

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO TRIÂNGULO MINEIRO

***AVALIAÇÃO DO POTENCIAL METASTÁTICO E  
DA VASCULARIZAÇÃO NAS NEOPLASIAS  
EPITELIAIS DE GLÂNDULAS SALIVARES***

Kelen Christine do Nascimento Souza

Uberaba-MG

Junho/2007

Kelen Christine do Nascimento Souza

***AValiação DO POTENCIAL METASTÁTICO E  
DA VASCULARIZAÇÃO NAS NEOPLASIAS  
EPITELIAIS DE GLÂNDULAS SALIVARES***

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

*Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola*

Uberaba-MG

Junho/2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

S713a Souza, Kelen Christine do Nascimento.  
Avaliação do Potencial Metastático e da vascularização nas Neoplasias Epiteliais de glândulas salivares / Kelen Christine do Nascimento Souza. -- 2007.  
134 f. : tab. ; graf. ; fig.  
Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2007.  
Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola.

1. Glândulas salivares - Tumores - Teses. 2. Proteínas - Pesquisa. 3. Proteína VEGF - Teses. 4. Proteína PDEGF - Teses. 5. Imunohistoquímica - Teses. I. Título. II. Loyola, Adriano Mota.

CDU - 616.31- 006

## **AGRADECIMENTOS**

---

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Adriano Mota Loyola, meu orientador, mestre, amigo e conselheiro. Essa convivência diária tem revelado o seu brilhantismo como profissional, além de sua paixão e crença no desenvolvimento da pesquisa no Brasil. Esses ensinamentos e sua perseverança são pedras preciosas que vou levar em minha vida. A você, a minha gratidão por acreditar e me apoiar durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Fernando Luiz Dias, que prontamente nos recebeu no Instituto Nacional do Câncer, apoiando os nossos projetos e estabelecendo essa colaboração de tão grande valor! Muito obrigada, pela credibilidade, atenção e presteza que tem demonstrado a nossa equipe.

Ao Prof. Dr. Paulo Antônio Silvestre de Faria, por permitir nosso acesso à Divisão Interna de Patologia do INCA, que sob sua exemplar chefia e organização, possibilitou-nos um excelente ambiente de trabalho. Obrigada pela compreensão.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A Deus, meu Senhor e melhor amigo, obrigada por ter me abençoado a cada dia!

Ao meu amado esposo, Clovis, pelo amor, carinho e atenção! Muito obrigada por estar ao meu lado, suportando em amor todos os momentos que vivenciamos nessa etapa.

A você, o meu amor!

Ao meu filho João Pedro e minha filha Júlia, que nasceram durante o doutorado! Vocês são os melhores presentes que a mamãe poderia ganhar! Com vocês tenho aprendido a valorizar a vida, cada minuto que temos juntinhos, cada gesto, abraço e beijinhos! Foram momentos muito bons, às vezes ausente, mas sempre presentes no meu coração! Obrigada, por vocês e o papai, terem sido o meu porto seguro! Amo vocês!

Aos meus pais, Edson e Aires, meus irmãos Edson Júnior e Érika, meus cunhados e sobrinhos Pablo, Maria Eduarda e Lavínia, que durante esses anos estiveram sempre pertos, amando, brincando, apoiando e motivando! Obrigada por terem ajudado a amar e cuidar das crianças!

Aos meus amigos e conselheiros Rogério, Sônia e Eliana sempre presentes, com uma palavra de bom ânimo, carinho, apoio e oração. Muito obrigada!

Aos meus grandes amigos e professores, Dr. Sérgio Vitorino Cardoso e Dr. Paulo Rogério de Faria, foi uma honra trabalhar e conviver com vocês! Muito obrigada pelo apoio e dedicação!

Aos alunos e amigos, Sergio Sargenti, Marco Túlio, Luciana, Nadim, Gabriel, Leandro e Débora, que nos apoiaram na coleta de dados e atividades do laboratório. A presença de vocês foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia Bucal Selma e Ângela, pelo empenho e participação ativa nesse trabalho. Em especial, a Ângela que dedicou horas extras e finais

de semana para que pudéssemos cumprir os prazos com material do INCA, muito obrigada!

Às doutoras e preceptoras do Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ana Lúcia A. Eisenberg e Marilena F. Nascimento, pela confiança, disponibilidade e grande incentivo na realização deste trabalho.

