso com finalidade
647 terapêutica.

648 Quatorze casos (28,6%) foram metastáticos (PM). Destes, dois foram
649 exclusivamente regionais, oito exclusivamente à distância, e quatro casos tiveram
650 metástases locais e à distância simultaneamente. O nível II foi o mais envolvido (4/14,
651 28,6%) regionalmente enquanto os pulmões foram afetados em nove casos (64.3%). Outros
652 sítios incluíram fígado (1/14, 7,1%), vértebras (2/14, 14,2%), ilíaco (1/14, 7,1%) e rim
653 (1/14, 7,1%). O caso de envolvimento hepático também apresentou metástases pulmonares,
654 enquanto outro caso mostrou metástases em ilíaco e vértebras, concomitantemente.

655 Houve dois padrões distintos de cronologia metastática: nove casos tiveram suas
656 metástases identificadas logo aos exames de admissão, sendo classificados como precoces
657 (PMp); cinco casos tiveram as metástases identificadas em exames complementares no
658 seguimento do paciente, sendo classificados como tardias (PMt). A evidenciação das
659 metástases no grupo PMt se deu após 46 meses de acompanhamento, com um tempo
660 máximo de 71 meses (média de 68 ± 19 meses).

661 A sobrevida global foi de 69,4%, sendo ela de 83% para os casos PNM e 35,7%
 662 para os PM. Quando os tumores PM mostraram metástases precoces, a sobrevida decai
 663 para 11,1% (Figura 3).



664

Figura 3. Curvas de sobrevida segundo comportamento metastático dos CAC. A) Curvas de sobrevida considerando a presença ou não do evento metastático; B) Curvas de sobrevida considerando o evento metastático, individualizadas segundo sua cronologia precoce ou tardia. (Método de Kaplan-Meier, complementado pelo teste de Cox-Mantel)

6.1.1 Avaliação e análise dos dados Clinicopatológicos

665 A **Tabela 4** resume os valores de p obtidos a partir das comparações entre os
666 grupos de dados clinicopatológicos. Houve uma prevalência de pacientes mais idosos na
667 amostra de tumores sólidos, com idades variando entre 37-79 anos (média de 61,1). A
668 diferença significativa esteve entre estes e os tumores cribriformes, que acometeram alguns
669 pacientes jovens (17-71 anos, média de 46), enquanto os pacientes com tumores
670 predominantemente tubulares tiveram idades intermediárias (34-80, média de 48,9).
671 Situação similar foi observada em relação à idade e o grau histológico. A diferença entre
672 tempo de sintomas também foi proporcionalmente maior nos tumores sólidos (12-180,
673 média de 50,22 meses) do que nos cribriformes (1-71, média de 20,75 meses). Porém,
674 adicionalmente, não nenhuma correlação entre idade e tempo de sintomas..

675 Observou-se que as glândulas maiores foram acometidas frequentemente por
676 tumores maiores (1-10; média de 4,4 cm) do que os encontrados acometendo glândulas
677 menores no geral (0,5-8,0; média de 3,0 cm), aproximando de uma significância estatística
678 ($p=0,05$). Da mesma forma, a correlação entre tipo histológico e invasão perineural
679 margeou significância estatística, sendo mais frequentes nos subtipos tubulares, e pouco
680 frequentes nos cribriformes ($p=0,057$). Nenhum dos casos com invasão perineural
681 recidivou ($p=0,09$).

682 A sobrevida foi significativamente diferente entre T1, T2, T3 e T4 ($p=0,0126$). Dos
683 15 óbitos verificados, 80% foram T3 (4/15 casos) ou T4 (8/15 casos). Estágios clínicos de
684 doença inicial (I e II) mostraram sobrevida maior (90,9%) do que visto para doença
685 avançada (48,1%) ($p = 0,0418$). Sintomas clínicos, idade acima de 45 anos e tempo de
686 queixa acima de 18 meses não mostraram associação significativa com sobrevida ($p=$
687 0,2717, $p= 0,2543$, e $p= 0,9748$, respectivamente). O padrão histológico sólido foi fator

688 importante ao prognóstico, mostrando sobrevida de apenas 44,4%, comparados aos outros
 689 subtipos juntos ($p = 0,0385$). A sobrevida foi semelhante entre tubulares (78,6%) e
 690 cribriformes (73,1%). Os tumores que tiveram diagnosticado comprometimento de
 691 margem também culminaram em pior prognóstico, traduzido por menor sobrevida
 692 ($p=0,0137$). Os tumores recidivados não refletiram em pior sobrevida ($p = 0,8458$), bem
 693 como aqueles com evidenciação de invasão perineural ($p = 0,7281$) e situados em
 694 glândulas salivares maiores ou menores ($p = 0,3713$).

Tabela 4. Valores de p para as comparações entre os diferentes tipos de dados Clínico-patológicos estudados*.

	Margem comprometida	Tipo histológico	Grau de malignidade	Invasão Perineural	Recidiva	Local.**
Idade ^{A ou B}	0,39	0,04	0,03	0,59	0,41	0,73
Sexo ^C	0,50	0,89	0,42	0,50	1,00	0,37
Tempo sintomas ^{D ou E}	0,20	0,05	0,16	0,18	0,17	0,20
Tamanho tumoral ^{D ou E}	0,96	0,18	0,17	0,79	0,46	0,05
Estágio clínico ^C	0,10	0,13	0,08	0,33	1,00	0,15
Localização* ^C	1,00	0,39	0,40	0,19	0,005	-
Recidiva ^C	1,00	0,82	0,62	0,09	-	-
Tipo histológico	0,65	-	-	0,05	0,82	-
Margem histológica	-	-	0,95	0,50	-	-

* A presença de metástases foi analisada separadamente.

** Considerou-se apenas dois grupos para as análises: glândulas menores e glândulas maiores.

Testes estatísticos utilizados nas comparações: **A.** teste t de student. (duas variáveis); **B.** ANOVA (três variáveis); **C.** Teste exato de Fisher; **D.** Mann-Whitney (duas variáveis não paramétricas); **E.** Kruskal-Wallis (três variáveis não paramétricas).

6.1.2 Avaliação e análise dos dados Clinicopatológicos *versus* metástases

695 Tumores PM foram maiores ($p = 0.048$), acometendo, mais frequentemente,
 696 glândulas salivares maiores ($p = 0.024$). Dentre os tumores sólidos, cinco (55,5%) foram
 697 PM ($p = 0,0960$). Nenhuma outra variante clínico-patológica apresentou associação com a
 698 presença de metástases. Diferenças observadas para cada parâmetro estudado estão
 699 sumarizadas na Tabela 5.

700 **Tabela 5.** Avaliação e análise dos dados Clínico-patológicos com o comportamento
 701 metastático.

Variáveis	PNM	PM	<i>p</i>
Média de idade	49 ± 14	53 ± 13	0,4749
Gênero (masculino:feminino)	1:2.5	1:1	0,1929
Tempo de sintomas (meses)	25,7 ± 27,1	29,3 ± 25,5	0,7641
Tamanho médio; variação (cm)	3,3±1,3); 0.5-8	5,5 ± 2,6; 2-10	0,0048
Glândulas salivares maiores (n/%)	9 (18,4%)	9 (18,4%)	0,0204
Glândulas salivares menores (n/%)	26 (53,0%)	5 (10,2%)	
Recidiva (n/%)	6 (12,2%)	2 (4,1%)	1,0000
Tipo histológico (n/%)	Tubular	11 (22,4%)	3 (6,1%)
	Cribriforme	20 (40,8%)	6 (12,2%)
	Sólido	4 (8,2%)	5 (10,2%)
Grau tumoral*	I	14 (28,6%)	2 (4,1%)
	II	15 (30,6%)	8 (16,3%)
	III	6 (12,2%)	4 (8,2%)
Estado da margem	Negativo	13 (26,5%)	3 (6,2%)
	Positivo	13 (26,5%)	8 (16,3%)
Invasão perineural	7 (14,3%)	6 (12,3%)	0,4764

702 * Grau histológico segundo Greiner *et al.*, 1995.

6.2 MT *versus* dados Clinicopatológicos

703 6.2.1 Análise qualitativa da expressão de MT

704 As glândulas salivares normais adjacentes aos tumores expressaram, com
705 frequência moderada, marcação em núcleo e citoplasma de células mioepiteliais. Não
706 houve casos de CAC classificados como negativos. Em áreas de morfologia tubular, a
707 marcação restringiu-se à camada abluminal, permanecendo negativa nas células ductais.
708 Nas estruturas cribriformes e sólidas, um padrão de mosaico foi frequentemente observado,
709 sendo que as células negativas para MT eram frequentemente basaloides ou arredondadas,
710 muitas das quais também presentes em estruturas ductais. As células limitando
711 pseudocistos e faceando o estroma tumoral, externamente aos cilindros tumorais,
712 expressavam algumas vezes uma marcação aumentada. As Figuras 4, 5 e 6 ilustram os
713 padrões de marcação observados de acordo com os subtipos histológicos de CAC.

6.2.2 Análise semiquantitativa da expressão de MT

714 Todos os padrões de expressão de MT mostraram escores maiores para tumores
715 sólidos (Figura 7), principalmente quanto ao compartimento celular de marcação, que
716 demonstrou marcação nuclear e citoplasmática significativamente mais frequente em
717 sólidos que nos demais subtipos agrupados ($p = 0,0028$). Por outro lado, o padrão de
718 expressão da MT foi muito semelhante considerando os parâmetros clínicos utilizados na
719 determinação do prognóstico para CAC, como visto em seção anterior.

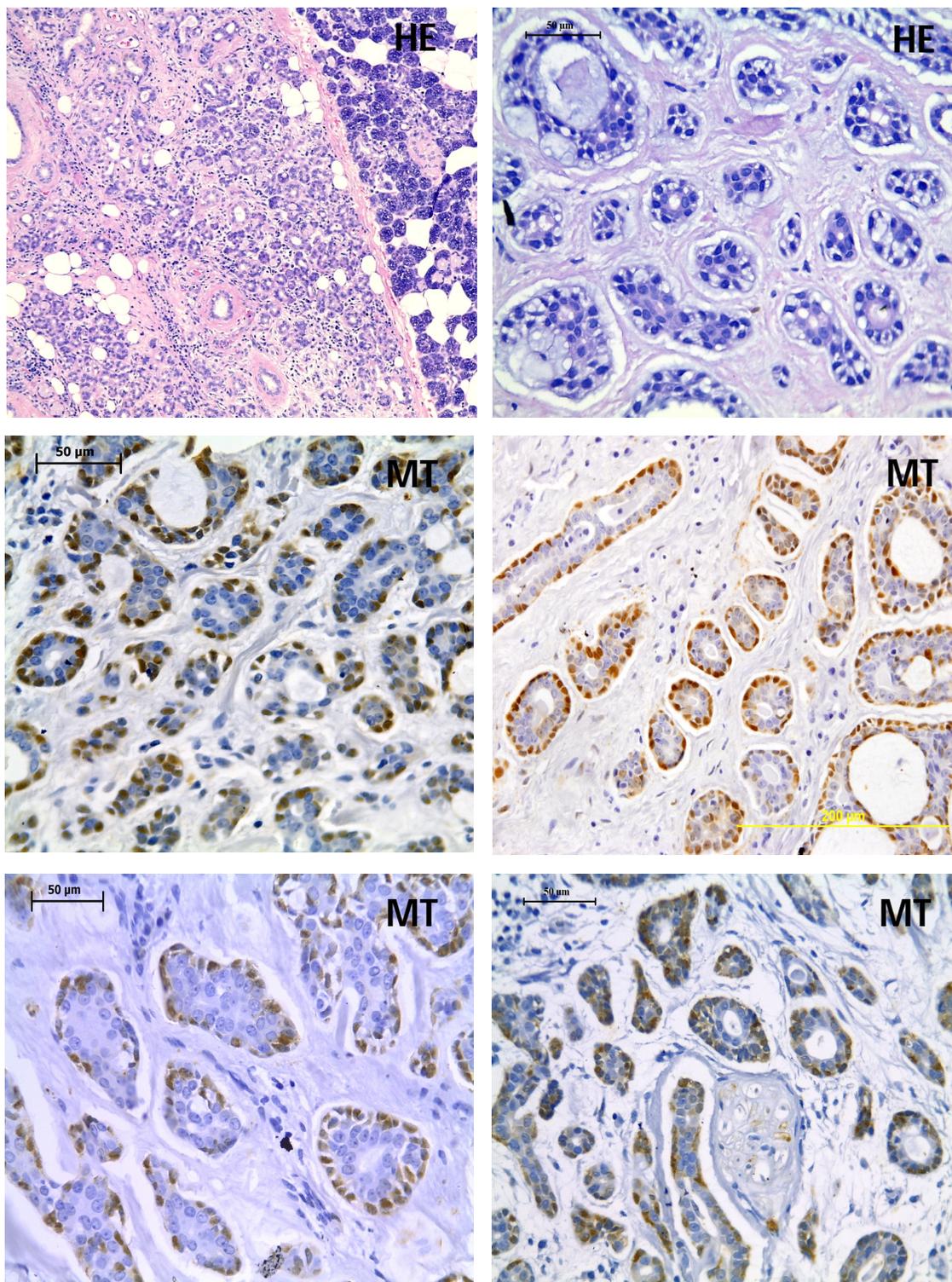


Figura 4. A) Padrão de CAC predominantemente tubular. Imagem observada em aumento de 40x. Observa-se invasão glândula parótida (à direita) pelas células tumorais. B) Observa-se o arranjo das células em duas camadas, uma interna ou luminal e outra externa ou abluminal. C - F) A MT está expressa nas células abluminais, que correspondem ao fenótipo mioepitelial. F) Células tumorais invadindo fascículo neural.

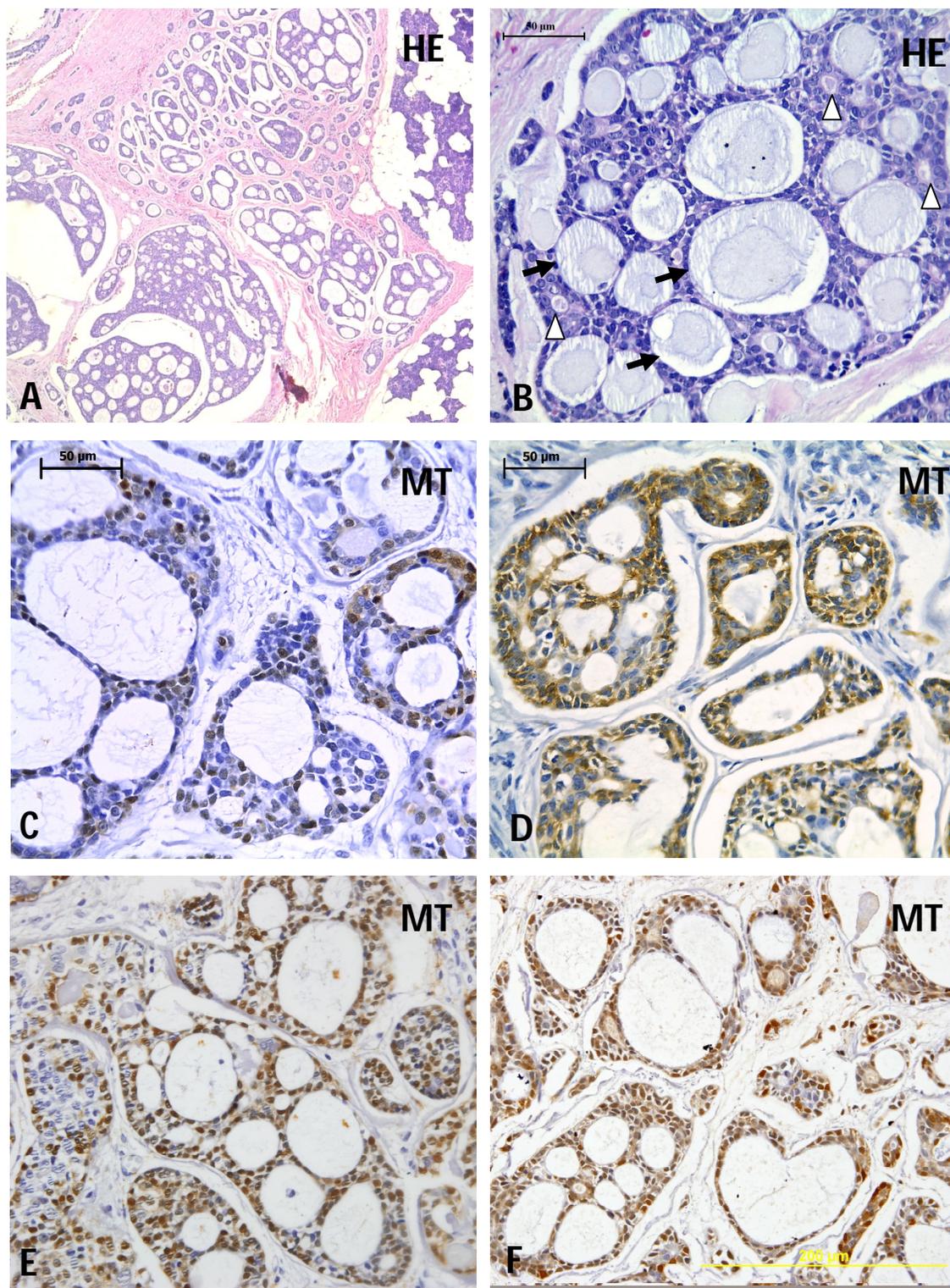


Figura 5. A) Padrão de CAC predominantemente cribriforme. Imagem observada em aumento de 40x. Ilhotas tumorais à direita invadindo glândula parótida e lençóis tumorais à esquerda, ambos embebidos em estroma fibroso. B) Ilhota cribriforme, demonstrando a formação dos espaços pseudocísticos (flecha), neste caso, preenchidos por material mucóide. Pequenas estruturas ductiformes podem ser vistas entre as células que formam os pseudocistos (cabeça de seta). C - F) Expressão da MT no padrão cribriforme evidenciando proporções diferentes de cada caso e ainda um padrão de compartimentalização da marcação distinto. Em C predominantement nuclear, em D, predominantemente citoplasmática, em F, nuclear e citoplasmática.

