

Estudo do estado de diferenciação da célula mioepitelial nas neoplasias de glândula salivar

Ricardo Raitz^{1*} e Vera Cavalcanti de Araújo²

¹Universidade Ibirapuera. Av. Interlagos, 1329, Chácara Flora, 04661-100, São Paulo, São Paulo, Brasil. ²Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de São Paulo. *Autor para correspondência. e-mail: ricardoraitz@ig.com.br

RESUMO. A célula mioepitelial (CM) nos tumores de glândula salivar apresenta-se em diferentes estágios de diferenciação. Sabe-se que em glândula normal ela expressa actina músculo específica (AME) e Citoqueratina (CK) 14. Por outro lado, é conhecida a participação dos componentes de matriz extracelular, dentre eles a laminina (LN), na morfogênese e citodiferenciação das estruturas glandulares. Em vista do exposto, nos propusemos a estudar os diferentes estágios de diferenciação da CM através da expressão da AME, da CK 14, bem como a participação da LN neste processo. Para tanto, utilizamos tumores onde se postulam a participação da CM: adenoma pleomórfico, mioepitelioma, adenoma de células basais e carcinoma adenóide cístico e submetemos os espécimes ao método imunohistoquímico da avidina-biotina. Nossos resultados mostraram que a presença da AME foi rara, assim como a CK 14 que só esteve presente em CM de estruturas ductiformes bem formadas. Já a LN esteve presente junto à CM, independentemente da expressão de CK 14 e de AME, e no estroma tanto de tumores diferenciados, como indiferenciados. Em conclusão, é possível identificar diferentes estágios de diferenciação mioepitelial através da expressão da CK 14 e da AME, mas parece não existir uma correlação da LN com a diferenciação da CM tumoral, pois ou essa ou sua precursora continua a secretar LN, mesmo que imperfeitamente após estímulo oncogênico.

Palavras-chave: tumores de glândula salivar, diferenciação mioepitelial, avidina-biotina.

ABSTRACT. Study of the myoepithelial cell differentiation state in salivary gland tumors. The myoepithelial cell (MC) in salivary gland tumors is presented at different stages of differentiation. The cell presents specific muscles actin (SMA) and Citokeratin (CK)14 in normal gland. On the other hand, there is a participation of extracellular matrix components, as the laminin (LN), in the morphogenesis and cito differentiation of the glands structures. Considering that, we decided to study the different stages of the MC differentiation through SMA expression, the CK 14, as well as the LN participation in this process. Tumors which present the MC participation were used: pleomorphic adenoma, myoepithelioma, adenoma of basal cells, adenoid cystic carcinoma. The immunohistochemical of avidine-biotine analysis of the specimens was done. Results showed that the presence of SMA was rare, as well as the presence of CK 14 that was only noticed on the well formed ductiforms structures. On the other hand, LN was presented adjacent to the MC, independently on the expression of CK 14 and SMA, and in the strom of the differentiated and indifferntiated tumors. Results show that it is possible to identify different stages of myoepithelial differentiation through CK 14 and SMA expression, but it seems there is not a correlation between the LN and the MC tumor differentiation, considering that the MC tumor differentiation keeps secreting LN, even if defectively after oncogenic stimulus.

Key words: salivary gland tumors, myoepithelial differentiation, avidine-biotine.

Introdução

Atribui-se à presença da célula mioepitelial (CM) a grande variedade histológica apresentada pelas neoplasias de glândulas salivares. Paradoxalmente, a identificação da CM nos tumores tem se mostrado problemática pela modificação que a mesma

apresenta, provavelmente, em decorrência dos seus diferentes estados de diferenciação.

Em microscopia eletrônica têm sido demonstrado que as estruturas que definem a CM normal raramente são encontradas nas células tumorais. Tais estruturas são: miofilamentos, vacúolos de pinocitose, hemidesmossomas e membrana basal. Estudos neste

sentido foram realizados no adenoma monomórfico, no adenoma pleomórfico e mioepitelioma.