Às funcionárias do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do INCA, Márcia Oliveira Andrade e Vânia Jorge Farah, pela paciência e disponibilidade diante de nossas dificuldades e solicitações.

Aos funcionários da Divisão Interna de Patologia do INCA: Anderson, Eanes, Sra. Zezé e Sr. Almir, pela presteza e receptividade.

Aos funcionários do Arquivo médico do INCA: Carlos, Claudionor, Fernando, George, Gerônimo, Helena, Sr. Ildálio, Lula, Lucinéia, Rolão, Rômulo, Valdenir, Vanilda e Vera, por colaborar com a pesquisa e tornar nossos os momentos de trabalho mais felizes.

Aos companheiros e professores do Curso de Pós-graduação em Patologia da UFTM, os quais tive o privilégio de conviver e compartilhar conhecimentos no doutorado. Em particular, a Elisângela que foi uma grande motivadora e companheira de viagem!

Aos que contribuíram financeiramente para a realização das viagens: Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFU, na pessoa do Prof. Carlos José Soares e ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (UFTM), na pessoa do Prof. Vicente de Paula Antunes Teixeira e Profa. Roseli Aparecida Silva Gomes, além do apoio contínuo da CAPES, FAPEMIG e CNPq.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1-3
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	4-31
3. HIPÓTESES .....	32-33
4. OBJETIVOS .....	34-36
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37-48
6. RESULTADOS .....	49-79
7. DISCUSSÃO .....	80-96
8. CONCLUSÃO .....	97-98
9. RESUMO .....	99-100
10. ABSTRACT .....	101-102
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	103-119

## **LISTA DE FIGURAS**

---

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Expressão de VEGF em glândula salivar normal. A) Presença de parênquima salivar apresentando unidades secretoras e seguimentos de ductos salivares intralobulares. Observar a presença de marcação intensa nos túbulos e ausência de marcação nas células acinares. Expressão antigênica também é observada em pequenos vasos no interstício glandular; B) Estroma de região periglandular, onde se observam feixes musculares esqueléticos com positividade moderada e pequenos vasos intensamente marcados. (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X)..... 54
- FIGURA 2-** Expressão de VEGF em AP. Área predominada pela presença de estruturas discreta expressão em células ductais luminais (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X). ductais onde prevalece ..... 55
- FIGURA 3-** Expressão de VEGF em APBG. A) Observam-se pequenos vasos expressos no estroma tumoral permeando áreas sólidas da lesão. Nesta região, as células neoplásicas são negativas; B) Presença de crescimento papilar, mostrando a marcação de células cubóides, em intensidade moderada; C) Área do tumor predominada pela presença de áreas ductais e sólidas justapostas. Aqui, nota-se intensa expressão antigênica citoplasmáticas em todas as células tumorais. (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400x)..... 56
- FIGURA 4-** Expressão de VEGF em CME. Em A, nota expressão antigênica predominantemente fraca associada às células intermediárias e epidermóides, incluindo aquelas situadas no revestimento do espaço cístico. Ausência de marcação nas células mucosas; B) Áreas cístico-papilares mostrando células colunares intermediárias com marcação de moderada intensidade; C) Nódulos com padrão de crescimento sólido, com presença de estruturas ductais. Todas as células, com aspecto de células intermediárias e epidermóides com intensa marcação para VEGF (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X)..... 56
- FIGURA 5-** Expressão de VEGF em CAC. A) Área da lesão com padrão cribriforme de crescimento. A marcação fraca é observada em células ductais luminais e, aparentemente, em células não luminais; B) área do tumor com padrão tubular apresentando marcação moderada em células luminais das estruturas ductais. Alguns vasos são positivos no mesmo padrão de intensidade de marcação, com expressão antigênica também presente em hemácias; C) Área com padrão tubular de crescimento com marcante expressão em células ductais luminais. (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X)..... 57
- FIGURA 6-** Expressão de PDEGF em AP. A) Áreas com predomínio de estruturas ductais, apresentando fraca expressão de PDEGF em células luminais; B) Outra área com estruturas epiteliais-mioepiteliais, onde os ductos mostram uma expressão antigênica mais acentuada (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X)..... 58
- FIGURA 7-** Expressão de PDEGF em APBG. A) Área do tumor predominada por estruturas sólidas e tubulares em que a expressão aparece fraca. B) Outra área caracteristicamente tubular em que as células luminais apresentam expressão antigênica intensa (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X)..... 59
- FIGURA 8-** Diferentes áreas do CME expressando PDEGF. A) Área constituída por estrutura cística e presença de células mucosas. Células intermediárias e epidermóides apresentando fraca expressão. B) Expressão variando de fraca a moderada nas células intermediárias e epidermóides em área sólida do CME; C) Padrão de crescimento tumoral semelhante ao visto em B, apresentando marcações fortes em células intermediárias e epidermóides (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X)..... 60