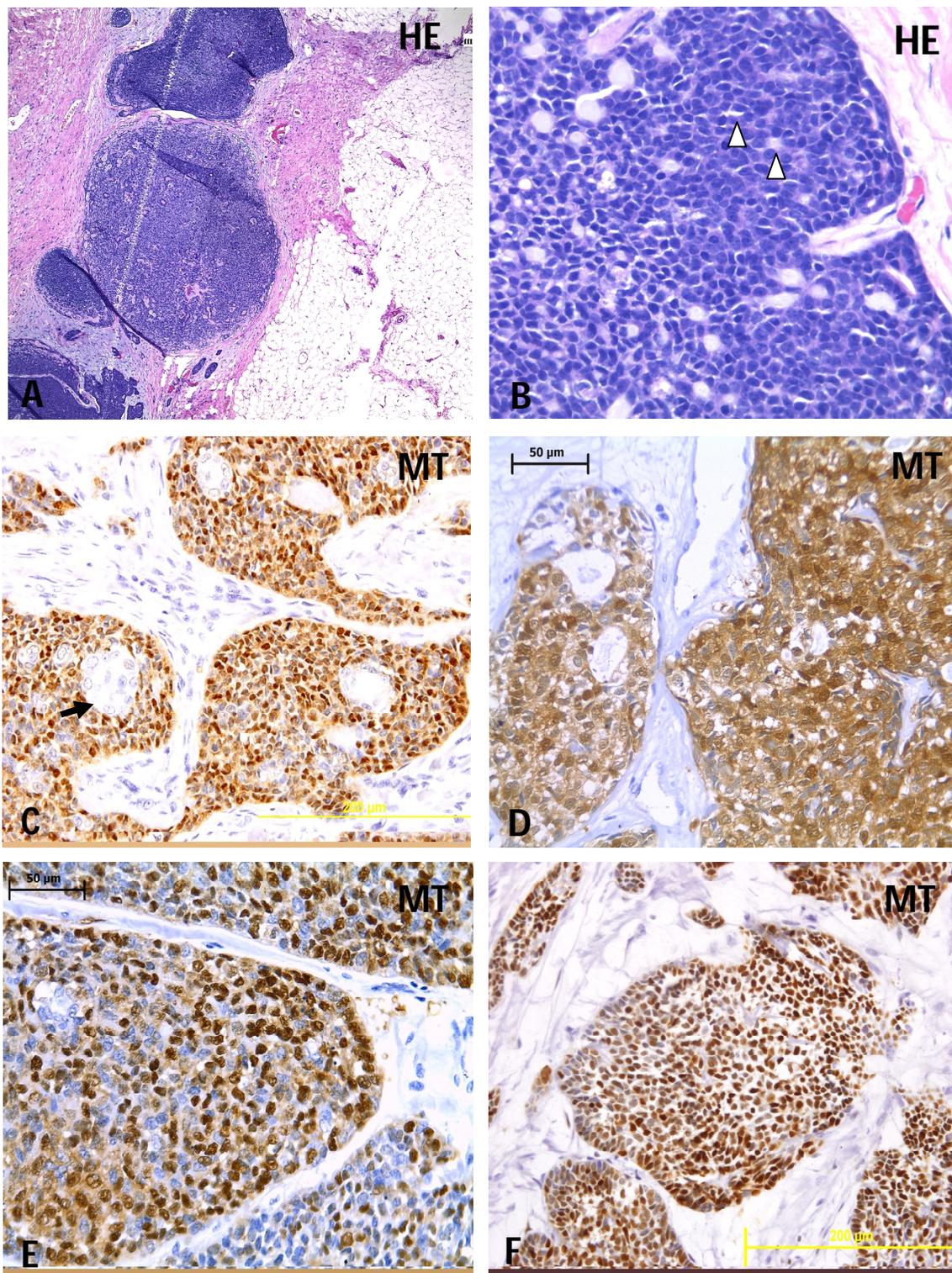


Figura 6. Padrão de CAC predominantemente sólido. **A)** Tumor sólido circundado por estroma fibroso e margeando tecido adiposo à direita. **B)** Objetiva de 200x ilustrando células com núcleo poligonal arranjadas em massa celular sólida, sendo possível observar escassas formações ductais (cabeça de seta) ao interior e ausência de pseudocistos. **C)** Marcação predominantemente nuclear e citoplasmática difusa, com ausência de expressão em formações de células com fenótipo epitelial preservado (flecha). **D)** Marcação nuclear e citoplasmática generalizada. **E)** Marcação difusa em padrão de mosaico. **F)** Marcação predominantemente nuclear.

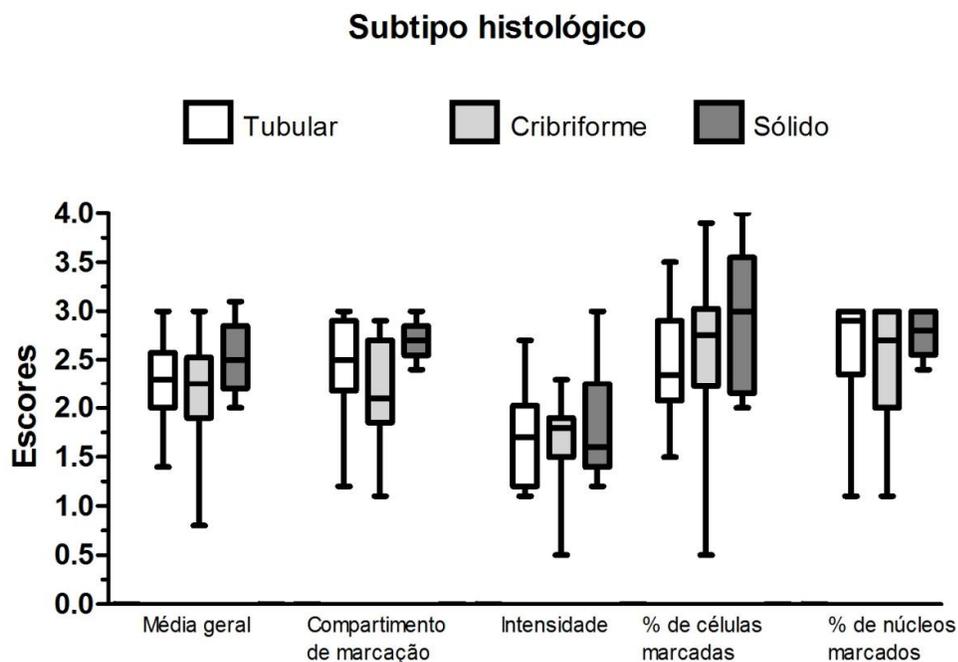


Figura 7. Visão geral dos escores distribuídos segundo o subtipo histológico do CAC. Valores mais altos são observados em tumores sólidos.

6.3 Expressão de MT *versus* Comportamento Metastático

720 Os valores extremos para todos os parâmetros foram sempre encontrados no mesmo
 721 grupo de tumores, ou seja, os escores mais altos pertenceram ao grupo PM e os mais
 722 baixos ao grupo PNM (Figura 8). Um resumo dos achados para cada parâmetro e dos
 723 dados de estatística descritiva estão sumarizados na Tabela 6. A única diferença
 724 estatisticamente significativa entre os grupos foi obtida por meio do *Quickscore* ($p =$
 725 0.0440) (Figura 9). Porém os resultados refletem que também houve a presença de alguns
 726 casos com escores baixos em PM e outros de escores altos em PNM, assim não atingindo
 727 um intervalo de confiança de 95%.

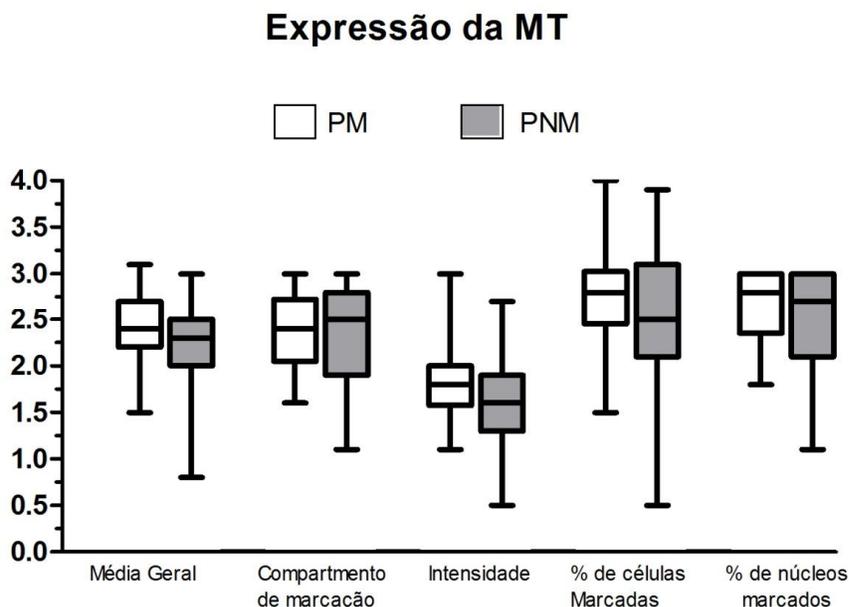


Figura 8. Visão geral da distribuição da MT segundo o comportamento metastático (PM e PNM). Nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 6. Variações da expressão de MT segundo comportamento metastático. Método semiquantitativo.

Variáveis	PNM (n.35)		PM (n.14)	
	Achados	Média (Mediana; variação)	Achados	Média (Mediana; variação)
% células marcadas	18 casos < 51% (51.4%)	2.1 (2.3; 0.8-3.0)	4 casos < 51% (28.6%)	2.4 (2.4; 1.5-3.1)
Intensidade	Fraca (13) Mod. (21) Forte (1)	1.6 (1.6; 0.5-2.7)	Fraca (2) Mod. (10) Forte (2)	1.9 (1.8; 1.1-3.0)
Compartimento Celular	Citopl. (6) N e C (19) Nuclear (10)	2.3 (2.5; 1.1-3.0)	Citopl. (-) N e C (10) Nuclear (4)	2.4 (2.4; 1.6-3.0)
% de núcleos positivos	22 casos >75% (62.8%)	2.5 (2.7; 1.1-3.0)	10 casos >75% (71.4%)	2.7 (2.8; 1.8-3.0)
Média geral	12 casos < 2.0 (34.3%)	2.2 (2.3; 0.8-3.0)	1 caso < 2.0 (7.1%)	2.4 (2.4; 1.5-3.1)
Quickscore	16 casos ≥ 6.0 (45.7%)	4.3 (4.0; 1.0-9.0)	10 casos ≥ 6.0 (71.4%)	5.9 (6.0; 1.0-12)

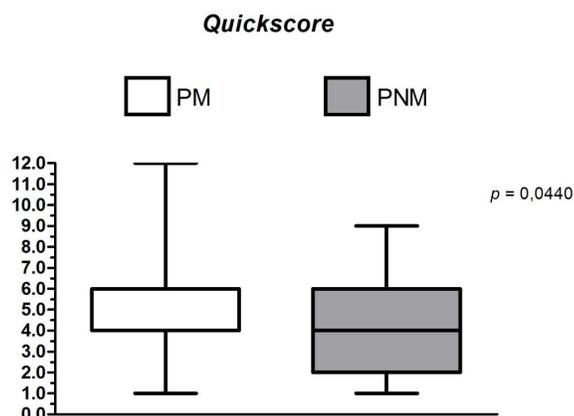


Figura 9. Distribuição dos valores entre os grupos PM e PNM segundo o *Quickscore* dos tumores. Os grupos possuem padrões estatisticamente diferentes, porém valores baixos também foram encontrados em PM.

729 Os tumores PM tiveram maior proporção de células marcadas para a maioria dos
 730 casos. Além disso, observou-se uma menor frequência de casos com marcação fraca nos
 731 casos PM (14,3%; dois casos) do que nos PNM (37,1%; treze casos). Não houve nenhum
 732 caso de PM com escore de compartimentalização celular abaixo de 1,6. Foi possível
 733 confirmar que os seis casos onde a marcação esteve predominantemente restrita ao
 734 citoplasma pertenciam ao grupo dos PNM. A positividade nuclear por sua vez foi mais
 735 comum em PM. No entanto, observou-se que em toda a amostra a expressão da MT esteve
 736 presente em ambos os compartimentos, nuclear e citoplasmático.

6.3.1 Comportamento metastático precoce

737 Observou-se neste estudo que os casos que pertenciam ao quarto quartil de
 738 marcação para os escores possuíam uma característica comum: todos tiveram metástases
 739 diagnosticadas logo aos exames de admissão do INCA (casos PMp), que incluem exames

740 clínicos, imagiológicos e laboratoriais. A Figura 10 ilustra esta diferença de escores.
 741 Utilizando o teste estatístico Kruskal-Wallis entre os grupos PMp, PMt e PNM, não foi
 742 obtido um p significativo. Entretanto, o pós-teste mostrou aproximação da significância
 743 para a diferença entre PMp e PNM considerando o *Quickscore*, Escore Geral e Intensidade.
 744 Utilizando o teste Mann-Whitney para uma análise de dois a dois entre os grupos PMp,
 745 PMt e PNM, obteve-se um p significativo utilizando o *Quickscore* ($p = 0,027$), escore geral
 746 ($p = 0,0394$) e intensidade ($p = 0,0481$).

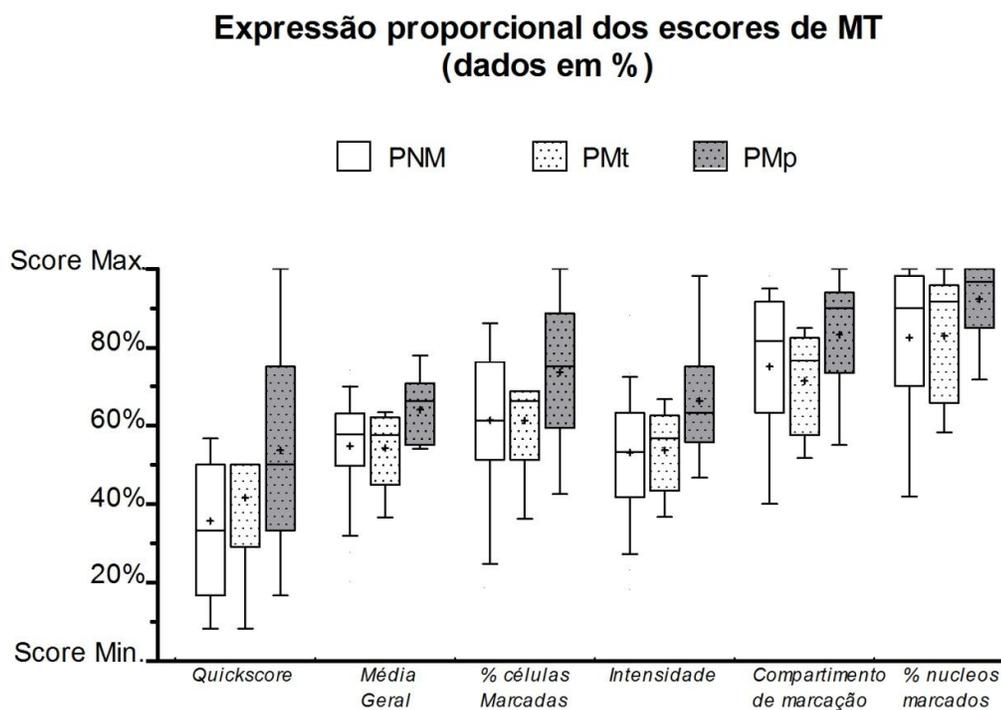


Figura 10. Visão geral dos escores, convertidos em porcentagem, e distribuídos segundo a cronologia do comportamento metastático (PNM x PMp x PMt).

747 O grupo PMp caracteriza-se por tumores que frequentemente metastatizaram para
 748 linfonodos (**Tabela 7**). Além disso, para este grupo, observou-se escore geral sempre
 749 acima de 2.2, casos com escores de *Quickscore* extremo, e uma concentração de óbitos.

Tabela 7. Diferenças clinicopatológicas e de expressão da MT segundo a cronologia do comportamento metastático (PMp x PMt).