No campo da imuno-histoquímica, vários marcadores já foram propostos como marcadores da CM tumoral. Entre esses, estão incluídos a proteína S 100, a actina músculo específica (AME), a miosina, a desmina, a queratina e a vimentina. Sabe-se entretanto, que a CM normal apresenta diferenciação mio gênica revelada pela presença do filamento AME e que apresenta também CK 14.

Trabalhos em imuno-histoquímica têm demonstrado, corroborando os achados em microscopia eletrônica, que raramente a CM tumoral apresenta os mesmos filamentos que a CM normal, mostrando que enquanto neoplásica, ela exibe diferentes estados de diferenciação¹⁷.

É conhecido também que a CM secreta LN, sendo esta detectada nas glândulas salivares normais¹⁵, bem como junto às CM tumorais¹³. Adicionalmente, no estado de desenvolvimento da glândula normal, Cutler em 1990, sugeriu que a LN tem papel na morfogênese⁶.

Em vista do exposto, nos propomos a estudar os diferentes estados de diferenciação das CM tumorais através da expressão da LN, da AME e da CK 14.

Material e métodos

Foram utilizadas neoplasias de glândulas salivares pertencentes aos arquivos da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP-Universidade de São Paulo. As neoplasias relacionadas foram aquelas nas quais se postula a participação da CM, a saber: adenoma pleomórfico (6 casos), mioepitelioma (2 casos), adenoma de células basais (3 casos); carcinoma adenoide cístico (7 casos). Todos os casos relacionados seguiram à revisão por dois examinadores para a confirmação do diagnóstico.

Para o estudo imuno-histoquímico, obtivemos cortes de 3 µm dos tecidos fixados em formol e incluídos em parafina. Estes foram submetidos ao método imuno-histoquímico da avidina-biotina, utilizando-se os anticorpos anti-LN, anti AME (HHF35) e anti CK 14 (Tabela 1). Todos os estágios das reações foram realizadas à temperatura ambiente e os tecidos lavados e incubados por 10 minutos (2 trocas de 5 minutos cada) com tampão TRIS-HCl (tris hidroximetil amino metano; 0,05 mM; Sigma; USA) em pH 7,4. A recuperação do antígeno na reação com o anticorpo anti-CK 14 foi feita pelo método do microondas. As lâminas eram mergulhadas em solução de ácido cítrico (10 mmol/L, pH 6.0) e colocadas no forno de microondas (700 W) por 3 tempos de 5 minutos cada. Nos intervalos, o recipiente era preenchido com ácido cítrico. Após

isso, as lâminas esfriavam naturalmente e o anticorpo primário era incubado.

Cortes de glândulas salivares normais menores e maiores incluídas nos espécimes também foram estudados. Para controle negativo os cortes de tecidos foram incubados em tampão TRIS-HCl (pH 7,4), contendo BSA da Sigma (USA) (soro de albumina bovina a 1% em TRIS em pH 7,4), sem os anticorpos primários.

O cromógeno utilizado foi a diamino-benzidina (Sigma-USA) 0,2% em TRIS (pH 7,4), adicionado a peróxido de hidrogênio (600 microlitros a 0,03%). A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Meyer's.

Tabela 1. Anticorpos utilizados.

Tipos	Clone	Diluição	Período de incubação	Tratamento prévio
AME	HHF-35 Biogenex- USA	1:300	60 min	-
CK14	LL 002 Biogenex- USA	1:40	60 min	Microondas
Lamina	LAM-89 Sigma	1:350	120 min	Pepsina 1% 0,01 HCl por 60 minutos

Resultados

Adenoma Pleomórfico

AME: A marcação da AME mostrou-se negativa em cinco dos seis tumores estudados. Em um dos tumores, no qual havia predominância de células fusiformes, a AME foi positiva em grupos destas células, marcando o citoplasma celular (Figura 1).

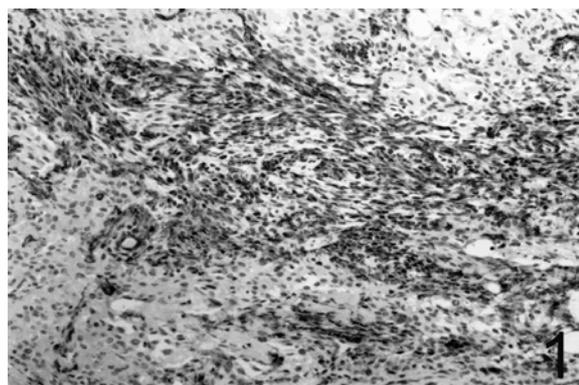


Figura 1. Adenoma Pleomórfico: Marcação positiva da AME em grupos de células fusiformes. x200.