<b>FIGURA 9-</b> Expressão de PDEGF em CAC. A. Marcação de intensidade fraca (A) e moderada (B), observada principalmente em células luminais de estruturas cribriformes e tubulares (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X).....	60
<b>FIGURA 10-</b> Expressão de CD34 nos tumores de glândulas salivares. A) Presença de vasos marcados em áreas hialinizadas de uma área celular mioepitelial do AP (seta); B) Vasos marcados em estroma permeando áreas sólidas do APBG (seta); C) Marcação vascular em delicados septos CME (seta) e D) CAC com nódulos sólidos e estruturas tubulares mostrando estroma permeado por discretos vasos positivos (seta) (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400).....	62
<b>FIGURA 11-</b> Expressão de CD105 nos tumores de glândulas salivares. A) Região de AP com estroma parcialmente hialinizado, apresentando pequenos vasos com uma intensidade fraca de marcação (setas). Alguns destes vasos não mostram positividade de expressão; B) Região periférica ao crescimento do APBG mostrando pequenos vasos positivos para CD105 (setas); C) Pequenos vasos com marcação de moderada intensidade em estroma intra-tumoral (setas); D) Região estroma do CAC mostrando vasos com moderada intensidade de expressão antigênica (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X).....	64
<b>FIGURA 12 -</b> Comparação da expressão de CD34 entre o grupo de tumores benignos (AP) e os tumores <i>Pmalig</i> (APBG, CME e CAC).....	69
<b>FIGURA 13-</b> Comparação da expressão de CD34 entre os tipos histológicos das neoplasias malignas primárias entre si (APBG, CME e CAC).....	70
<b>FIGURA 14-</b> Comparação da expressão de CD105 entre o grupo de tumor benigno (AP) e os tumores <i>Pmalig</i> (APBG, CME e CAC).....	71
<b>FIGURA 15-</b> Comparação da expressão de CD105 entre os tipos histológicos das neoplasias malignas primárias entre si (APBG, CME e CAC).....	71
<b>FIGURA 16 -</b> Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo estadiamento clínico pelo sistema TNM ( $p < 0,0001$ ).....	76
<b>FIGURA 17 -</b> Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo o tamanho da lesão ( $p < 0,0001$ ).....	76
<b>FIGURA 18-</b> Curva Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo a presença ( <i>PM</i> ) ou ausência ( <i>PNM</i> ) de metástases ( $p < 0,0001$ ).....	76
<b>FIGURA 19-</b> Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo a imunomarcção de CD34 ( $p = 0,02$ ).....	77
<b>FIGURA 20-</b> Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo o grau histológico (tubular, cribriforme e sólido) ( $p = 0,01$ ).....	77
<b>FIGURA 21-</b> Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes com CAC, segundo a imunomarcção de CD34 ( $p = 0,05$ ).....	77