	Caso	Local Primário	Metástase / tempo em meses [#]		Escore Geral	Quickscore	Sobrevida (meses)
			Regional	Distância			
Metástases na apresentação inicial	1	Submandibular	Periparotídeo	Pulmão e fígado	2.7	6.0	8*
	2	Submandibular	Níveis II e III	-	2.7	6.0	62*
	3	Submandibular	Cervical	Pulmão / 63 Pulmão / 22	2.7	6.0	65*
	4	Submandibular	Nível II	Coluna vertebral e ilíaco	2.4	4.0	10*
	5	Submandibular	Nível II	Pulmão	3.1	12.0	27*
	6	Trígono retromolar	-	Pulmão	2.2	6.0	38*
	7	Parótida	Periparotídeo	-	3.0	12.0	53
	8	Parótida	Nível II	Pulmão	2.2	4.0	56*
	9	Assoalho	Nível I	Pulmão	2.2	2.0	18*
Metástases durante acompanhamento	10	Parótida	-	Pulmão / 71	2.4	6.0	85*
	11	Base de lingual	-	Pulmão / 65	2.3	6.0	107
	12	Palato duro	-	vértebra / 97	2.1	6.0	101
	13	Submandibular	-	Pulmão / 56 Rim / 61	2.5	6.0	98
	14	Palato duro	-	Pulmão / 46	1.5	1.0	68

[#]Período entre tratamento e exame que detectou a metástase. *Óbito

750 A partir desta observação do comportamento mais agressivo dos casos PMp, e,
751 ainda, que os mesmos tiveram os mais altos escores avaliados para MT, optou-se por
752 testar seus escores médios como *cut-off* para análises de sobrevida. Apenas a média do
753 escore geral, que foi 2,7, determinou ponto crítico para sobrevida ($p = 0,034$) (Figura 11).

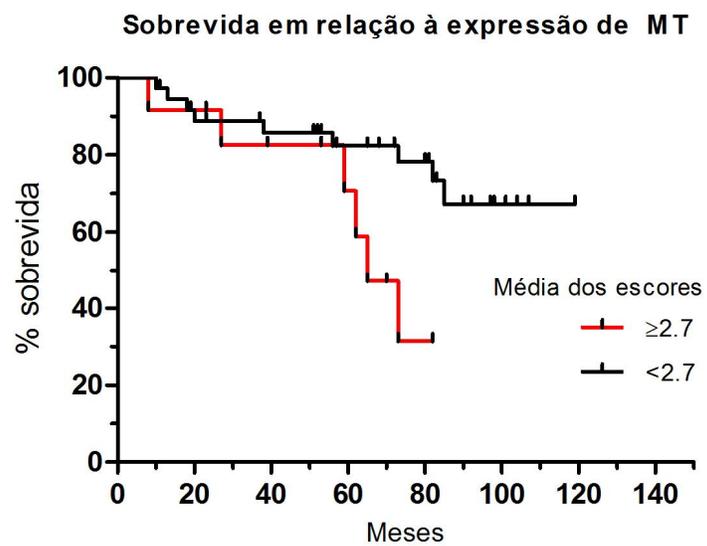


Figura 11. Curva de sobrevivida considerando a média de Escore Geral dos tumores PMp como cut-off ($p=0,0349$). Outros escores não mostraram esta capacidade.

7. Discussão

7.2 Dados Clínico-patológicos

755 Os tumores de glândulas salivares têm um papel de destaque dentre as neoplasias
756 humanas pela diversidade morfológica apresentada e pela variabilidade de comportamento
757 biológico (BOUKHERIS *et al.*, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2000; LOYOLA *et al.*, 1995).
758 Neste sentido, muitos estudos buscam por potenciais marcadores de prognóstico. Até o
759 momento, nenhum deles se mostrou satisfatório. Características clinicopatológicas como a
760 idade do paciente, localização do tumor, tipo e duração dos sintomas, estágio clínico,
761 modalidade do tratamento, subtipo histológico, invasão perineural e presença de margens
762 cirúrgicas comprometidas têm sido rigorosamente analisadas na tentativa de prever casos
763 de CAC potencialmente mais agressivos (KHAN *et al.*, 2001; PROKOPAKIS *et al.*, 1999;
764 RAPIDIS *et al.* 2005). A presente investigação procurou avançar na possibilidade de
765 identificar um marcador de comportamento biológico, incluindo metástases e prognóstico.
766 Esta proposta baseou-se em achados anteriores que mostraram haver uma relação entre a
767 expressão da MT e comportamentos biológicos mais agressivos para diferentes tipos de
768 tumores, em especial de origem ectodérmica (CHERIAN *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2007;
769 SUNARDHI-WIDYAPUTRA *et al.*, 1995; YAP *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2001; CARDOSO
770 *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2008). Além disto, dados recentes mostraram que o subtipo sólido
771 de CAC de glândula salivar, reconhecidamente mais agressivo, apresenta padrões elevados
772 de expressão de MT (ALVES *et al.*, 2007).

773 Utilizou-se no presente estudo uma amostra representativa de CAC, considerada
774 assim por representar epidemiologicamente a maioria dos aspectos descritos na literatura.
775 Os pacientes do sexo feminino foram acometidos com maior frequência, assim como visto

776 em outras séries (BUCHNER *et al.*, 2007; KO *et al.*, 2007; COHEN *et al.*, 2004), embora
777 incidências semelhantes (BOUKHERIS, *et al.*, 2009; KOKEMUELLER *et al.*, 2004) ou
778 até maiores para sexo masculino foram publicadas (PEREZ *et al.*, 2006). Houve variações
779 amplas de idade, permanecendo a média de 56 anos. Esta prevalência em adultos de meia
780 idade também tem sido bem caracterizada (BUCHNER *et al.*, 2007; LOYOLA *et al.*, 1995;
781 COHEN *et al.*, 2004; KO *et al.*, 2007).

782 As glândulas salivares menores foram mais comumente afetadas, com predileção
783 por palato, sendo que dentre as glândulas maiores, a glândula submandibular e a parótida
784 foram as mais envolvidas (LOYOLA *et al.*, 1995; BUCHNER *et al.*, 2007; KO *et al.*,
785 2007; PEREZ *et al.*, 2006; GARDEN *et al.*, 1995). A localização em glândulas salivares
786 menores favorece recidivas e parece associar-se aos casos mais avançados (estágio IV), e,
787 finalmente, ao pior prognóstico (KO *et al.*, 2007). De fato, todos os casos recidivantes da
788 presente amostra foram provenientes de glândulas salivares menores (p=0,005), entretanto,
789 a sobrevida não foi afetada. Acredita-se que os tumores em glândulas salivares maiores
790 têm um prognóstico favorável pela apresentação clínica precoce e pela maior facilidade de
791 remoção tumoral por completo (KHAN *et al.*, 2001). Porém, estes casos estiveram
792 significativamente relacionados a metástases em nosso estudo, contrapondo este conceito.
793 Além disso, relata-se na literatura um comportamento mais agressivo para tumores de
794 glândulas submandibulares, que mostram maior índice de metástase e pior prognóstico
795 (VAN DER WAL *et al.*, 2002). Observamos em nosso trabalho que 48,3% dos tumores
796 metastáticos estiveram em glândula submandibular, sendo que destes, apenas um não foi a
797 óbito durante o acompanhamento. Assim, parece que o melhor prognóstico pode estar
798 relacionado aos tumores em parótida, e não em glândulas maiores como um todo (PEREZ
799 *et al.*, 2006).

800 O tempo de queixa variou entre 1 a 180 meses, retratando aquilo observado
801 amplamente para CAC, ou seja, um tumor que frequentemente evolui de forma arrastada
802 (COHEN *et al.*, 2004; PEREZ *et al.*, 2006). Um período superior a 18 meses mostrou
803 impacto no prognóstico em um dos trabalhos (PEREZ *et al.*, 2006). Observamos também
804 que os casos metastáticos tiveram um tempo de queixa maior, mas sem correlação
805 significativa. De forma contrária, NASCIMENTO *et al.* (1986) observaram prognóstico
806 pior e aumento de metástase para os casos com menos de um ano de sintomas
807 (NASCIMENTO *et al.*, 1986). Atentou-se também por correlacionar tempo de queixa com
808 tamanho tumoral neste estudo, porém não observamos nenhuma associação significante, o
809 que, indiretamente demonstra o comportamento heterogêneo do CAC. O sintoma mais
810 comum foi a percepção do aumento de volume de forma assintomática, porém dor e/ou
811 parestesia esteve associada a mais da metade dos casos. Esta sensação de massa palpável
812 indolor também foi mais comum nos casos de outras séries (COHEN *et al.*, 2004). O
813 sintoma de dor, entretanto, foi mais frequente no presente estudo, representando cerca de
814 10-20% em outras séries (COHEN *et al.*, 2004; KO *et al.*, 2007). Alguns autores referem
815 que os sintomas de dor e parestesia possuem algum grau de interferência direcionando para
816 um pior prognóstico (PEREZ *et al.*, 2006). Não observamos esta diferença na presente
817 amostra.

818 O tamanho tumoral variou de 0,5cm a 10,0 cm, com uma média de 3.6 (\pm 2.3). A
819 sobrevida foi significativamente menor para T3 e T4, que são tumores maiores que 4 cm
820 ou tumores de qualquer tamanho que apresentam invasão extraparenquimatosa. Segundo
821 COHEN *et al.* (2004), os tumores T1 tendem a apresentar melhor prognóstico do que T2
822 ou maiores, com aumento de até 63% na mortalidade (COHEN *et al.*, 2004). Na presente
823 casuística a mortalidade aumentou de 20% para 80% dos casos T1 e T2 para os T3 e T4.
824 Além disso, observou-se que os tumores metastáticos foram em média 2,2 cm maiores que

825 os não metastáticos. KO *et al.* (2007) também verificaram esta associação, observando que
826 havia quantidade relativamente significativa de casos metastáticos para tumores maiores
827 que 3 cm (KO *et al.*, 2007).

828 Variações na sobrevida do CAC têm sido relatadas entre 37-48,6%
829 (KOKEMUELLER *et al.*, 2004; COHEN *et al.*, 2004). Muitos estudos demonstram que o
830 estadiamento clínico e o subtipo histológico sólido do CAC são fatores relevantes na
831 determinação do prognóstico (COHEN *et al.*, 2004; PEREZ *et al.*, 2006; KO *et al.*, 2007).
832 Na presente amostra, observou-se quantidade praticamente igual de casos estagiados como
833 doença inicial (I e II) e casos como doença avançada (III e IV). Os tumores em estágio III e
834 IV estiveram significativamente mais associados à menor sobrevida (48,2% foram a óbito).
835 Outro trabalho mostrou mortalidade de 67 meses para estágios III e 41,5 para estágios IV,
836 semelhantes aos presentes resultados (KO *et al.*, 2007). Ressalta-se que no presente estudo,
837 utilizou-se apenas o primeiro estadiamento clínico dado para cada caso, ou seja, aquela
838 classificação dada após o resultado dos exames clínicos e imagiológicos de admissão. Este
839 resultado reforça o uso do sistema de estadiamento como marcador de prognóstico.

840 Neste estudo, o tipo histológico cribriforme e o grau II foram os mais comuns,
841 similarmente aos achados de outros já publicados (PRASAD *et al.*, 2008; COHEN *et al.*,
842 2004; SPIRO, 1997). O impacto no prognóstico, entretanto, tem sido associado aos
843 tumores sólidos, que representaram apenas 1/5 dos casos do presente estudo. Estes tiveram
844 sobrevida menor (44,4%) que os demais tumores (82,5%), a maior agressividade dos
845 tumores sólidos, assim como relatado por outros (KHAN *et al.*, 2001; FORDICE *et al.*,
846 1999; KO *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2006; KOKEMUELLER *et al.*, 2004; FRIEDRICH *et*
847 *al.* 2003). Corroborando com outros autores (KO *et al.*, 2007; RAPIDIS *et al.*, 2005;
848 SUNG *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 1986), também achamos uma relação

849 significativa entre tumores sólidos e metástase. Assim, o impacto do tumor sólido na
850 sobrevida pode ser explicado, em parte, por seu maior potencial metastático.
851 YAMAMOTO *et al.* (1992) avaliaram os casos de CAC primários de sua casuística em
852 comparação com suas respectivas recidivas e metástases. Eles observaram que durante a
853 progressão da doença, os tumores podem evoluir de tubulares, nos estágios precoces, para
854 cribriformes e sólidos, decorrentes de sua progressão para estágios avançados do processo
855 carcinogênico. Possivelmente, esta seria uma provável explicação para os achados de
856 lesões sólidas em pacientes mais velhos, com maiores tempos de queixas.

857 A invasão perineural pôde ser vista em 13 casos deste estudo (26,5%), porém para
858 nenhum destes casos registrou-se recidivas ($p=0,09$). De forma contrária, alguns estudos
859 associaram invasão perineural com aumento de recidivas, e à maior incidência de margens
860 comprometidas (KHAN *et al.*, 2001; KOKEMUELLER *et al.*, 2004; GARDEN *et al.*,
861 1995). Todavia, estes dados mostram-se muito controversos (FORDICE *et al.*, 1999;
862 PEREZ *et al.*, 2006; DARDICK, 1996). Os presentes dados também estão de acordo com
863 outros já relatados, em relação à ausência de associação entre invasão perineural e
864 prognóstico (PEREZ *et al.*, 2006). Da mesma forma, não encontramos relação entre
865 metástases à distância e invasão perineural (RAPIDIS *et al.*, 2005).

866 Outro achado importante deste estudo foi a relação da presença do
867 comprometimento marginal na redução da sobrevida. Outros trabalhos também pontuaram
868 o comprometimento marginal como fator de prognóstico (PEREZ *et al.*, 2006; GARDEN
869 *et al.*, 1995; SUR *et al.*, 1997). SUR *et al.* (1997) encontraram que o *status* da margem
870 cirúrgica tem um valor prognóstico significante, pois dentre seus casos com margem
871 cirúrgica livre de doença, houve um índice de sobrevida de 80% em 10 anos, bem maior
872 que os 26% para os casos com margens positivas. No entanto, outros estudos não

873 confirmam estes achados, ressaltando o uso da radioterapia adjuvante como responsável
874 por quebrar esta tendência (FORDICE *et al.*, 1999; GARDEN *et al.*, 1995). Esta
875 justificativa se aplica aos nossos achados, visto que 75,5% dos casos foram submetidos à
876 radioterapia pós-operatória, e possivelmente por isto não observamos associação entre
877 margens e piora do prognóstico (AVERY *et al.*, 2000; MENDEHALL *et al.*, 2004). Apesar
878 da tentativa de melhorias do controle local da doença, estas não têm sido encaradas como
879 suficientes para evitar evolução metastática, considerando que a metástase à distância
880 ocorre independentemente do tratamento local como se fosse uma doença independente
881 (KOKEMUELLER *et al.*, 2004; GARDEN *et al.*, 1995; KO *et al.*, 2007). Spiro (1997)
882 verificou uma redução das recidivas ao longo dos anos pela adequação relativa do uso da
883 radioterapia, porém sem repercussões significativas nos índices de metástases à distância
884 (SPIRO, 1997).

885 O esvaziamento cervical tem sido indicado apenas para os casos em que se tem
886 algum sinal clínico ou imagiológico que o justifique, em vista do baixo índice de
887 comprometimento metastático nodal (KOKEMUELLER *et al.*, 2004; COHEN *et al.*,
888 2004; KHAN *et al.*, 2001; MENDENHALL *et al.*, 2004; PROKOPAKIS *et al.*, 1999). Dos
889 casos da presente amostra submetidos a esvaziamento cervical, todos apresentaram alguma
890 suspeita clínica ou cirúrgica do envolvimento linfonodal. No entanto, observamos uma
891 taxa de 16,32% de metástase linfonodal, compatível com os dados da literatura que variam
892 entre 9 e 20% (KOKEMUELLER *et al.*, 2004; COHEN *et al.*, 2004; PEREZ *et al.*, 2006;
893 KO *et al.*, 2007). Alguns autores defendem a remoção do linfonodo sentinela para os
894 pacientes com tumores localizados em base de língua e nasofaringe, que são regiões que
895 apresentam abundância em vasos linfáticos (MENDENHALL *et al.*; 2004). Esta
896 associação pode ser virtualmente observada no presente estudo, pois houve uma maior

897 frequência de metástases regionais para os tumores de glândulas submandibulares, que
898 também são regiões ricas em vasos linfáticos.

899 Quanto às metástases à distância, parece ainda não existir informações terapêuticas
900 preventivas eficientes a não ser o diagnóstico precoce, visto que as metástases têm sido
901 observadas como microscópicas precocemente no crescimento tumoral primário (SUNG *et*
902 *al.*, 2003; RAPIDIS *et al.*, 2005). O tempo necessário para o diagnóstico da metástase gira
903 em torno de 30 meses, variando de 1-109 meses após a terapia inicial (COHEN *et al.*,
904 2004; KO *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2006). De acordo com PERES *et al.* (2006), 19% a
905 52% dos casos de CAC estão associados a metástases à distância. Em nossa casuística, os
906 casos metastáticos como um todo representaram 28,6%, e assim como em outras
907 casuísticas, os pulmões foram mais comumente afetados (COHEN *et al.*, 2004; PEREZ *et*
908 *al.*, 2006; FORDICE *et al.*, 1999). Outros sítios como fígado e ossos são também
909 acometidos com certa frequência, diferentemente dos nossos achados em que foram
910 identificadas na minoria dos casos. Ressalta-se aqui, que todos os pacientes em tratamento
911 de tumores malignos de glândulas salivares do INCA passam por exames de controle
912 realizados bimestralmente no primeiro ano, quadrimestralmente no segundo ano,
913 semestralmente no terceiro ano e anualmente a partir do quarto ano (Conduas do
914 INCA/MS. Revista Brasileira de Cancerologia, 2002).