CK14: A CK 14 foi positiva nas estruturas ductiformes, ora marcando as células luminais, ora as não luminais, ou ambas. Houve positividade também nas células poligonais e, em áreas focais, nas células plasmocitóides e fusiformes. Nas áreas de metaplasia escamosa, a CK 14 foi positiva nas células periféricas.

LN: Positividade à LN foi observada como uma linha mais ou menos espessa, ao redor de estruturas ductiformes; grupos de células poligonais e plasmocitóides, em áreas focais. Em um dos tumores, com predominância de células fusiformes, a LN foi observada em cada célula isoladamente. A marcação também foi positiva no estroma do tumor, mostrando-se ligeiramente mais discreta.

Mioepitelioma

AME: A AME expressou-se negativamente neste tumor.

CK14: A CK 14 marcou positivamente grupos de células plasmocitóides. Células luminais das estruturas ductiformes na periferia do tumor também expressaram a CK 14.

LN: Observou-se positividade à LN circundando e entremendo grupos de células nos grandes lençóis tumorais.

Adenoma de Células Basais

AME: Expressão da AME foi negativa para os tumores do tipo sólido, bem como para os do tipo túbulo-trabecular. Somente no subtipo tubular a marcação da AME foi discreta em torno de estruturas ductiformes.

CK14: Nos tumores do tipo sólido, a expressão da CK 14 foi heterogênea sem muita definição. A CK 14 marcou positivamente as células externas dos cordões celulares no tipo túbulo-trabecular. No subtipo tubular houve positividade às células da periferia das estruturas glandulares (Figura 2).

LN: No subtipo sólido, a marcação foi positiva em torno dos blocos de células. Nos tumores do tipo túbulo trabecular a LN aparecia como uma linha que delimitava trabéculas, enquanto que no tubular, houve discreta marcação em torno de estruturas glandulares.

Carcinoma Adenóide Cístico

AME: Nos tumores do tipo tubular, a AME expressou-se positivamente nas células externas dos túbulos e também ao redor de grupos de células. No subtipo cribriforme, foram observadas raras células marcadas pela AME em áreas focais. No subtipo sólido, a AME foi negativa.

CK14: Observou-se positividade à CK 14 nos tumores do tipo tubular, nas estruturas luminais e, às vezes, também nas CM (Figura 3). Nos tumores do tipo cribriforme, a CK 14 foi positiva nas células luminais dos ductos. No subtipo sólido, a expressão de CK 14 foi negativa.

LN: Nos tumores do tipo tubular, a LN foi positiva ao redor dos túbulos e também no estroma (Figura 4). No subtipo cribriforme, houve positividade ao redor dos cilindros de células, bem como delimitando os espaços pseudocísticos e no

estroma do tumor. No subtipo sólido, a LN circundava os grandes blocos celulares.

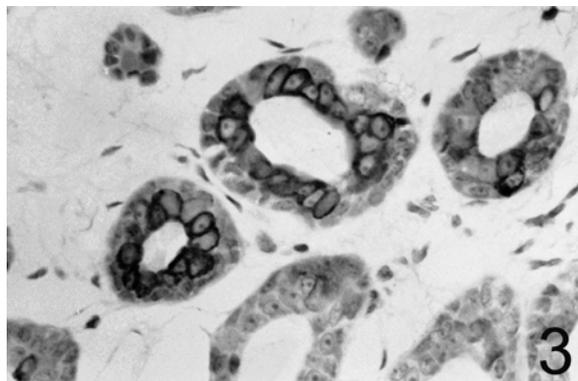


Figura 2. Adenoma de Células Basais - subtipo tubular: Positividade das CM à CK 14 em estruturas ductiformes bem formadas. x320.