## **LISTA DE TABELAS**

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Tipos tumorais epiteliais de glândulas salivares reconhecidos pela Classificação dos Tumores de Glândulas Salivares de origem epitelial da OMS (BARNES et al, 2005)	39
<b>Tabela 2 -</b>	Distribuição dos casos selecionados classificadas segundo o tipo histológico e a presença ou não de metástases após reavaliação histopatológica e preenchimento dos critérios de inclusão, provenientes do Instituto Nacional do Câncer no período de 1998 a 2003.	40
<b>Tabela 3 -</b>	Anticorpos primários e condições de trabalho utilizadas na técnica imuno-histoquímica.	43
<b>Tabela 4 -</b>	Distribuição dos tumores epiteliais de glândulas salivares da amostra estudada, provenientes do INCA, diagnosticadas e tratadas no período de 1997 a 2003, de acordo com sua natureza histológica e principais dados sócio-demográficos e clínico.	52
<b>Tabela 5 -</b>	Distribuição das neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares de origem epitelial selecionadas para compor a amostra, registradas no INCA/MS-RJ, no período de 1998 a 2003, segundo: tipos histológicos, localização, procedimento realizado, recorrência, metástases, e estado atual.	53
<b>Tabela 6 -</b>	Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares ensaiados para identificação de CD34 segundo a média e a variação percentual de células marcadas.	65
<b>Tabela 7 -</b>	Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares ensaiados para identificação de CD105 segundo a média e a variação percentual de células marcadas.	66
<b>Tabela 8 -</b>	Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares, benignas e malignas (primários não metastatizantes e primários metastatizantes), ensaiadas segundo a presença de reatividade para VEGF.	67
<b>Tabela 9 -</b>	Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares, benignas e malignas (primários não metastatizantes, primários metastatizantes), ensaiadas segundo a presença de reatividade para PDEGF.	68
<b>Tabela 10 -</b>	Associação da expressão de VEGF nos AP e no grupo de neoplasias <i>Pmalig</i> <sup>1</sup> .	72
<b>Tabela 11 -</b>	Associação da expressão de PDEGF nos AP e no grupo de neoplasias <i>Pmalig</i> <sup>1</sup> .	73
<b>Tabela 12 -</b>	Associação da expressão de PDEGF entre APBG, CME e CAC <sup>1</sup> .	73
<b>Tabela 13 -</b>	Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares, benignas e malignas (primários não metastatizantes, primários metastatizantes e lesão metastática), ensaiadas segundo a presença de reatividade para CD34 e CD105. ( <i>cut-off foi a mediana de marcação no AP, md= 8,25 para CD34 e md=0,1 para CD105</i> ).	74
<b>Tabela 14 -</b>	Avaliação do impacto prognóstico de características clínico-patológicas de neoplasias malignas de glândulas salivares.	74
<b>Tabela 15 -</b>	Avaliação do impacto prognóstico de marcadores angiogênicos neoplasias malignas de glândulas salivares.	75
<b>Tabela 16 -</b>	Avaliação do impacto prognóstico de marcadores angiogênicos nos subtipos histológicos das neoplasias malignas de glândulas salivares.	75
<b>Tabela 17 -</b>	Correlação entre a expressão de CD34, CD105, VEGF e PDEGF nos diferentes grupos de neoplasias.	79

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AP – Adenoma Pleomórfico

ANG- Angiopoetina

APBG- Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade

BX- biópsia incisional

CAC- Carcinoma Adenóide Cístico

CCA- Carcinoma de Células Acinares

CE- Carcinoma Epidermóide

CD- grupos de diferenciação

CID- Código Internacional de Doenças

CME- Carcinoma Mucoepidermóide

*cut-off*- ponto de corte

DMV- densidade microvascular

EC- enucleação cirúrgica

ELISA- ensaio imunoenzimático

FCP- fator de crescimento placentário

FGFb- fator de crescimento fibroblástico básico

HIF- Fator Indutor de Hipóxia

*hot spots*- áreas de maior vascularização

HUVEC- células endoteliais da veia humana umbilical

IH- Imuno-histoquímica

MC- metástases cervical

md- mediana

MD- metástases à distância

mm<sup>2</sup>- milímetro quadrado

N- número da amostra

NA - não se aplica

OñRC- Óbito não relacionado ao câncer

ORC- Óbito relacionado ao câncer

PDEGF- Fator de crescimento Endotelial derivado de Plaquetas

*Pmalig*- primários malignos, incluindo todos os tipos histológicos PM e PNM

*PM*- grupo de tumores primários metastatizantes formados pelo APBG, CME e CAC.

*pm*- neoplasias primárias metastatizantes

*PNM*- grupo de tumores primários não metastatizante formados pelo APBG, CME e CAC.

*pnm*- neoplasias primárias não metastatizantes

RXT- radioterapia

TGF - fator transformador de crescimento

TP- Timidina fosforilase

VCDm- Vivo com Doença metastática

VCDp- Vivo com doença primária

VCDr- Vivo com doença recidiva

VEGF- Fator vascular de crescimento endotelial

VSD -Vivo sem doença

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

# INTRODUÇÃO



## 1           **1- INTRODUÇÃO**

2

3           As neoplasias epiteliais de glândulas salivares constituem um grupo de doenças  
4 cuja expressão clínico-patológica traduz-se em uma ampla variedade de lesões. Embora  
5 tais tumores sejam incomuns, não são raros. A incidência anual de tumores das glândulas  
6 salivares no mundo está em torno de 0,5 a 1,2 casos por 100.000 pessoas por ano e  
7 correspondem a aproximadamente 3% a 10% das neoplasias que acometem a região de  
8 cabeça e pescoço (EVESON & CAWSON, 1985). Entre as neoplasias benignas e malignas  
9 que comumente afetam as glândulas salivares, podemos citar: Adenoma Pleomórfico (AP),  
10 Carcinoma Mucoepidermóide (CME), Carcinoma Adenóide Cístico (CAC) e  
11 Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau (APBG) (ELLIS & AUCLAIR, 1996).