915 Dados sobre metástases à distância para diferentes regiões do corpo podem,
916 entretanto, estar subestimados na literatura, dado que as mesmas podem permanecer
917 silenciosas, não sendo detectadas clinicamente durante a vida do paciente (VAN DER
918 WAL *et al.*, 2002). Os pulmões são os órgãos mais comumente afetados. Os trabalhos
919 relatam que os pacientes com metástases unicamente pulmonares vão a óbito em média um
920 ano após aqueles com metástases em outros órgãos, considerando mais agressivos

921 especialmente os tumores com metástases ósseas (VAN DER WAL *et al.*, 2002). Também
922 foi observada maior frequência de metástase pulmonar em nosso estudo, porém,
923 comumente associada a outras metástases, sendo que apenas aqueles casos de metástase
924 exclusivamente pulmonar mostraram uma sobrevida relativamente prolongada.

925 Dentre os fatores clinicopatológicos relacionados ao prognóstico, alguns estariam
926 diretamente associados à presença de metástases, a saber: o tamanho tumoral entre T3 e T4
927 (COHEN *et al.*, 2004; SPIRO, 1997); tempo de sintomas (NASCIMENTO *et al.*, 1986);
928 subtipo histológico sólido (SUNG *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2001; MATSUBA *et al.*,
929 1986; PEREZ *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 1986); alto grau histológico (RAPIDIS
930 *et al.*, 2005); invasão perineural (COHEN *et al.*, 2004; RAPIDIS *et al.*, 2005); recidiva
931 local (COHEN *et al.*, 2004; SPIRO, 1997). Porém, permanecem ainda controvérsias em
932 relação ao seu valor preditivo (SPIRO, 1997; SUNG *et al.*, 2003; VAN DER WAL *et al.*,
933 2002; MATSUBA *et al.*, 1986; RAPIDIS *et al.*, 2005). No presente estudo, maior
934 dimensão tumoral, envolvimento de glândulas maiores, o estágio clínico avançado e
935 subtipo sólido dos tumores, representaram dados que estiveram relacionados ao
936 comportamento metastático tumoral. O envolvimento linfonodal também parece predispor
937 a metástases à distância (SPIRO, 1997). Realmente, também observamos uma maior
938 incidência de metástases à distância para os casos que tiveram envolvimento regional,
939 embora a análise estatística ficasse prejudicada em função do tamanho da amostra.

940 No presente estudo, optou-se por dar atenção especial aos casos metastáticos de
941 CAC considerando a cronologia das metástases, sejam elas regionais ou à distância.
942 Nossos achados, dentro das condições do estudo, mostram que os casos PMp são mais
943 agressivos, pois destes, apenas 1(11,1%) não foi a óbito durante o período de

944 acompanhamento dos pacientes; por outro lado, quatro (80,8%) dos PMt permaneceram
945 vivos.

946 Alguns estudos identificaram diferenças entre casos de CAC segundo seu
947 comportamento metastático. Apesar disto, ainda não é possível perceber adequadamente
948 estas potencialidades, e assim identificá-las previamente ao evento. Sabe-se que há uma
949 queda súbita de sobrevida após o diagnóstico da metástase, sendo que a sobrevida global
950 dos casos altera-se de 12,8 anos para entre 21,2 meses a 4,9 anos (KHAN *et al.*, 2001; KO
951 *et al.*, 2007). A OMS (BARNES *et al.*, 2005) também reconhece o peso da metástase na
952 sobrevida, relatando que apenas 20% dos pacientes com metástases sobrevivem os
953 primeiros cinco anos. Os achados de SUNG *et al.* (2003) reforçam esta percepção,
954 mostrando que 76% dos pacientes de sua amostra de pacientes livres de metástases,
955 permaneceram vivos após 10 anos de acompanhamento, enquanto mais da metade dos
956 metastáticos foram a óbito. Ainda, 54% dos pacientes da amostra estudada por SPIRO
957 (1997) foram a óbito após três anos do diagnóstico das metástases. Baseando-se nestas
958 observações, pode-se concluir que os casos que já se apresentam com metástase logo à
959 primeira consulta, apresentam redução na sobrevida, tornando necessário acompanhamento
960 clínico mais estreito. A tomografia computadorizada e a ressonância magnética, bem como
961 radiografias convencionais, são indicadas para os exames de controle local e à distância da
962 doença (KOKEMUELLER *et al.*, 2004).

963

7.2 Imunomarcção da MT

964 O desejo de fazer prognóstico, ou seja, “fazer previsões”, é algo inerente a
965 humanidade, o que explica a popularidade de físicos e astrólogos. O diagnóstico, o
966 prognóstico e o tratamento são os três elementos essenciais da arte da medicina, sendo que
967 o prognóstico é a mais antiga delas, cujo ponto chave é a capacidade de distinguir
968 características da doença que determinarão cursos clínicos distintos (GOSPODAROWICS
969 e O’SULLIVAN, 2003). Muitos pesquisadores procuraram avaliar se a expressão da MT
970 tem alguma relação com o comportamento biológico de tumores de diversas origens. Os
971 resultados são frequentemente favoráveis à utilização da MT como marcador de
972 prognóstico (ALVES *et al.*, 2007; SUNARDHY-WIDYAPUTRA *et al.*, 1995; CARDOSO
973 *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2008; YAP *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2001; JANSSEN *et al.*, 2000;
974 MITANI *et al.*, 2008; JAYASURYA *et al.*, 2000; FERRARIO *et al.*, 2008; SCHMID *et*
975 *al.*, 2008; KONTOZOGLOU *et al.*, 1989; CHIN *et al.*, 1993; MOUSSA *et al.*, 1997; WEI
976 *et al.*, 2008; TAO *et al.*, 2007; DATTA *et al.*, 2007; MIDIDODDI *et al.* 1996; NGUYEN
977 *et al.*, 2000; SOMJI *et al.*, 2001; IOACHIM *et al.* 2001).

978 O presente estudo representa a primeira tentativa de investigar a relação da
979 expressão da MT com comportamento biológico do CAC, incluindo metástases e
980 prognóstico. Diferenças de expressão de MT foram constantemente observadas entre PM e
981 PNM. A maioria dos casos PM de CAC mostraram expressão acima de 50%, enquanto isto
982 se deu em menos da metade dos casos. Além disso, 37% dos PNM mostraram marcação
983 fraca, contra apenas 14% dos PM. De forma interessante, todos os valores baixos para cada
984 variável, sempre pertenceram a PNM, da mesma forma que os valores mais altos sempre
985 foram PM. O *Quickscore* foi significativamente diferente entre os dois grupos. Esta

986 fórmula considera na avaliação da expressão de MT simultaneamente a intensidade e a
987 proporção das células marcadas, e tem sido usado como um método eficaz e rápido para
988 avaliar outros tipos tumorais (DETRE *et al.*, 1995; GALLICCHIO *et al.*, 2005).
989 YAMASAKI *et al.* (2006) utilizaram o *Quickscore* para avaliar a expressão da MT em
990 carcinomas de bexiga. Eles encontraram correlação significativa entre alto escore de
991 expressão da MT e sobrevida global, doença-específica, e ainda progressão livre de doença
992 (YAMASAKI *et al.*, 2006). Utilizando técnica semelhante de multiplicação da intensidade
993 pela proporção de células marcadas, MCCLUGAGGE *et al.* (1999) mostraram associação
994 entre MT e alto grau de carcinomas de endométrio (MCCLUGGAGE *et al.*, 1999).

995 Observou-se neste estudo uma frequência maior de positividade nuclear dentre os
996 casos PM, considerando ainda que nenhum caso de marcação citoplasmática foi observado
997 no grupo PM. Muitos estudos demonstram tanto marcação citoplasmática como nuclear
998 dentre os casos, associando ambas com grau tumoral, recidivas e queda de sobrevida em
999 neoplasias renais, mamárias, pulmonares, nasofaríngeas, ovarianas, testiculares, de bexiga
1000 urinária e inclusive de glândulas salivares (CHERIAN *et al.*, 2003). Entretanto,
1001 conceitualmente, para células em repouso (G0), a MT é uma proteína citosólica, podendo
1002 ser translocada transientemente ao núcleo durante a proliferação e diferenciação
1003 (NARTEY *et al.*, 1987), reforçando o significado de sua associação com estados
1004 proliferativos, e, conseqüentemente, ao comportamento agressivo.

1005 Em um estudo recente foi demonstrado o valor prognóstico da expressão nuclear da
1006 MT, que esteve correlacionada a uma deterioração do prognóstico (CARDOSO *et al.*,
1007 2009). Estes pesquisadores demonstraram uma associação da MT com a expressão de p53,
1008 uma proteína que é estabilizada por Zn e que está envolvida na promoção de mitose
1009 (MEPLAN *et al.*, 2000; SHIMODA *et al.*, 2003). Tendo em vista o papel da MT na

1010 homeostasia do Zn, verificou-se que a MT pode exercer atividade quelante do Zn que
1011 levaria a uma conformação atípica da p53, causando instabilidade e induzindo a adoção de
1012 um fenótipo imunológico idêntico àquele de muitas formas mutadas da p53, onde as
1013 proteínas perdem função e se agregam a outras na forma nativa, assim impedindo sua
1014 atividade antitumoral (BUTLER e LOH, 2003; RAINWATER, 1995; CHERIAN *et al.*,
1015 2003). Paralelamente, existem outros fatores envolvidos na multiplicação celular e que
1016 contém domínios de dedos de Zn, assim podendo abrogar a atividade de multiplicação
1017 celular por fatores tais como receptor de estrógeno e o fator nuclear κ (THEOCHARIS *et*
1018 *al.*, 2004; THIRUMOORTHY *et al.*, 2007; CHERIAN *et al.*, 2003). De fato, a MT também
1019 tem sido apontada como um marcador promissor de prognóstico devido à sua diferencial
1020 habilidade de interagir com metais e outras moléculas iônicas assim influenciando a
1021 homeostasia metálica, mecanismos de resistência e defesa celular, mecanismos
1022 antioxidantes e angiogênese (NORDBERG e NORDBERG, 2009; NIELSEN *et al.*, 2007;
1023 THEOCHARIS *et al.*, 2004; PENKOWA, 2006; NIELSEN *et al.*, 2007). Nosso trabalho
1024 particularmente mostra sinais de que a MT possa estar envolvida no comportamento
1025 metastático do CAC, sendo estes sinais mais evidentes para destacar os casos metastáticos
1026 mais agressivos (PMp).

1027 Comparando-se o padrão de expressão da MT para os casos PMp, PMt e PNM, é
1028 possível observar que os valores se distanciam entre PMp e PMt, sendo mais altos para o
1029 primeiro, enquanto se aproximam entre PMt e PNM. Nestes casos, valores significantes de
1030 p foram obtidos avaliando-se a média dos escores, a intensidade de marcação e o índice
1031 (escore) do *Quickscore* para os casos PMp, comparativamente aos casos PNM ($p=0,0394$;
1032 $p=0,0481$ e $p=0,0277$, respectivamente). Estes resultados reforçam a percepção da
1033 utilização da MT como marcadora de agressividade tumoral, visto que casos cujas
1034 metástases são emitidas em uma fase precoce revelam um padrão de progressão tumoral

1035 avançado (SUNG *et al.*, 2003; RAPIDIS *et al.*, 2005). Reforça esta idéia, o fato de os casos
1036 PMP apresentarem sobrevida extremamente baixa, com evolução para óbito em curto
1037 período de tempo. Estes achados convergem com aqueles observados para carcinomas de
1038 mama. Alguns trabalhos mostraram que casos que recidivaram e casos metastáticos de
1039 carcinomas de mama marcam MT intensamente em comparação com os demais,
1040 confirmando a importância da MT durante o comportamento tumoral mais agressivo que
1041 culmina em pior sobrevida (SCHMID *et al.*, 1993; HAERSLEV *et al.*, 1995). Esta
1042 associação da expressão de MT com a progressão tumoral é corroborada pelos achados de
1043 HAERSLEV *et al.* (1994), ao demonstrarem que as metástases tumorais dos carcinomas de
1044 mama possuem padrão de marcação distinto dos tumores primários, cujas marcações foram
1045 menores em toda amostra (HAERSLEV *et al.*, 1994).

1046 A expressão de MT também tem sido correlacionada ao potencial metastático
1047 tumoral de carcinomas originários de vários outros tecidos. SZELACHOWSKA *et al.*
1048 (2009) mostraram marcação significativamente maior de MT em tumores primários
1049 metastáticos orais em comparação com os não metastáticos. Além disso, demonstraram
1050 que a marcação citoplasmática predominou nos tumores primários em comparação com
1051 suas respectivas metástases, sugerindo a transição nuclear da MT durante a progressão
1052 tumoral para um fenótipo metastático (SZELACHOWSKA *et al.*, 2009). A relação entre a
1053 alta frequência de metástases tanto linfonodais como à distância e a superexpressão MT foi
1054 observada tanto por imunohistoquímica quanto em PCR para carcinomas esofágicos
1055 (HISHIKAWA *et al.*, 1999). O mesmo foi relatado para carcinoma gástrico, onde os
1056 autores ainda identificaram maior expressão da MT quanto maior a quantidade de nodos
1057 metastáticos (GALIZIA *et al.*, 2006). LI *et al.* (2005) relataram que por meio de PCR
1058 obtém-se associação entre MT e metástase linfonodal e metástase à distância para
1059 carcinomas de mucosa coloretal (LI *et al.*, 2005).

1060 A observação de maior intensidade de marcação de MT nos tumores menos
1061 diferenciados reforça a percepção da MT como marcadora de progressão tumoral. Assim,
1062 como relatado por ALVES *et al.* (2007), a expressão de MT em CAC sólidos foi
1063 marcadamente elevada, comparativamente aos outros subtipos (ALVES *et al.*, 2007). O
1064 fato da maior expressão da MT estar relacionado com tumores menos diferenciados, ou de
1065 pior grau histológico é quase unânime para as neoplasias malignas de mama (FRESNO *et*
1066 *al.*, 1993; HAERSLEV *et al.*, 1995; EL SHARKAWY e FARRAG, 2008; IOACHIM *et*
1067 *al.*, 1999; JIN *et al.*, 2001; YAP *et al.*, 2009; SUTOH *et al.*, 2000). Da mesma forma,
1068 outros trabalhos têm demonstrado resultados compatíveis para tumores de origem
1069 ectodérmica (CARDOSO *et al.*, 2002; DUTSCH-WICHEREK *et al.*, 2008), mesodérmica
1070 (WEI *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2000) e endodérmica (OFNER *et al.*, 1994; EID *et al.*,
1071 1998).

1072 O subtipo sólido representou mais de 1/3 dos PM. Este fato nos remete a discutir se
1073 a maior expressão de MT no grupo de metastáticos foi devido à presença dos tumores
1074 sólidos neste grupo e não especificamente à sua associação com progressão tumoral e
1075 mecanismos envolvidos na geração das metástases. Para investigar tal possibilidade,
1076 avaliamos separadamente os casos sólidos do grupo PM em comparação com os casos
1077 sólidos do grupo PNM. O escore geral e o *Quickscore*, assim como intensidade da
1078 marcação da MT, tanto semiquantitativa como quantitativa, estiveram significativamente
1079 aumentados nos tumores sólidos PM. Este resultado é muito importante do ponto de vista
1080 em que evidencia um comportamento heterogêneo dentro da variante sólida, e ainda indica
1081 que uma maior atenção deve ser dada ao uso da MT para determinação do prognóstico.
1082 Nós mostramos que o pior prognóstico se deu quando combinados metástase e subtipo
1083 sólido, porém demonstramos que a metástase muitas vezes não se apresenta em curto
1084 prazo. Assim, uma alta marcação da MT nos tumores sólidos pode sugerir uma maior

1085 investigação clínica para a identificação da metástase, considerando ainda que sua maior
1086 expressão também se relacione aos tumores de metástase precoce (PMp) e que algumas
1087 vezes existem indícios da presença da metástase nos exames radiográficos de tórax e a
1088 mesma pode ser confundida com alterações corriqueiras, assim sendo subestimadas (VAN
1089 DER WAL *et al.*, 2002).