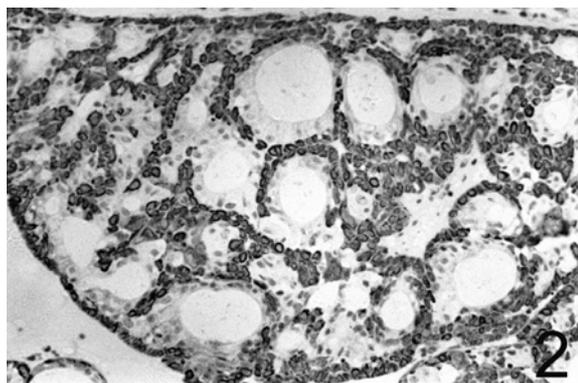


Figura 3. Carcinoma Adenóide Cístico - subtipo tubular: Presença de CK 14 nas células luminais. Observar a marcação positiva para a CK 14 em CM de uma estrutura tubular. x640.

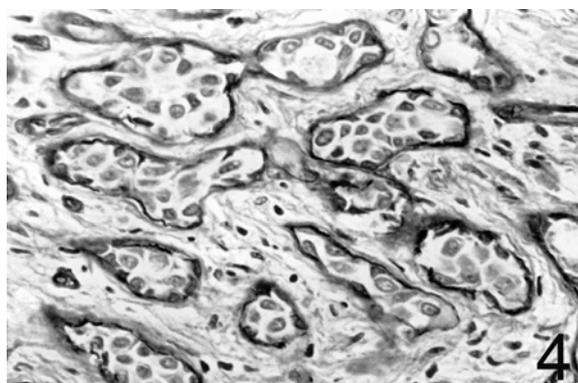


Figura 4. Carcinoma Adenóide Cístico-subtipo tubular: Presença de LN ao redor de CM de estruturas tubulares. x640.

Discussão

A célula mioepitelial (CM) normal apresenta diferenciação mio gênica revelada pela presença do filamento de actina músculo específica (AME)¹⁷ apresentando também CK 14⁴. Entretanto, raramente a CM tumoral mostra o mesmo citoesqueleto que a CM normal, revelando que enquanto neoplásica, exibe diferentes estágios de diferenciação⁸.

Em nossos estudos, pudemos notar que a presença da AME foi rara, tendo sido encontrada somente em um caso de adenoma pleomórfico, no citoplasma de células fusiformes; e nos casos de carcinoma adenóide cístico, tanto no subtipo tubular quanto no cribriforme.

É sabido que a CM tumoral, deixa de exibir os aspectos que a caracterizam como CM na glândula normal, como miofilamentos, hemidesmossomas, membrana basal, vesículas de micropinocitose¹⁶. Nos tumores, tais células por vezes exibem alguns vestígios desses componentes, permitindo sua caracterização como CM. Esse fato explicaria a ausência da AME na maioria das CM tumorais. Além disso, Araújo *et al.*, 1994, acrescentam que a AME deve ser em parte ou totalmente substituída pela vimentina nos tumores, e que essa última parece ser o indicador inicial da transformação tumoral.

Em glândulas normais, a CK 14 é positiva em CM dos ductos intercalares e também em células basais do ducto excretor. A presença dessa permite que as células constituam uma poderosa rede elástica que se une com a membrana basal para resistir ao stress mecânico, além de contribuir para a cito-arquitetura e integridade estrutural. Ou seja, a CK 14 realiza a ancoragem dessas células depois da diferenciação⁹. Em nossos resultados, observamos que a CK 14 só ocorreu nas CM de estruturas ductiformes quando essas eram bem formadas, mostrando que grande quantidade de células neoplásicas proliferantes e especialmente indiferenciadas não expressam tal filamento já que necessitam de frágil ligação com a membrana basal para rolar sobre essa, migrar e proliferar em várias direções¹¹. A ocorrência da CK 14 foi também detectada nas células poligonais e eventualmente em células modificadas, ambas do adenoma pleomórfico.