1090 Observou-se nos carcinomas de mama uma maior expressão de MT nas regiões de
1091 pleomorfismo nuclear severo e maior quantidade de mitoses (HAERSLEV *et al.*, 1995;
1092 ZHANG *et al.*, 2000; FRESNO *et al.*, 1993). Além disso, para os carcinomas ductais de
1093 mama as marcações intratumorais tendem a intensificar-se junto ao componente invasivo
1094 (SCHMID *et al.*, 1993). Esta marcação também se destaca de forma nítida nas regiões
1095 intratumorais de carcinoma *in situ* (IOACHIM *et al.*, 1999; GALLICCHIO *et al.*, 2005).
1096 Neste sentido a MT parece estar envolvida tanto no processo de carcinogênese como na
1097 progressão tumoral. Este dado pôde ser visto para os carcinomas de mucosa oral, onde os
1098 autores mostram que a ativação de MT inicia um papel importante na conversão de uma
1099 lesão oral potencialmente maligna (leucoplasia) em um carcinoma, desde os estágios
1100 iniciais (PONTES *et al.*, 2009). A transição metaplasia-displasia-adenocarcinoma também
1101 se associou ao aumento gradual de MT em carcinomas de esôfago (DUTSCH-
1102 WICHEREK *et al.*, 2008).

1103 De fato, a maioria das pesquisas de expressão da MT ainda é com tumores
1104 mamários, mostrando que a superexpressão da proteína segrega casos de sobrevida
1105 (FRESNO *et al.*, 1993; HAERSLEV *et al.*, 1995; OYAMA *et al.*, 1996; SENS *et al.*,
1106 2001). CARDOSO *et al.* (2002) mostraram que os carcinomas orais com índice de
1107 marcação superior a 76% tiveram prognóstico significativamente pior do que aquelas com
1108 menor expressão (CARDOSO *et al.*, 2002). Os pacientes que portavam tumores de esôfago

1109 negativos para MT tiveram sobrevida significativamente maior (DUTSCH-WICHEREK
1110 *et al.*, 2008). No presente trabalho, observou-se que um escore de 2,7 segregou os casos em
1111 grupos com sobrevida estatisticamente diferentes, pois os casos marcados com valores
1112 acima de 2,7 tiveram pior prognóstico. Este valor representa o valor médio de marcação
1113 considerando os casos PMp, o que mais uma vez salienta o potencial de agressividade
1114 destes casos e o poder prognóstico da MT.

1115 Neste ponto, aspectos da expressão da MT na glândula salivar normal merecem ser
1116 considerados. A MT tem sido também referida como uma marcadora de células
1117 mioepiteliais tanto em glândulas salivares (SUNARDHI-WIDYAPUTRA *et al.*, 1995;
1118 MURAMATSU *et al.*, 2000; PRASAD *et al.*, 2007) como em glândulas mamárias (Jin *et*
1119 *al.*, 2001). Um trabalho avaliando a expressão MT em células mioepiteliais de glândulas
1120 mamárias relatou que a mesma pode ser decorrente da sua habilidade na produção de
1121 fatores de crescimento como TGF- α e bFGF e grande quantia de secreções parácrinas (JIN
1122 *et al.*, 2001). Nesta linha, os autores associam a expressão da MT em células ductais às
1123 mudanças intracelulares decorrentes da transformação neoplásica, onde as células ductais
1124 podem produzir de forma ectópica o TGF- α e bFGF. Neste sentido, a expressão da MT em
1125 neoplasias de glândulas salivares ou mamárias poderia significar tanto um sinal de maior
1126 agressividade celular, considerando a influência da MT em diversos fatores que favorecem
1127 a multiplicação celular, como já discutido anteriormente, ou reflexo de sua expressão do
1128 fenótipo mioepitelial. De fato, na amostra do presente estudo, observou-se que a MT
1129 expressava-se em células de morfologia mioepitelial. Assim, muitos casos de expressavam
1130 padrão de marcação em mosaico. Possivelmente por uma alternância de células epiteliais e
1131 células mioepiteliais. Entretanto, CARDOSO *et al.* (2009) sugerem que este padrão
1132 representa diferenças fenotípicas dentre as células neoplásicas, adquiridas durante a
1133 progressão tumoral (CARDOSO *et al.*, 2009). Considerando que os tumores primários

1134 apresentam marcação menor que a metástase (HAERSLEV *et al.*, 1994), e ainda os
1135 resultados do nosso estudo e o de outros autores demonstrando associação da MT com
1136 metástase (HAERSLEV *et al.*, 1994; SZELACHOWSKA *et al.*, 2009; HISHIKAWA *et*
1137 *al.*, 1999; GALIZIA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2005), faz-se necessário um estudo a fim de
1138 identificar o padrão específico de MT para as células mioepiteliais, a fim de evitar falsas
1139 interpretações com relação à MT em glândulas salivares e mamárias. Alguns autores
1140 iniciaram esta investigação da expressão gênica funcional, mostrando que enquanto os
1141 genes MT-2A e MT-1E estavam ativos em ambas as células, o MT-1G e o MT-1F foram
1142 significantes apenas em células mioepiteliais (TAI *et al.*, 2003; JIN e VINCENT, 2001;
1143 JIN *et al.*, 2000). Ainda são necessários muitos estudos para avançarmos neste
1144 conhecimento.

1145 Um trabalho recente avaliou vários marcadores de células mioepiteliais em CAC e
1146 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau, demonstrando esta relação dentre marcadores
1147 específicos mioepiteliais e MT. Chama atenção, no entanto, o fato de que os casos de CAC
1148 sólidos da amostra destes autores mostraram decréscimo de expressão de todos os
1149 marcadores (PRASAD *et al.*, 2008). Diferentemente, os casos sólidos da presente amostra
1150 mostraram os maiores índices de marcação para MT, fato que também foi demonstrado por
1151 ALVES *et al* 2007. Porém também encontramos desencontro com o dado de ALVES *et al.*
1152 (2007) quanto à presença de marcação nuclear nos tumores sólidos, pois os autores
1153 relataram uma transição para citoplasma ao invés da transição nuclear detectada por nós.
1154 Tais discordâncias servem como estímulo ao uso do PCR para determinar a expressão da
1155 MT no CAC, a fim de verificar quais os genes estão especificamente envolvidos na
1156 agressividade tumoral. Por exemplo, para carcinomas de mama, sabe-se que o MT-2A está
1157 relacionado à atividade proliferativa enquanto o MT-1E se encontra mais envolvido com
1158 potencial de invasividade por influenciar a expressão de receptor de estrógeno (ABDEL-

1159 **MAGEED e AGRAWAL, 1997; JIN *et al.*, 2000**). Uma avaliação com este propósito
1160 também poderá ajudar a separar os casos de CAC não metastáticos e menos agressivos
1161 que, no entanto, superexpressam MT. A criação de sondas para análises por FISH também
1162 poderá fornecer informações interessantes no sentido de identificar o gene ativo e em qual
1163 célula está expresso. Deve-se lembrar que a literatura pertinente descreve que anticorpo
1164 E9, utilizado neste experimento, reage indistintamente para MT-1 e MT-2, descartando a
1165 presença de MT-3 e MT-4. Desta forma, precisa-se também avaliar o significado das
1166 outras isorformas em estudos subsequentes.

1167 Finalmente, foi demonstrado que a desregulação da MT com oligonucleotídeos
1168 antisenso induz paralisação da atividade proliferativa e apoptose nas células cancerígenas
1169 mamárias que superexpressavam MT (**ABDEL-MAGEED e AGRAWAL, 1997**). Uma
1170 análise do ciclo celular revelou um aumento de apoptose nestas células com atividade de
1171 transcrição de MT prejudicada após exposição à doxorrubicina. O que implica dizer que a
1172 MT pode atrapalhar mecanismos de apoptose (**YAP *et al.*, 2009**). Desta forma, os estudos
1173 de expressão de MT e sua associação frequente com o pior prognóstico levam a crer que a
1174 MT representa um alvo promissor para a terapêutica antitumoral.

Conclusão

8. Conclusão

1175 1. Os CAC estudados na presente amostra, em geral, mostraram dados
1176 clinicopatológicos semelhantes àqueles observados na literatura quanto à idade, sexo dos
1177 pacientes acometidos, localização preferencial das lesões, sintomatologia, padrões de
1178 estadiamento no diagnóstico, taxas de recidiva, metástases e prognóstico. Acometeu
1179 pacientes na 6ª década de vida, leucodermas, afetando mais frequentemente palato e
1180 glândulas submandibulares, manifestando-se como aumento de volume, doloroso em
1181 aproximadamente 1/3 dos casos, sendo diagnosticados com maior frequência como doença
1182 avançada (estágios III e IV). O subtipo histológico mais frequente foi o cribriforme,
1183 predominando tumores com grau histológico de malignidade moderado. Metástases foram
1184 observadas em aproximadamente 1/4 dos tumores, sendo mais frequentes em órgãos
1185 distantes como pulmão.

1186 2. Metástases foram significativamente associadas à uma redução na sobrevida dos
1187 pacientes, mormente quando diagnosticadas na primeira consulta do paciente. A presença
1188 de tumores maiores foi favorecedor de metástases. Estágio avançado da doença e subtipo
1189 histológico sólido foram fatores associados ao pior prognóstico.

1190 3. A MT foi expressa em todos os subtipos de CAC, preferencialmente nas células
1191 abluminais das estruturas ductiformes, intensificando-se nos casos sólidos, nos quais há
1192 menor diferenciação e menor proporção de estruturas ductais.

1193 4. Dentro das condições do presente estudo, a expressão da MT baseada no método
1194 do *Quickscore* (produto do número de células marcadas pela intensidade predominante) foi
1195 associada a metástases. Da mesma forma, a marcação mais intensa de MT foi associada a

1196 menor índice de sobrevida. Similarmente, tumores primários com metástases precoces
1197 apresentaram altos índices de MT, maiores que nos metastáticos tardios.

1198 6. A MT apresenta-se como um potencial marcador de comportamento biológico
1199 para o CAC.

9. Referências

- 1200 1. ABDEL-MAGEED, A. B., E AGRAWAL, K. C. Antisense down-regulation of
1201 metallothionein induces growth arrest and apoptosis in human breast carcinoma
1202 cells. **Cancer Gene Ther**, v.4(3), p. 199-207, 1997.
- 1203 2. ADHIKARI, A., E IWAKUMA, T. Mutant p53 gain of oncogenic function: in vivo
1204 evidence, mechanism of action and its clinical implications. **Fukuoka Igaku**
1205 **Zasshi**, v. 100(6), p. 217-228, 2009.
- 1206 3. ALEXANDER, S. Metastatic adenoid cystic carcinoma of salivary glands: case
1207 reports and review of the literature. **Cancer Control**, v. 3, p. 336-342, 1996.
- 1208 4. ALSAFADI, S., TOURPIN, S., ANDRÉ, F., VASSAL, G., E AHOMADEGBE, J.
1209 P53 family: at the crossroads in cancer therapy. **Curr Med Chem**, v. 16(32), p.
1210 4328-4344, 2009.
- 1211 5. ALVES, S. M., CARDOSO, S. V., DE FÁTIMA BERNARDES, V., MACHADO,
1212 V. C., MESQUITA, R. A., VIEIRA DO CARMO, M. A., ET AL..
1213 Metallothionein immunostaining in adenoid cystic carcinomas of the salivary
1214 glands. **Oral oncology**, v. 43(3), p. 252-256, 2007.
- 1215 6. AVERY, C. M., MOODY, A. B., MCKINNA, F. E., TAYLOR, J., HENK, J. M.,
1216 LANGDON, J. D., ET AL. Combined treatment of adenoid cystic carcinoma of
1217 the salivary glands. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 29(4), 277-279, 2000.
- 1218 7. BARNES, L., EVENSON, J., REICHAERT, P., E SIDRANSKY, D. (2005). *World*
1219 *Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head*
1220 *and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press.
- 1221 8. BARRETT, A. W., E SPEIGHT, P. M. Perineural invasion in adenoid cystic
1222 carcinoma of the salivary glands: a valid prognostic indicator? **Oral oncol**, v.
1223 45(11), p. 936-940, 2009.
- 1224 9. BAY, B., JIN, R., HUANG, J., E TAN, P. Metallothionein as a prognostic
1225 biomarker in breast cancer. **Exp Biol Med**, v. 231(9), p. 1516-1521, 2006.
- 1226 10. BIER, B., DOUGLAS-JONES, A., TOTSCH, M., DOCKHORN-DWORNICZAK,
1227 B., BOCKER, W., JASANI, B., ET AL. Immunohistochemical demonstration of
1228 metallothionein in normal human breast tissue and benign and malignant breast
1229 lesions. **Breast Cancer Res Treat**, v. 30(3), p. 213-221, 1994.
- 1230 11. BOUKHERIS, H., CURTIS, R., LAND, C., E DORES, G. Incidence of carcinoma
1231 of the major salivary glands according to the WHO classification, 1992 to 2006:
1232 a population-based study in the United States. **Cancer Epidemiol Biomarkers**
1233 **Prev**, v. 18(11), p. 2899-2906, 2009.
- 1234 12. BRAHIMI-HORN, M., CHICHE, J., E POUYSSÉGUR, J. Hipoxia and cancer. **J**
1235 **Mol Med**, v. 85(12), p. 1301-1307, 2007.
- 1236 13. BREMNER, I. Manifestations of copper excess. **Am J Clin Nutr**, v. 67(5 Suppl),
1237 p. 1069S-1073S, 1998.
- 1238 14. BUCHNER, A., MERRELL, P. W., E CARPENTER, W. M. Relative frequency of
1239 intra-oral minor salivary gland tumors: a study of 380 cases from northern
1240 California and comparison to reports from other parts of the world. **J Oral**
1241 **Pathol Med**, v. 36(4), p. 207-214, 2007.
- 1242 15. BUTLER, J. S., E LOH, S. N. Structure, function, and aggregation of the zinc-free
1243 form of the p53 DNA binding domain. **Biochemistry**, v. 42(8), p. 2396-403,
1244 2003.

- 1245 16. BUTLER, J. S., E LOH, S. N. Structure, function, and aggregation of the zinc-free
1246 form of the p53 DNA binding domain. **Biochemistry**, v. 42(8), p. 2396-23403,
1247 2003.
- 1248 17. CAI, L., WANG, Y., ZHOU, G., CHEN, T., SONG, Y., LI, X., ET AL. Attenuation
1249 by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial
1250 oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. **J Am Coll**
1251 **Cardiol**, v. 48(8), p. 1688-1697, 2006.
- 1252 18. CARDOSO, S. V., BARBOSA, H. M., CANDELLORI, I. M., LOYOLA, A. M., E
1253 AGUIAR, M. C. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell
1254 carcinoma. **Virchows Archiv**, v. 441(2), p. 174-178, 2002.
- 1255 19. CARDOSO, S. V., SILVEIRA-JÚNIOR, J., DE CARVALHO MACHADO, V.,
1256 DE-PAULA, A., LOYOLA, A. M., AGUIAR, M. C., ET AL. Expression of
1257 metallothionein and p53 antigens are correlated in oral squamous cell carcinoma.
1258 **Anticancer Res**, v. 29(4), p. 1189-1193, 2009.
- 1259 20. CHAN, H. M., E CHERIAN, M. G. Ontogenic changes in hepatic metallothionein
1260 isoforms in prenatal and newborn rats. **Biochem Cell Biol**, v. 71(3-4), p. 133-
1261 1340, 1993.
- 1262 21. CHAUVIN, P., CHERIAN, M. G., WYSOCKI, G., E PRINGLE, G. A comparison
1263 of metallothionein expression in human normal and neoplastic salivary gland
1264 tissue using immunohistochemistry. **Toxicologist**, v. 12, p. 379, 1992.
- 1265 22. CHERIAN, M. G., E APOSTOLOVA, M. Nuclear localization of metallothionein
1266 during cell proliferation and differentiation. **Cell Mol Biol**, v. 46(2), p. 347-356,
1267 2000.
- 1268 23. CHERIAN, M. G., E KANG, Y. Metallothionein and liver cell regeneration. **Exp**
1269 **Biol Med**, v. 231(2), p. 138-144, 2006.
- 1270 24. CHERIAN, M. G., JAYASURYA, A., E BAY, B. H. Metallothioneins in human
1271 tumors and potential roles in carcinogenesis. **Mutat Res**, v.533, 201-209, 2003.
- 1272 25. CHHIENG, D., E PAULINO, A. Basaloid tumors of the salivary glands. **Ann**
1273 **Diagn Pathol**, v.6, p.364-372, 2002.
- 1274 26. CHIN, J., BANERJEE, D., KADHIN, S., KONTOZOGLOU, T., CHAUVIN, P.,
1275 CHERIAN, M. G., ET AL. Metallothionein in testicular germ cell tumors and
1276 drug resistance. Clinical correlation. **Cancer**, v.72(10), p.3019-3035, 1993.
- 1277 27. COHEN, A. N., DAMROSE, E. J., HUANG, R. Y., NELSON, S. D.,
1278 BLACKWELL, K. E., CALCATERRA, T. C., ET AL. Adenoid cystic
1279 carcinoma of the submandibular gland: a 35-year review. **Otolaryngol head**
1280 **neck surg**, v.131(6), p.994-1000, 2004.
- 1281 28. CONLEY, J., E DINGMAN, D. Adenoid cystic carcinoma in the head and neck
1282 (cylindroma). **Arch Otolaryngol**, v.100, p.81-90, 1974.
- 1283 29. COYLE, P., PHILCOX, J. C., CAREY, L. C., E ROFE, A. M. Cellular and
1284 Molecular Life Sciences Metallothionein : The multipurpose protein. **Cell Mol**
1285 **Life Sci** v.59, p.627-647, 2002.
- 1286 30. DARDICK, I. (1996). *Salivary gland tumor pathology*. Tokyo: IGAKU-SHOIN
1287 Medical Publishers.
- 1288 31. DAVIS, S. R., E COUSINS, R. J. Recent Advances in Nutritional Sciences
1289 Metallothionein Expression in Animals : A Physiological Perspective on
1290 Function I. **Experientia**, v.1(21), p.1085-1088, 2000.
- 1291 32. DETRE, S., SACLANI JOTTI, G., E DOWSETT, M. A "quickscore" method for
1292 immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in
1293 breast carcinomas. **J Clin Pathol**, v.48(9), p.876-878. 1995.

- 1294 33. DUFNER-BEATTIE, J., LANGMADE, S. J., WANG, F., EIDE, D., ANDREWS,
1295 G. K., BIOL, D. J., ET AL. Structure , Function , and Regulation of a Subfamily
1296 of Mouse Zinc Transporter Genes. **Biochemistry**, v.278(50), p.50142-50150,
1297 2003.
- 1298 34. DUTSCH-WICHEREK, M., SIKORA, J., E TOMASZEWSKA, R. The possible
1299 biological role of metallothionein in apoptosis. **Front Biosci**, v.1(13), p.4029-
1300 4038, 2008.
- 1301 35. EID, H., GECZI, L., BODROGI, I., INSTITORIS, E., E BAK, M. Do
1302 metallothioneins affect the response to treatment in testis cancers? **J Cancer Res**
1303 **Clin Oncol**, v.124, p.31-36, 1998.
- 1304 36. EL SHARKAWY, S., E FARRAG, A. Mean nuclear area and metallothionein
1305 expression in ductal breast tumors: correlation with estrogen receptor status.
1306 **App Immunohistochem Mol Morphol**, v.16(2), p.108-112, 2008.
- 1307 37. ELLIS, G., AUCLAIR, P., E GNEPP, D. (1991). *Surgical pathology of the salivary*
1308 *glands*. Philadelphia: WB Sanders.
- 1309 38. ENEROTH, C. Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular gland,
1310 and the palate region. **Cancer**, v.6(27), p.1415-1418, 1971.
- 1311 39. EVESON, J. E CAWSON, R. Tumours of the minor (oropharyngeal) salivary
1312 glands: a demographic study of 336 cases. **J Oral Pathol**, v.14(6), p.500-509,
1313 1985.
- 1314 40. FIGUEIREDO, C., AMARAL, R., PINHO, M., FREITAS, J., ROLIM, M.,
1315 SOUZA, L., ET AL. Estudo epidemiológico de tumores benignos e malignos de
1316 glândula salivar – Análise de 196 casos em Natal (RN). **Rev ABO**, v.6(8),
1317 p.343-348, 2000.
- 1318 41. FORDICE, J., KERSHAW, W., EL-NAGGAR, A., E GOEPFERT, H. Adenoid
1319 Cystic Carcinoma of the Head and Neck Predictors of Morbidity and Mortality.
1320 **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.125, p.149-152, 1999.
- 1321 42. FRASSINETTI, S., BRONZETTI, G., CALTAVUTURO, L., CINI, M., E CROCE,
1322 C. D. The role of zinc in life: a review. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**,
1323 v.25(3), p.597-610, 2006.
- 1324 43. FREITAS, V. M., SCHEREMETA, B., HOFFMAN, M. P., E JAEGER, R. G.
1325 Laminin-1 and SIKVAV a laminin-1-derived peptide, regulate the morphology
1326 and protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell
1327 line. **Oral Oncol**, v.40(5), p.483-489. 2004.
- 1328 44. FRESNO, M., WU, W., RODRIGUEZ, J., E NADJI, M. Localization of
1329 metallothionein in breast carcinomas. An immunohistochemical study.
1330 **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v.423(3), p.215-219, 1993.
- 1331 45. GALIZIA, G., FERRARACCIO, F., LIETO, E. V., E ORDITURA, M. p27
1332 Downregulation and Metallothionein Overexpression in Gastric Cancer Patients
1333 Are Associated With a Poor Survival Rate. **J Surg Oncol**, v.93, p.241-252,
1334 2006.
- 1335 46. GALLICCHIO, L. M., FLAWS, J. A., FOWLER, B., E IOFFE, O. B.
1336 Metallothionein expression in invasive and in situ breast carcinomas. **Cancer**
1337 **Detect Prev**, v.29(4), p.332-337, 2005.
- 1338 47. GAO, Y., HAN, Z., E LIU, X. Metallothionein expression and its significance in
1339 salivary gland tumors. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zh**, v.32(5), p.282-
1340 284, 1997.
- 1341 48. GARDEN, A. S., WEBER, R. S., MORRISON, W. H., ANG, K. K., E PETERS, L.
1342 J. The influence of positive margins and nerve invasion in adenoid cystic

- 1343 carcinoma of the head and neck treated with surgery and radiation. **Int J Radiat**
 1344 **Oncol Biol Phys**, v.32(3), p.619-626, 1995.
- 1345 49. GOMULKIEWICZ, A., PODHORSKA-OKOLOW, M., SZULC, R., SMORAG,
 1346 Z., WOJNAR, A., ZABEL, M., ET AL. Correlation between metallothionein (
 1347 MT) expression and selected prognostic factors in ductal breast cancers. **Folia**
 1348 **Histochem Cytobiol**, v.48(2), p.242-248, 2010.
- 1349 50. GOSPODAROWICS M, E O'SULLIVAN B. Prognostic factors in cancer. **Semin**
 1350 **Surg Oncol**, v.21, p.13-18, 2003.
- 1351 51. GUZZO, M., LOCATI, L. D., PROTT, F. J., GATTA, G., MCGURK, M.,
 1352 LICITRA, L., ET AL. Major and minor salivary gland tumors. **Crit Rev Oncol**
 1353 **Hematol**, v.74(2), p.134-148, 2010.
- 1354 52. HAERSLEV, T., JACOBSEN, G., E ZEDELER, K. The prognostic significance of
 1355 immunohistochemically detectable metallothionein in primary breast
 1356 carcinomas. **APMIS**, v.103(4), p.279-285, 1995.
- 1357 53. HAERSLEV, T., JACOBSEN, K., NEDERGAARD, L., E ZEDELER, K.
 1358 Immunohistochemical detection of metallothionein in primary breast carcinomas
 1359 and their axillary lymph node metastases. **Patholl Res Pract**, v.190(7), p.675-
 1360 681, 1994.
- 1361 54. HAQ, F., MAHONEY, M., E KOROPATNICK, J. Signaling events for
 1362 metallothionein induction. **Mutation research**, v.533(1-2), p.211-26, 2003.
- 1363 55. HISHIKAWA, Y., KOJI, T., DHAR, D. K., KINUGASA, S., YAMAGUCHI, M.,
 1364 NAGASUE, N., ET AL. Metallothionein expression correlates with metastatic
 1365 and proliferative potential in squamous cell carcinoma of the oesophagus. **Br J**
 1366 **Cancer**, v.81(4), p.712-20, 1999.
- 1367 56. HOEY, J. G., GARRENT, S. H., SENS, M. A., TODD, J. H., E SENS, D. A.
 1368 Expression of MT-3 mRNA in human kidney, proximal tubule cell cultures, and
 1369 renal cell carcinoma. **Toxicol Lett**, v.92, p.149-160, 1997.
- 1370 57. HOZUMI, I., INUZUKA, T., ISHIGURO, H., HIRAIWA, M., UCHIDA, Y.,
 1371 TSUJI, S., ET AL. Immunoreactivity of growth inhibitory factor in normal rat
 1372 brain and after stab wounds--an immunocytochemical study using confocal laser
 1373 scan microscope. **Brain research**, v.741(1-2), p.197-204, 1996.
- 1374 58. HUANG, M., CF, S. I., E PETERING, D. H. Interprotein metal exchange between
 1375 transcription factor IIIa and apo-metallothionein. **J Inorg Biochem**, v.98(4),
 1376 p.639-648, 2004.
- 1377 59. IOACHIM, E. E., CHARCHANTI, A., STAVROPOULOS, N., ATHANASSIOU,
 1378 E., MICHAEL, M., AGNANTIS, N., ET AL. Localization of metallothionein in
 1379 urothelial carcinoma of the human urinary bladder: an immunohistochemical
 1380 study including correlation with HLA-DR antigen, p53, and proliferation
 1381 indices. **Anticancer Res**, v.21(3B), p.1757-1761, 2001.
- 1382 60. IRIE, Y., MORI, F., KEUNG, W., MIZUSHIMA, Y., E WAKABAYASHI, K.
 1383 Expression of neuronal growth inhibitory factor (metallothionein-III) in the
 1384 salivary gland. **Physiol Res**, v.53(6), p.719-723, 2004.
- 1385 61. ITO, F. A., ITO, K., VARGAS, P. A., DE ALMEIDA, O. P., E LOPES, M. A.
 1386 Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496
 1387 cases. **Int J Oral Maxillofac Sug**, v.34(5), p.533-536, 2005.
- 1388 62. JANSSEN, A. M., DUIJN, W. V., RUIT, M. M., KRUIDENIER, L., BOSMAN, C.
 1389 B., GRIF, G., ET AL. Metallothionein in human gastrointestinal cancer. **J**
 1390 **Pathol**, v.192, p.293-300, 2000.
- 1391 63. JASANI, B., E SCHMID, K. W. Significance of metallothionein overexpression in
 1392 human tumours. **Histopathology**, v. 31, p.211-214, 1997.

- 1393 64. JAYASURYA, A., BAY, B., YAP, W., E TAN, N. Correlation of metallothionein
1394 expression with apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. **Br J Cancer**, v.82(6),
1395 p.1198-1203, 2000.
- 1396 65. JIANG, L., MARET, W., E VALLEE, B. L. The glutathione redox couple
1397 modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol
1398 dehydrogenase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95(7), p.3483-3488, 1998.
- 1399 66. JIN, R., E VINCENT, B. B. Significance of metallothionein expression in breast
1400 myoepithelial cells. **Cell Tissue Res**, v.13, p.221-226, 2001.
- 1401 67. JIN, R., BAY, B. H., CHOW, V. T., TAN, P. H., E LIN, V. C. Metallothionein 1E
1402 mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal
1403 breast cancer. **Imaging**, v.83, p.319-323, 2000.
- 1404 68. JIN, R., BAY, B., CHOW, V. T., E TAN, P. Metallothionein 1F mRNA expression
1405 correlates with histological grade in breast carcinoma. **Breast Cancer Res**
1406 **Treat**, v.66, p.265-272, 2001.
- 1407 69. JIN, R., BAY, B., CHOW, V., E TAN, P. Metallothionein 1F mRNA expression
1408 correlated with histological grade in breast carcinoma. **Breast Cancer Res**
1409 **Treat**, v.23(1), p.81-86, 2002.
- 1410 70. JIN, R., HUANG, J., TAN, P., E BAY, B. Clinicopathological Significance of
1411 Metallothioneins in Breast Cancer. **Pathol Oncol Res**, v.10(2), p.74-79, 2004.
- 1412 71. KELLY, J., P, B., MASTERS, B. A., QUAIFFE, C. J., ERICKSON, J. C.,
1413 BRINSTER, R. L., ET AL. (1994). Metallothionein III Is Expressed Synaptic
1414 Vesicles in Neurons That Sequester Zinc in, *1*
- 1415 72. KHAN, A. J., DIGIOVANNA, M. P., ROSS, D. A., SASAKI, C. T., CARTER, D.,
1416 SON, Y. H., ET AL. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review.
1417 **Int J Cancer**, v.96(3), p.149-58, 2001.
- 1418 73. KO, Y. H., LEE, M. A., HONG, Y. S., LEE, K. S., JUNG, C., KIM, Y. S., ET AL.
1419 Prognostic factors affecting the clinical outcome of adenoid cystic carcinoma of
1420 the head and neck. **Japanese J Clin Oncol**, v.37(11), p.805-11, 2007.
- 1421 74. KOKEMUELLER, H., ECKARDT, A., BRACHVOGEL, P., E HAUSAMEN, J.
1422 Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--a 20 years experience. **Int j**
1423 **oral maxillofac sug**, v.33(1), p.25-31, 2004.
- 1424 75. KONDO, Y., RUSNAK, J. M., HOYT, D. G., SETTINERI, C. E., PITT, B. R.,
1425 LAZO, J. S., ET AL. Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. **Mol**
1426 **Pharmacol**, v.52, p.195-201, 1997.
- 1427 76. KONTOZOGLOU, T., BANERJEE, D., E CHERIAN, M. G. Immuno-
1428 histochemical localization of metallothionein in human testicular embryonal
1429 carcinoma cells. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v.415(6), p.545-
1430 549, 1989.
- 1431 77. LEE, S., YANG, S., HO, Y., TSAI, C., E CHANG, Y. The upregulation of
1432 metallothionein-1 expression in areca quid chewing-associated oral squamous
1433 cell carcinomas. **Oral Oncol**, v.44(2), p.180-186, 2008.
- 1434 78. LI, S., YU, B., AN, P., ZUO, F., E CAI, H. Expression of metallothionein and FasL
1435 in colorectal cancer and its clinical significance. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**,
1436 v.43(12), p.1118-1120, 2005.
- 1437 79. LOYOLA, A., ARAUJO, V., SOUSA, S., E ARAUJO, N. Minor salivary gland
1438 tumours. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. **Eur J**
1439 **Cancer B Oral Oncol**, v.31(3), p.197-201, 1995.
- 1440 80. MARET, W., JACOB, C., VALLEE, B. L., E FISCHER, E. Inhibitory sites in
1441 enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. **Proc Natt Acad Sci USA**,
1442 v.96(5), p.1936-1940, 1999.

- 1443 81. MARGOSHES, M., E VALLEE, B. L. A cadmium protein from equine kidney
1444 cortex. **J Am Chem Soc**, v.2(8), p.4813-4814, 1957.
- 1445 82. MASTERS, B. A., QUAIFFE, C. J., ERICKSON, J. C., KELLY, E. J., FROELICK,
1446 G. J., ZAMBROWICZ, B. P., ET AL. Metallothionein III is expressed in
1447 neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. **J Neurosc**, v.14(10), p.5844-
1448 5857, 1994.
- 1449 83. MATSUBA, H., SIMPSON, J., MAUNEY, M., E THAWLEY, S. Adenoid cystic
1450 salivary gland carcinoma: a clinicopathologic correlation. **Head Neck Surg.**,
1451 v.8(3), p.200-204, 1986.
- 1452 84. MCCLUGGAGE, W. G., MAXWELL, P., HAMILTON, P. W., E JASANI, B.
1453 High metallothionein expression is associated with features predictive of
1454 aggressive behaviour in endometrial carcinoma. **Histopathol**, v.34, p.51, 1999.
- 1455 85. MENDENHALL, W. M., MORRIS, C. G., AMDUR, R. J., WERNING, J. W.,
1456 HINERMAN, R. W., VILLARET, D. B., ET AL. Radiotherapy alone or
1457 combined with surgery for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Head**
1458 **Neck**, v.26(2), p.154-162, 2004.
- 1459 86. MEPLAN, C., RICHARD, M., E HAINAUT, P. Metalloregulation of the tumor
1460 suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to
1461 metal chelators in vitro and in intact cells. **Oncogene**, v.19(46), p.5227-5236,
1462 2000.
- 1463 87. MIDIDODDI, S., MCGUIRT, J. P., SENS, M. A., TODD, J. H., E SENS, D. A.
1464 Toxicology Letters Isoform-specific expression of metallothionein mRNA in the
1465 developing and adult human kidney. **Toxicol Let**, v.85, p.17-27, 1996.
- 1466 88. MILES, A. T., HAWKSWORTH, G. M., BEATTIE, J. H., E RODILLA, V.
1467 Induction, Regulation, Degradation, and Biological Significance of Mammalian
1468 Metallothioneins. **Crit Rev Bioch**, v.35(1), p.35-70, 2000.
- 1469 89. MIYASHITA, H., E SATO, Y. Metallothionein 1 is a downstream target of
1470 vascular endothelial zinc finger 1 (VEZFI) in endothelial cells and participates
1471 in the regulation of angiogenesis. **Endothelium**, v.12(4), p.163-170, 2005.
- 1472 90. MOUSSA, M., KLOTH, D., PEERS, G., CHERIAN, M. G., FREI, J., CHIN, J., ET
1473 AL. Metallothionein expression in prostatic carcinoma: correlation with Gleason
1474 grade, pathologic stage, DNA content and serum level of prostate-specific
1475 antigen. **Clin Invest Med**, v.20(6), p.371-380, 1997.
- 1476 91. MURAMATSU, Y., HASEGAWA, Y., FUKANO, H., OGAWA, T., NAMUBA,
1477 M., MOURI, K., ET AL. Metallothionein immunoreactivity in head and neck
1478 carcinomas; special reference to clinical behaviors and chemotherapy responses.
1479 **Anticancer Res**, v.20(1A), p.257-264, 2000.
- 1480 92. NARTEY, N., CHERIAN, M. G., E BANERJEE, D. (1987). Immunohistochemical
1481 localization of metallothionein in human thyroid tumors. *The American journal*
1482 *of pathology*, 129(1), 177-82. Retrieved from
1483 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3661677>.
- 1484 93. NASCIMENTO, A., AMARAL, A., PRADO, L., KLIGERMAN, J., E SILVEIRA,
1485 T. (1986). Adenoid cystic carcinoma of salivary glands. A study of 61 cases with
1486 clinicopathologic correlation. *Cancer*, 57(2), 312-319.
- 1487 94. NEVILLE, B. W., DAMM, D. D., ALLEN, C. M., E BOUQUOT, J. E. (2004).
1488 *Patologia oral e maxilofacial* (2 ed., pp. 373-413). Rio de Janeiro: Guanabara
1489 Koogan.
- 1490 95. NGU, T. T., EASTON, A., E STILLMAN, M. J. Kinetic analysis of arsenic-
1491 metalation of human metallothionein: significance of the two-domain structure.
1492 **J Am Che Soc**, v.130(50), p.17016-17028, 2008.