A CK 14 também mostrou, na verdade, resultados intrigantes. Nos casos de carcinoma adenóide cístico tubular e adenoma pleomórfico, observou-se que a CK 14 estava presente ora apenas nas células externas das estruturas ductais, ora nas duas camadas de células das mesmas. Esses resultados sugerem que momentos diferentes de diferenciação são vistos dentro do mesmo tumor. A marcação da CK 14 somente nas células externas das estruturas glandulares faz-nos supor que possivelmente, esse seja o momento em que o tumor melhor reproduza o

segmento de ducto intercalado da glândula salivar normal, indicando um maior grau de diferenciação da neoplasia, pois tais células também foram positivas para a AME. Entretanto, Araújo *et al.* (1990)¹ mostraram que essas células permanecem expressando vimentina, o que vem confirmar que nos tumores de glândula salivar a CM raramente alcança completa diferenciação. Além disso, é possível afirmar que o carcinoma adenóide cístico apresenta variantes histológicas de diferentes graus de diferenciação, conforme mimetizam histologicamente e imuno-histoquimicamente, com maior ou menor fidelidade, o segmento intercalar da glândula salivar normal.

Frente a esses parâmetros de diferenciação mioepitelial, é possível tecer alguns comentários com relação aos diversos tumores estudados.

O adenoma pleomórfico, em especial suas CM modificadas, e o mioepitelioma, não se mostram como modelos ideais para o estudo de diferenciação, uma vez que, as células não ficam mais confinadas à membrana basal que se fragmenta⁸. Com isso, essas passam a ser induzidas por um novo micro ambiente que as modificam, interferindo na diferenciação.

Os tumores incluídos pela Organização Mundial de Saúde na sua classificação no grupo dos adenomas de células basais, para nós, constituem um grupo heterogêneo de tumores quando se toma por parâmetro o estudo de diferenciação da CM. Há neoplasias com células pouco diferenciadas como no tipo sólido, até o tipo tubular com estruturas ductiformes bem formadas, na qual a CM mostrou grau maior de diferenciação.

O carcinoma adenóide cístico foi o que apresentou maior expressão de AME, principalmente no subtipo tubular, no qual também foi vista a presença de CK 14 nas CM. Portanto, podemos sugerir que o grau de malignidade não está totalmente relacionado ao grau de diferenciação das células tumorais, exceto dentro dos subtipos do mesmo tumor.

Sabe-se que arquitetura tecidual é determinada pela membrana basal. Tendo em vista a importância da membrana basal na diferenciação celular, nos propusemos também a estudar a relação da LN com a diferenciação mioepitelial em tumores de glândula salivar.

Utilizando o método imuno-histoquímico da avidina-biotina, pudemos constatar a presença da LN junto às CM que compunham as estruturas ductiformes, junto às CM isoladas, ou ao redor de grupos maiores de CM.

Encontramos a LN também constituindo o estroma dos tumores examinados, sendo sua presença proeminente no adenoma pleomórfico e no carcinoma adenóide cístico. Cheng *et al.* (1992)⁵ e Raitz *et al.* (2003)¹³ concordam que a matriz extracelular nos tumores com origem mioepitelial é formada pela

secreção e deposição de membrana basal produzida por essas células tumorais.

Segundo Cutler (1990)⁶, a LN tem um papel importante no controle da morfogênese das glândulas salivares e sugere que ela, de alguma maneira, influencia na regulação do balanço entre crescimento e desenvolvimento dos compartimentos ductais e acinares das glândulas. Portanto, parece que a LN está presente na glândula normal, sendo responsável pela sua morfogênese, angiogênese bem como nos tumores benignos e malignos. Já a CK 14 e a AME e especialmente a última, indicadores da diferenciação da CM, são afetados pela tumorigênese.

Uma análise conjunta da presença de AME, CK 14 e LN nos leva às seguintes considerações: parece não existir uma correlação entre a presença da LN com a diferenciação da CM tumoral. Jaeger (1995)¹⁰, estudando cultura de células de adenoma pleomórfico, concluiu que a formação de estruturas luminiais nesse tumor só ocorreu quando as células eram envoltas tridimensionalmente por membrana basal. Quando apenas uma das faces da membrana celular entrou em contato com os constituintes de membrana basal (matrigel), ocorreu morfo-diferenciação e não cito-diferenciação. Portanto, nos parece que a CM ou sua precursora continua a secretar LN, mesmo que imperfeitamente após o estímulo oncogênico, de modo que ela consegue influenciar na morfo-diferenciação, mas não na cito-diferenciação glandular.