- 1493 96. NGUYEN, A., JING, Z., MAHONEY, P. S., DAVIS, R., SIKKA, S. C.,
1494 AGRAWAL, K. C., ET AL. In vivo gene expression prole analysis of
1495 metallothionein in renal cell carcinoma. **Cancer Let**, v.160, p.133-140, 2000.
- 1496 97. NIELSEN, A. E., BOHR, A., E PENKOWA, M. The Balance between Life and
1497 Death of Cells: Roles of Metallothioneins. **Biomark Insights**, v.1, p.99-111,
1498 2007.
- 1499 98. NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge.
1500 **Talanta**, v.46(2), p.243-254, 1998.
- 1501 99. NORDBERG, M., E NORDHERG, G. (2009). Metallothioneins: Historical
1502 Development and Overview. *Metallothioneins and Related Chelators*, 5, 1.
1503 Royal Society of Chemistry, 2009.
- 1504 100.OFNER, D., MAIER, H., RIEDMANN, B., BAMMER, T., RUMER, A., WINDE,
1505 G., ET AL. Immunohistochemical metallothionein expression in colorectal
1506 adenocarcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. **Virchows**
1507 **Arch**, v.425(5), p.491-497, 1994.
- 1508 101.OYAMA, T., TAKE, H., HIKINO, T., LINO, Y., E NAKAJIMA, T.
1509 Immunohistochemical expression of metallothionein in invasive breast cancer in
1510 relation to proliferative activity, histology and prognosis. **Oncology**, v.53(2),
1511 p.112-117, 1996.
- 1512 102.PEDERSEN, M. Ø., LARSEN, A., STOLTENBERG, M., E PENKOWA, M. The
1513 role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. **Prog Histochem**
1514 **Cytochem**, v.44, p.29-64, 2009.
- 1515 103.PENKOWA, M. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain
1516 pathology. **FEBS J**, v.273(9), p.1857-1870, 2006.
- 1517 104.PEREZ, D. E., DE ABREU ALVES, F., NOBUKO NISHIMOTO, I., DE
1518 ALMEIDA, O. P., E KOWALSKI, L. P. Prognostic factors in head and neck
1519 adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol**, 42(2), p.139-146, 2006.
- 1520 105.PONTES, H., DE AQUINO XAVIER, F., TS, D. S., FONSECA, F., PAIVA, H.,
1521 PONTES, F., ET AL. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and
1522 in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **J Oral Pathol**
1523 **Med**, v.38(8), p.644-650, 2009.
- 1524 106.POSEWITZ, M., E WILCOX, D. Properties of the Sp1 zinc finger 3 peptide:
1525 coordination chemistry, redox reactions, and metal binding competition with
1526 metallothionein. **Chem Res Toxicol**, v.8(8), p.1020-1028, 1995.
- 1527 107.PRASAD, M. L., BARBACIORU, C. C., RAWAL, Y. B., HUSEIN, O., E WEN,
1528 P. Hierarchical cluster analysis of myoepithelial/basal cell markers in adenoid
1529 cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. **Mod Pathol**,
1530 v.21(2), p.105-114, 2008.
- 1531 108.PROKOPAKIS, E. P., SNYDERMAN, C. H., HANNA, E. Y., CARRAU, R. L.,
1532 JOHNSON, J. T., D'AMICO, F., ET AL. Risk factors for local recurrence of
1533 adenoid cystic carcinoma: the role of postoperative radiation therapy. **Am J**
1534 **Otolaryngol**, v.20(5), p.281-286, 1999.
- 1535 109.QUAIFE, C. J., FINDLEY, S. D., ERICKSON, J. C., FROELICK, G. J., KELLY,
1536 E. J., ZAMBROWICZ, B. P., ET AL. Induction of a new metallothionein
1537 isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia.
1538 **Biochem**, v.33(23), p.7250-7259, 1994.
- 1539 110.RAINWATER, R. Role of cysteine residues in regulation of p53 function, **Mol Cell**
1540 **Biol**, v.15, p.3892-3903, 1995.
- 1541 111.RAPIDIS, A. D., GIVALOS, N., GAKIPOULOU, H., FARATZIS, G.,
1542 STAVRIANOS, S. D., VILOS, G. A., ET AL. Adenoid cystic carcinoma of the

- 1543 head and neck. Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the
1544 literature. **Oral Oncol**, v.41(3), p.328-335, 2005.
- 1545 112.RICHARDS, P. Recent Developments in Trace Element Metabolism and Function: I
1546 Role of Metallothionein in Copper and Zinc Metabolism. **Proteins**, p.1062-
1547 1070, 1989.
- 1548 113.SATO, M., E KONKOH, M. Recent studies on metallothionein: protection against
1549 toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. **Tohoku J Exp Med**,
1550 v.196(1), p.9-22, 2002.
- 1551 114.SCHMID, K. W., ELLIS, I., GEE, J., DARKE, B., LEES, W., KAY, J., ET AL.
1552 Presence and possible significance of immunocytochemically demonstrable
1553 metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the
1554 breast. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v.422(2), p.153-159, 1993.
- 1555 115.SENS, M. A., SOMJI, S., GARRETT, S. H., BEALL, C. L., E SENS, D. A.
1556 Metallothionein Isoform 3 Overexpression Is Associated with Breast Cancers
1557 Having a Poor Prognosis. **Am J Pathol.**, v.159(1), p.21-26, 2001.
- 1558 116.SHIBUYA, Y., RI, S., UMEDA, M., YOSHIKAWA, T., MASAGO, H.,
1559 KOMORI, T., ET AL. Ultrastructural localization of E-cadherin and alpha-/beta-
1560 catenin in adenoid cystic carcinoma. **Histopathol**, v.35(5), p.423-431, 1999.
- 1561 117.SHIMODA, R., ACHANZAR, W. E., QU, W., NAGAMINE, T., TAKAGI, H.,
1562 MORI, M., ET AL. Metallothionein is a potential negative regulator of
1563 apoptosis. **Toxicol Sci**, v.73(2), p.294-300, 2003.
- 1564 118.SIMPKINS, C., BALDERMAN, S., MENSAH, E., E D, P. Mitochondrial Oxygen
1565 Consumption Is Synergistically Inhibited by Metallothionein and Calcium.
1566 **Measurement**, v.21, p.16-21, 1998.
- 1567 119.SOBIN, L., E FLEMING, I. (1997). *Classification of malignant tumors*. (UICC) (5
1568 ed., pp. 1803-1804). Washington: Wiley-Liss.
- 1569 120.SOMJI, S., SENS, M. A., LAMM, D. L., GARRETT, S. H., E SENS, D. A.
1570 Metallothionein isoform 1 and 2 gene expression in the human bladder: evidence
1571 for upregulation of MT-1X mRNA in bladder cancer. **Cancer Detect Prev**,
1572 v.25(1), p.62-75, 2001.
- 1573 121.SPIRO, R. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2.807
1574 patients. **Head Neck Surg**, v.3(8), p.177-184, 1986.
- 1575 122.SPIRO, R. H. Distant metastasis in adenoid cystic carcinoma of salivary origin. **Am**
1576 **J Surg**, v.174(5), p.495-498, 1997.
- 1577 123.SUNARDHI-WIDYAPUTRA, S., VAN DEN OORD, J., VAN HOUTT, K., DE
1578 LEY, M., E VAN DAMME, B. Identification of metallothionein and parathyroid
1579 hormone-related peptide (PTHrp)-positive cells in salivary gland tumor. **Pathol**
1580 **Res Pract**, v.191(11), p.1092-1098, 1995.
- 1581 124.SUNG, M., KIM, K. H., KIM, J., MIN, Y., SEONG, W., ROH, J., ET AL.
1582 Clinicopathologic predictors and impact of distant metastasis from adenoid
1583 cystic carcinoma of the head and neck. **Arch otolaryngol-head neck surg**,
1584 v.129(11), p.1193-1197, 2003.
- 1585 125.SUR, R., DONDE, B., LEVIN, V., PACELLA, J., KOTZEN, J., COOPER, K., ET
1586 AL. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a review of 10 years.
1587 **Laryngoscope**, v.107(9), p.1276-1280, 1997.
- 1588 126.SUTOH, I., KOHNO, H., NAKASHIMA, Y., HISHIKAWA, Y., TABARA, H.,
1589 TACHIBANA, M., ET AL. Concurrent expressions of metallothionein,
1590 glutathione S-transferase-pi, and P-glycoprotein in colorectal cancers. **Dis Colon**
1591 **Rectum**, v.43(2), p.221-232, 2000.

- 1592 127.SZELACHOWSKA, J., DZIEGIEL, P., JELEN-KRZESZEWSKA, J., JELEN, M.,
1593 TARKOWSKI, R., APYTKOWSKA, B., ET AL. Correlation of metallothionein
1594 expression with clinical progression of cancer in the oral cavity. **Anticancer**
1595 **Res**, v.29(2), p.589-595, 2009.
- 1596 128.TAI, S., TAN, O. J., CHOW, V. T., JIN, R., JONES, J. L., TAN, P., ET AL.
1597 Differential expression of metallothionein 1 and 2 isoforms in breast cancer lines
1598 with different invasive potential: identification of a novel nonsilent
1599 metallothionein-1H mutant variant. **Am J Pathol**, v.163(5), p.2009-2019, 2003.
- 1600 129.TAI, S., TAN, O. J., CHOW, V. T., JIN, R., JONES, J. L., TAN, P., ET AL.
1601 Differential expression of metallothionein 1 and 2 isoforms in breast cancer lines
1602 with different invasive potential: identification of a novel nonsilent
1603 metallothionein-1H mutant variant. **Am J Pathol**, v.163(5), p.2009-2019, 2003.
- 1604 130.TEKUR, S., E HO, S. Ribozyme-mediated downregulation of human
1605 metallothionein II(a) induces apoptosis in human prostate and ovarian cancer
1606 cell lines. **Mol Carcinog**, v.33, p.44-45, 2002.
- 1607 131.TERHAARD, C., H, L., VAN DER TWEEL, I., HILGERS, F., EIJKENBOOM,
1608 W., MARRES, H., ET AL. Salivary gland carcinoma: independent prognostic
1609 factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results
1610 of the Dutch head and neck oncology cooperative group. **Head Neck**, v.26(8),
1611 p.681-692, 2004.
- 1612 132.THEOCHARIS, S., MARGELI, A., KLIJANIENKO, J., E KOURAKLIS, G.
1613 Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology*, v.45(2), p.103-
1614 118, 2004.
- 1615 133.THIRUMOORTHY, N., MANISENTHIL KUMAR, I., SUNDAR, A.,
1616 PANAYAPPAN, L., E CHATTERJEE, M. Metallothionein: an overview.
1617 **World J Gastroenterol**, v.13(7), p.993-996, 2007.
- 1618 134.TIAN, Z., LI, L., WANG, L., HU, Y., E SALIVARY, J. L. Salivary gland
1619 neoplasms in oral and maxillofacial regions : a 23-year retrospective study of
1620 6982 cases in an eastern Chinese population. **Int J Oral Maxillofac Surg**,
1621 v.39(3), p.235-242, 2010.
- 1622 135.TOM, M., CHEN, N., SEGEV, M., HERUT, B., E RINKEVICH, B. Quantifying
1623 fish metallothionein transcript by real time PCR for its utilization as an
1624 environmental biomarker. **Evaluation**, p.1-6, 2003.
- 1625 136.VASCONCELOS, M. H., TAM, S., HESKETH, J. E., REID, M., BEATTIE, J. H.,
1626 APPL, J. H., ET AL. Metal- and Tissue-Dependent Relationship between
1627 Metallothionein mRNA and Protein. **Toxicol App Pharmacol**, v.97, p.91-97,
1628 2002.
- 1629 137.WAHLBERG, P., ANDERSON, H., BIÖRKLUND, A., MÖLLER, T., E
1630 PERFEKT, R. Carcinoma of the parotid and submandibular glands--a study of
1631 survival in 2465 patients. **Oral Oncol**, v.38(7), p.706-713. 2002.
- 1632 138.WEI, H., DESOUKI, M. M., LIN, S., XIAO, D., FRANKLIN, R. B., FENG, P., ET
1633 AL. Differential expression of metallothioneins (MTs) 1, 2, and 3 in response to
1634 zinc treatment in human prostate normal and malignant cells and tissues. **Mol**
1635 **cancer**, v.7, p.7, 2008.
- 1636 139.YAMASAKI, Y., SMITH, C., WEISZ, D., VAN HUIZEN, I., XUAN, J.,
1637 MOUSSA, M., ET AL. Metallothionein expression as prognostic factor for
1638 transitional cell carcinoma of bladder. **Urology**, v.67(3), p.530-535, 2006.
- 1639 140.YAP, X., TAN, H., HUANG, J., LAY, Y., YIP, G. W., TAN, P., ET AL. Over-
1640 expression of metallothionein predicts chemoresistance in breast cancer. **J**
1641 **Pathol**, v.217(4), p.563-570, 2009.

- 1642 141.ZENG, J., HEUCHEL, R., SCHAFFNER, W., E KAGI, J. Thionein
1643 (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by
1644 zinc finger containing factor Sp1. **FEBS Lett**, v.279(2), p.310-312, 1991.
- 1645 142.ZENG, J., VALLEE, B. L., E KAG, J. Zinc transfer from transcription factor IIIA
1646 fingers to thionein clusters. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.88, p.9984-9988, 1991.
- 1647 143.ZHANG, R., ZHANG, H., WEI, H., E LUO, X. Expression of metallothionein in
1648 invasive ductal breast cancer in relation to prognosis. **J Environ Pathol Toxicol**
1649 **Oncol**, v.19(1), p.95-97, 2000.
- 1650 144.VAN DER WAL, J. E., BECKING, A. G., SNOW, G. B., E VAN DER WAAL, I.
1651 Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the
1652 value of diagnostic examinations during follow-up. **Head Neck**, 24(8), p.779-
1653 783, 2002.

1654

1655 **10. Anexos**

Memo 303/09-CEP-INCA



Rio de Janeiro, 22 de outubro de 2009.

A(o): Dr. Fernando Luiz Dias
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 81/08 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)

Título do Estudo: Metalotioneína em neoplasias epiteliais de glândulas salivares: associação com a cito e histodiferenciação tumoral e avaliação da capacidade prognóstica

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **aprovou** após re-análise o estudo intitulado: **Metalotioneína em neoplasias epiteliais de glândulas salivares: associação com a cito e histodiferenciação tumoral e avaliação da capacidade prognóstica**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2** em 13 de outubro de 2009.

Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu protocolo que estão previstos para as seguintes datas: *abril/2010 e outubro/2010.*

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Classificação Tumor-nodo-metástase (TNM) para tumores de glândulas salivares

T - Tumor primário

TX	Tumor primário inacessível
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor <2 cm em sua maior dimensão, <u>sem extensão extraparenquimal</u> *
T2	Tumor entre 2 e 4 cm em sua maior dimensão <u>sem extensão extraparenquimal</u> *
T3	Tumor >4 e/ou tumor <u>com extensão extraparenquimal</u> *
T4a	Tumor invade pele, mandíbula, canal auditivo ou nervo facial
T4b	Tumor invade base do crânio, placas pterigóideas ou envolve artéria carótida

N - Linfonodos regionais (Nodos cervicais)

NX	Linfonodos regionais inacessíveis
N0	Sem metástase linfonodal
N1	Metástase em um único nodo ipsilateral, <3cm em sua maior dimensão
N2	Metástases como especificado abaixo
N2a	Metástase em um único nodo ipsilateral, medindo entre 3 e 6 cm em sua maior dimensão
N2b	Metástases em múltiplos nodos, todos ≤ 6cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em nodos bilaterais ou contralaterais, < 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástases nodais maiores que 6 cm

M - Metástase a distância

MX	Metástases à distância inacessíveis
M0	Sem metástase à distância
M1	Metástase à distância

Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stage IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stage IVB	T4b	Any N	M0
Stage IVC	Any T	Any N	M1

* Nota: Extensão extraparenquimal é uma evidência clínica ou macroscópica de invasão dos tecidos moles, as evidências microscópicas sozinhas não são usadas para esta classificação.

(Traduzido de Lester D.R.Thompson - Head and Neck Pathology)

DADOS CLÍNICOS

	Caso	IDADE	COR	Tamanho
Metastáticos	1	46	SD	5
	2	63	PARDA	4.5
	3	60	PARDA	10
	4	52	BRANCA	10
	5	62	BRANCO	6
	6	49	BRANCA	6.5
	7	39	BRANCA	DISSEMINAÇÃO LOCAL
	8	71	BRANCA	2.5
	9	26	PARDA	SD
	10	41	BRANCA	2
	11	79	BRANCA	2
	12	56	BRANCA	4
	13	19	BRANCA	NÃO FOI MENSURADO CLINICAMENTE
	14	80	BRANCA	3
Primários Não Metastáticos (PNM)	15	62	BRANCA	3.0
	16	32	PARDA	3.0
	17	50	PRETA	3.0
	18	35	PARDA	1.0
	19	65	PRETA	SD
	20	37	PARDA	3.0
	21	69	BRANCA	7.0
	22	60	BRANCA	2.0
	23	68	PARDA	3.0
	24	42	PARDA	DISSEMINAÇÃO LOCAL
	25	68	BRANCA	5.0
	26	50	BRANCA	3.0
	27	34	PRETA	1.5
	28	58	PARDA	4.9
	29	54	BRANCA	3.0
	30	79	BRANCA	2.0
	31	43	PARDA	3.7
	32	41	BRANCA	4.0
	33	45	BRANCA	4.0
	34	55	PARDA	3.0
	35	61	BRANCA	2.5
	36	38	PRETA	4.0
	37	37	PARDA	3.0
	38	34	BRANCA	2.0
	39	46	BRANCA	4.0
	40	26	PARDA	3.4
	41	59	PARDA	7.0
	42	26	PARDA	1.5
	43	17	BRANCA	0.5
	44	34	PARDA	8.0
	45	50	PRETA	1.0
	46	87	PARDA	1.5
	47	46	PRETA	SD
	48	46	PARDO	2.0
	49	71	PARDA	1.5

DADOS CLÍNICOS

	Caso	Tempo total de doença	Localização	QP
Metastáticos	1	18	PARÓTIDA E, LOBO PROFUNDO	TUMOR NA REGIÃO PAROTÍDEA E
	2	12	SUBMANDIBULAR D	TUMOR DE PESCOÇO
	3	8	SUBMAND E	DOR E CAROÇO NO PESCOÇO
	4	4	SUBMANDIBULAR E	TU E DOR NO TRÍGONO RETROMOLAR
	5	48	SUBMANDIBULAR E	CAROÇO NO PESCOÇO
	6	120	SUBMANDIBULAR E	CAROÇO NO PESCOÇO
	7	12	TRÍGONO RETROMOLAR E	DOR NA BOCA
	8	2	BASE DE LÍNGUA D	DOR NA GARGANTA E NO OUVIDO D
	9	8	PALATO DURO E	CAROÇO NA BOCA
	10	36	SUBMANDIBULAR E	TUMOR EM REGIÃO SUBMANDIBULAR E
	11	48	PARÓTIDA E, POLO INFERIOR	PAREZIA DO BUCAL E E NÓDULO EM ÂNGULO DE MANDÍBULA (PCTE EM TTO NO INCA POR CEC BD LÁBIO)
	12	5	PALATO DURO D	LESÃO AFTÓIDE NO CÉU DA BOCA
	13	5	parótida	TUMORAÇÃO NO OUVIDO, DOR
	14	84	assoalho	FERIDA NA BOCA
Primários Não Metastáticos (PNIM)	15	112	SUBMANDIBULAR D	ADENOPATIA CERVICAL E SUBMANDIBULAR D
	16	6	PARÓTIDA D	TUMOR REGIÃO DE PARÓTIDA D
	17	12	PALATO DURO E	DOR NO CÉU DA BOCA
	18	96	SUBMANDIBULAR E	TUMORAÇÃO SUBMANDIBULAR E
	19	6	BASE DE LINGUA D	ODINOFAGIA E DISFAGIA
	20	16	PALATO MOLE E	TUMORAÇÃO EMPALATO
	21	12	SEIO MAXILAR E	EPISTAXE + ABAULAMENTO DE FACE
	22	180	PALATO DURO D	FERIDINHA DURA E INDOLOR NO PALATO
	23	12	REGIÃO SUBMANDIBULAR D	TUMOR EM REGIÃO SUBMANDIBULAR
	24	24	SEIO MAXILAR E	TUMORAÇÃO NA FACE E
	25	3	ASSOALHO	CAC
	26	6	SUBLINGUAL E	AVALIAÇÃO E TTO
	27	12	LÁBIO SUPERIOR	CAC, AVALIAÇÃO E TTO
	28	6	PARÓTIDA D, LOBOS SUP E PROFUNGO	CAC
	29	1	BASE DE LÍNGUA D	MASSA NODULAR EM LÍNGUA D
	30	12	BOCHECHA D	LESÃO NA BOCA
	31	48	PARÓTIDA D(LOBO SUPERFICIAL)	TUMORAÇÃO DE PARÓTIDA D
	32	2	BASE DE LÍNGUA E	DISFAGIA E DOR EM LÍNGUA
	33	36	PALATO DURO E	CAC
	34	36	PALATO DURO E	BOLHAS NO CÉU DA BOCA
	35	12	SUBMAND D	TUMORAÇÃO SUBMAND D
	36	SD	PARÓTIDA D, POLO INFERIOR	CAROÇO EMBAIXO DO OUVIDO
	37	36	SUBLINGUAL D	LESÃO EM GLS SUBLINGUAL
	38	3	PALATO DURO D	CAROÇO NO CÉU DA BOCA
	39	8	PALATO DURO E	FERIDA NA BOCA
	40	14	PARÓTIDA D	AUMENTO DE PARÓTIDA COM DOR LOCAL
	41	6	SUBLINGUAL E	FERIDA ORAL
	42	72	BOCHECHA D	BOLA NA BOCA
	43	36	BOCHECHA E	CAC, NÓDULO NA BOCHECHA
	44	8	BASE DE LÍNGUA	NÓDULO NA LÍNGUA
	45	2	PALATO DURO E	LESÃO NA BOCA
	46	SD	LÁBIO SUPERIOR	TUMORAÇÃO, DOR
47	5	LÍNGUA E	FERIDA NA BOCA	
48	1	Palato E	TUMORAÇÃO, ÚLCERA, DOR, DISFONIA	
49	6	BASE DE LÍNGUA D	LESÃO EM BASE DE LÍNGUA	

DADOS DE SEGUIMENTO

	Caso	Metástase	Estágio clínico segundo TNM clínico (4a=41, 4B=42 e 4c=43)	Tratamento
Metastáticos	1	PULMÃO	3	PAROTIDECTOMIA TOTAL CPF
	2	PULMÃO, FÍGADO	3	SUBMANDIBULARECTOMIA
	3	linfonodo cervical	41	PAROTIDECTOMIA PARCIAL E + HEMIMANDIBULECTOMIA
	4	detectado em RX), e em linfonodo cer	3	EC ESTENDIDO
	5	COLUNA VERTEBRAL, ILÍACO	41	SUBMANDIBULECTOMIA
	6	PLEURA	41	EC RADICAL, + N HIPOGLOSSO + RAMO E MANDÍBULA
	7	PULMÃO	41	HEMIMANDIBULECTOMIA + RESSECÇÃO TU MUCOSA JUGAL + PARAFARINGE + FOSSA TEMPORAL + TEMPORAL
	8	PULMÃO (RX DE TÓRAX)	2	GLOSSECTOMIA DE BASE DE LÍNGUA D
	9	vértebras	2	MAXILARECTOMIA PARCIAL
	10	RIM	2	SUBMANDIBULECTOMIA E
	11	linfonodo intraparotideo	3	PTOMIA SUPERFICAL COM PRESERV VII
	12	PULMÃO	43	RESSECÇÃO DE TUMOR DE REBORDO GENGIVAL SUP D + HEMMAXILECTOMIA DE INFRA-ESTRUTURA
	13	Pulmão e Esvaziamento cervical positivo	3	PAROTIDECTOMIA TOTAL ALARGADA COM AMPUTAÇÃO DO PAVILHÃO AURICULAR, SACRIFÍCIO DO NERVO FACIAL E LINFADENECTOMIA CERVICAL PROFUNDA E TARSORRAFIA
	14	Pulmão e Esvaziamento cervical positivo	43	GLOSSOPELVECTOMIA
Primários Não Metastáticos (PNM)	15	N	41	ESVAZIAMENTO CERVICAL + RESSECÇÃO DE SUBMANDIBULAR
	16	N	41	PAROTIDECTOMIA TOTAL CPF
	17	N	2	MAXILECTOMIA DE INFRA E MESO ESTRUTURA
	18	N	41	SUBMANDIBULECTOMIA
	19	N	2	N
	20	N	42	ESTAFILECTOMIA
	21	N	41	MAXILECTOMIA TOTAL
	22	N	2	MAXILARECTOMIA
	23	N	2	TIREOIDECTOMIA PARCIAL
	24	N	41	N
	25	N	41	RESSECÇÃO DE TUMOR EM GLS SALIVARES
	26	N	3	RESSECÇÃO DE GLD. LINGUAL E GLD. SUMAND.
	27	N	2	AMPLIAÇÃO DE MARGENS
	28	N	2	PAROTIDECTOMIA TOTAL
	29	N	41	MICROCIRURGIA, RESSECÇÃO
	30	N	2	RESSECÇÃO DE TUMOR DE MUCOSA JUGAL
	31	N	2	PAROTIDECTOMIA TOTAL
	32	N	2	GLOSSECTOMIA PARCIAL
	33	N	2	MAXILARECTOMIA SUBTOTAL E
	34	N	41	MAXILECTOMIA DE INFRA-ESTRUTURA + ESTAFILECTOMIA PARCIAL
	35	N	1	SUBMANDTOMIA D CPF
	36	N	3	PAROTIDECTOMIA SUPERFICIAL CPF
	37	N	3	RESSECÇÃO DE GLS SUBLINGUAL
	38	N	1	RESSECÇÃO DO HEMIPALATO D, PARTE ÓSSEA DO REB ALVEOL D
	39	N	2	MAXILARECTOMIA PARCIAL
	40	N	1	PAROTIDECTOMIA TOTAL D
	41	N	2	RESSECÇÃO DE GL. SUBLINGUAL + MDTOMIA SEGMENTAR
	42	N	2	AMPLIAÇÃO DE MARGENS
	43	N	1	RESSECÇÃO DE TUMOR EM MUCOSA GENGIVO-JUGAL E
	44	N	42	N
	45	N	41	RESSECÇÃO DE TU PALATO DURO + REBORDO
	46	N	42	RESSECÇÃO DE LESÃO EM LÁBIO SUP
	47	N	41	N
	48	N	1	MXTOMIA PARCIAL E DE IFRA E MESO ESTRUTURA
	49	N	1	N

DADOS DE SEGUIMENTO

	Caso	Tempo de acompanhamento (meses)	Estado final (0=Censurado, 1=Óbito)	Recidiva
Metastáticos	1	85	1	N
	2	8	1	N
	3	62	1	N
	4	65	1	N
	5	10	1	N
	6	27	1	N
	7	38	1	N
	8	107	0	N
	9	101	0	S
	10	98	0	N
	11	53	0	N
	12	68	0	S
	13	56	1	N
	14	18	1	N
Primários Não Metastáticos (PNM)	15	19	0	N
	16	80	0	N
	17	119	0	Palato e órbita
	18	98	0	N
	19	98	0	N
	20	73	0	N
	21	73	1	S (LHP C00-004668)
	22	101	0	N
	23	82	1	N
	24	13	1	N
	25	53	0	N
	26	104	0	N
	27	90	0	N
	28	39	0	N
	29	97	0	S (LHP H06-00483)
	30	92	0	N
	31	83	0	N
	32	83	0	N
	33	23	0	N
	34	82	0	N
	35	52	0	N
	36	83	0	N
	37	70	0	N
	38	81	0	N
	39	72	0	N
	40	51	0	N
	41	57	0	N
	42	73	0	S
	43	37	0	N
	44	20	1	N
45	65	0	N	
46	11	0	NÃO	
47	59	1	S LOCAL	
48	73	1	N	
49	23	0	3 x	

DADOS HISTOPATOLÓGICOS

	Caso	Padrão histológico	Margem cirúrgica	Invasão perineural (1. não; 2. sim)
Metastáticos	1	Cribri.	Compro.	1
	2	Sólido	Livre	1
	3	Cribri.	Compro.	2
	4	Sólido	N avaliada	1
	5	Sólido	N avaliada	1
	6	Sólido	Livre	2
	7	Cribri.	Compro.	1
	8	Cribri.	Compro.	1
	9	Cribri.	Compro.	1
	10	Tubular	Livre	2
	11	Sólido	Compro.	2
	12	Tubular	Compro.	1
	13	Cribri.	Compro.	1
	14	Tubular	Livre	2
Primários Não Metastáticos (PNM)	15	Tubular	Compro.	2
	16	Cribri.	N avaliada	2
	17	Tubular	Livre	1
	18	Tubular	Compro.	1
	19	Cribri.	N avaliada	1
	20	Sólido	Livre	1
	21	Sólido	Compro.	1
	22	Sólido	Livre	1
	23	Cribri.	N avaliada	1
	24	Cribri.	N avaliada	1
	25	Cribri.	Compro.	1
	26	Cribri.	Livre	1
	27	Cribri.	N avaliada	1
	28	Cribri.	Livre	2
	29	Cribri.	Compro.	1
	30	Sólido	Compro.	1
	31	Cribri.	Compro.	1
	32	Tubular	Livre	1
	33	Cribri.	Compro.	1
	34	Tubular	Compro.	1
	35	Cribri.	N avaliada	1
	36	Cribri.	N avaliada	1
	37	Tubular	Compro.	2
	38	Cribri.	Livre	1
	39	Tubular	Compro.	2
	40	Cribri.	Livre	1
	41	Cribri.	Livre	1
	42	Cribri.	Livre	1
	43	Cribri.	Livre	2
	44	Tubular	Livre	2
	45	Tubular	Compro.	2
	46	Tubular	Livre	1
	47	Cribri.	N avaliada	1
	48	Tubular	Compro.	1
	49	Cribri.	N avaliada	1

PLANILHAS DOS CASOS DE CAC

(A: Compartimento de marcação; B: Intensidade; C: Proporção; D: % núcleos marcados)

	Caso	Média geral caso	A	B	C	D
Metastáticos	1	2,4	2,6	1,7	2,8	2,8
	2	2,7	2,8	2,0	3,0	2,9
	3	2,7	2,7	1,9	3,0	3,0
	4	2,7	2,9	2,0	3,0	3,0
	5	2,4	2,7	1,6	2,5	2,8
	6	3,1	3,0	2,5	4,0	3,0
	7	2,2	1,7	1,8	3,1	2,2
	8	2,3	2,3	1,5	2,7	2,8
	9	2,1	1,9	1,8	2,7	2,2
	10	2,5	2,4	2,0	2,8	3,0
	11	3,0	2,4	3,0	4,0	2,4
	12	1,5	1,6	1,1	1,5	1,8
	13	2,2	2,1	1,8	1,7	3,0
	14	2,2	2,3	1,4	2,3	2,7
Primários Não Metastáticos (PNM)	15	2,5	2,8	2,1	2,4	3,0
	16	2,1	2,0	1,6	3,0	2,0
	17	2,4	2,5	1,8	2,8	2,4
	18	2,3	2,5	1,6	2,3	2,9
	19	1,9	1,5	1,5	3,2	1,7
	20	2,0	2,6	1,2	2,0	2,4
	21	2,3	2,7	1,5	2,2	3,0
	22	2,5	2,7	1,6	3,1	2,8
	23	1,7	2,1	0,9	1,2	2,7
	24	1,6	1,2	1,5	2,8	1,1
	25	2,1	1,9	1,7	2,0	2,7
	26	2,4	2,3	2,0	2,4	3,0
	27	2,3	2,1	1,6	2,9	2,5
	28	2,7	2,8	2,2	2,9	3,0
	29	1,1	1,3	0,7	0,8	1,7
	30	2,1	2,5	1,3	2,1	2,7
	31	2,6	2,8	1,8	2,9	3,0
	32	2,2	2,9	1,1	1,8	3,0
	33	0,8	1,1	0,5	0,5	1,2
	34	2,8	2,9	2,2	3,2	3,0
	35	2,5	2,8	1,9	2,6	2,9
	36	2,0	1,9	1,8	2,5	2,1
	37	2,8	2,9	1,9	3,5	3,0
	38	2,5	2,2	2,2	3,1	2,6
	39	2,3	2,6	1,9	2,0	2,9
	40	1,9	1,9	1,5	2,3	2,0
	41	0,9	1,1	0,6	0,7	1,3
	42	2,8	2,7	1,9	3,5	3,0
	43	2,4	2,3	1,9	2,5	3,0
	44	2,0	2,1	1,2	2,5	2,2
	45	1,4	1,2	1,2	2,1	1,1
	46	2,0	2,2	1,3	2,1	2,5
	47	2,8	2,9	2,1	3,5	2,9
	48	3,0	3,0	2,7	3,4	3,0
	49	3,0	2,7	2,3	3,9	3,0

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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