Conclusão

É possível identificar diferentes estágios de diferenciação da célula mioepitelial nos vários tumores analisados bem como em seus subtipos, através da expressão da CK 14 e da actina músculo liso.

Em tumores de glândula salivar de origem mioepitelial, tanto a CK14 como a actina músculo liso são raramente expressas, com exceção dos tumores com estruturas ductiformes bem formadas, com maior grau de diferenciação.

Não existe uma correlação comprovada da laminina com a diferenciação da célula mioepitelial tumoral.

Referências

ARAÚJO, V.C.; ARAÚJO, N.S. Vimentin as a marker of myoepithelial cells in salivary gland tumors. *Arch. Otorhinolaryngol.*, v. 247, p. 252-5, 1990.

ARAÚJO, V.C. *et al.* Actin versus vimentin as a marker of myoepithelial tumoral cells in salivary gland tumors. A comparative study. *Oral Surg.*, Tokyo, v. 77, p. 387-91, 1994.

ARAÚJO, V.C. *et al.* Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl. Immunol.*, v. 8, n. 3, p. 195-202, 2000.

ARAÚJO, V.C.; SOUZA, S.O.M. Expression of different keratins in salivary gland tumours. *Oral Oncol.*, Oxford, v. 32b, n. 1, p. 14-18, 1996.

CHENG, J. *et al.* Basement membranes in adenoid cystic carcinoma. *Cancer*, Philadelphia, v. 69, p. 2631-2639, 1992.

CUTLER, L.S. The role of extracellular matrix in the morphogenesis and differentiation of salivary glands. *Adv. Dent. Res.*, Washington, DC, v. 4, p. 27-33, 1990.

DARDICK, I. *et al.* Salivary gland monomorphic adenoma. Ultrastructural, immunoperoxidase and histogenic aspects. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v. 115, p. 334-348, 1984.

DARDICK, I. *et al.* Immunohistochemical and ultrastructural correlates of muscle-actin expression in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas based on comparison of formalin and methanol fixation. *Virchows Archiv. Pathol.*, Berlin, v. 421, p. 95-104, 1992.

FUCHS, E.; CLEVELAND, D.W. Structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*, New York, v. 279, p. 514-519, 1998.

JAEGER, R.G. *Estudo de células cultivadas do adenoma pleomórfico humano. Análise do fenótipo celular frente à ação de proteínas da matriz extra-celular. Análise da distribuição citoesquelética do filamento intermediário vimentina.* 1995. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

LODUCCA, S.V.L. *et al.* Polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma: distinct architectural composition revealed by collagen IV, laminin and their integrin ligands. *Histopathology*, Oxford, v. 37, p.118-123, 2000.

MORINAGA, S. *et al.* Normal and neoplastic myoepithelial cells in salivary glands: an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.*, Philadelphia, v. 18, p. 1218-1226, 1987.

RAITZ, R. *et al.* A study of the extracellular matrix in salivary gland tumors. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 32, p. 290-6, 2003.

SEIFERT, G.; SOBIN, L.H. The world health organization's histological classification of salivary gland tumors. A commentary on the second edition. *Cancer*, Philadelphia, v. 70, n.2, p. 379-385, 1992.

SKALOVA, A.; LEIVO, I. Basement membrane proteins in salivary gland tumours. Distribution of type IV collagen and laminin. *Virchows Archiv. Pathol.*, Berlin, v. 420, n.5, p. 425-431, 1992.

TANDLER, B. *et al.* Ultrastructure of human labial salivary glands, III: myoepithelium and ducts. *J. Morphol.*, New York, v. 130, p. 227-46, 1970.

ZARBO, R.J. *et al.* Muscle-specific protein expression in normal salivary glands and pleomorphic adenomas; an immunocytochemical study with biochemical confirmation. *Mod. Pathol.*, v. 4, p. 621-6, 1991.

Received on August 10, 2004.

Accepted on December 06, 2004.