12           Para as neoplasias malignas, a ocorrência de metástases tem sido considerada um  
13 fator prognóstico relevante. A ausência de metástases está relacionada a um melhor  
14 prognóstico e uma maior sobrevida, enquanto a ocorrência de metástases tumoral é a  
15 principal intercorrência relacionada à mortalidade em pacientes com câncer  
16 (VERMEULEN et al., 2002). Metástases regionais e à distância no CME afetam cerca de 3  
17 a 15% e 6 a 15% dos pacientes, respectivamente (NASCIMENTO et al., 1986a;  
18 BRADLEY et al., 2001), e as taxas de sobrevida de cinco e dez anos, situam-se em torno  
19 de 60% e 40%, respectivamente (HICKMAN et al., 1984; CLODE et al., 1991; SUZUKI  
20 et al., 1998; OKABE et al., 2001). Para o CAC, a ocorrência de metástases regionais e à  
21 distância chegam a 47% e 50%; a sobrevida de cinco anos fica entre 45% a 80%,  
22 diminuindo para entre 22% e 44% em 10 anos (COWIE & POINTON, 1984; SPIRO &  
23 HUVOS, 1992). Nos APBG as metástases regionais podem ocorrer em 9% dos casos, as  
24 metástases à distância são raras e o prognóstico parece relativamente bom, sendo que cerca

1 de 80% dos pacientes ficam livres da doença após o tratamento (VINCENT et al., 1994;  
2 CASTLE et al., 1999; BRADLEY, 2001).

3 Grande número de evidências tem apontado o fenômeno da angiogênese como  
4 intimamente vinculado ao desenvolvimento das metástases. Incertezas ainda persistem se  
5 sua participação se dá de forma passiva ou ativa neste processo (BOCKHORN et al.,  
6 2007). Em função disto, nas últimas décadas têm se formado a opinião que a angiogênese  
7 pode vir a se constituir em um potencial marcador biológico de prognóstico e um fator  
8 preditivo de metástases em tumores sólidos humanos (HASAN et al., 2002). Neste sentido,  
9 avaliações da distribuição e quantificação da angiogênese têm sido realizadas utilizando-se  
10 de marcadores moleculares de endotélio, fatores associados ao crescimento e inibição da  
11 angiogênese. Dentre os fatores estudados destacam-se o Fator Vascular de Crescimento  
12 Endotelial (VEGF) e marcadores endoteliais como o CD31 e CD34 sem, contudo, se obter  
13 resultados consistentes. Esta situação em parte é decorrente das circunstâncias vinculadas  
14 ao estudo como qualidade da amostra estudada, variações na técnica de identificação  
15 antigênica, e dos antígenos pesquisados.

16 No presente trabalho foi proposta uma ampliação nesta investigação, a partir do  
17 estudo da expressão dos fatores de crescimento vascular VEGF e PDEGF (ainda não  
18 avaliado em tumores de glândulas salivares) e os marcadores de endotélio vascular CD34 e  
19 de CD105, este em especial considerado marcador específico de angiogênese, em um  
20 grupo de neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares. Nesta avaliação,  
21 procuramos identificar a associação entre a expressão destes antígenos e a ocorrência de  
22 metástases.

23

24

25

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

**REVISÃO DA LITERATURA**



## 1           **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### 2           **2.1. NEOPLASIAS EPITELIAIS DE GLÂNDULAS SALIVARES**

#### 3           • **Adenoma Pleomórfico**

4           O Adenoma Pleomórfico (AP) é a neoplasia benigna de glândula salivar mais comum.  
5           Pode ocorrer em qualquer idade, porém é mais comum em pacientes acima de quarenta  
6           anos e possui uma discreta tendência a acometer preferencialmente o sexo feminino  
7           (NARDONE et al., 2002). Clinicamente, o AP apresenta-se como crescimento nodular  
8           lento e indolor. Para as glândulas menores, os locais mais acometidos são palato, lábio  
9           inferior e bochecha; para as glândulas maiores a parótida é o sítio preferencialmente  
10          afetado (ELLIS et al., 1991).

11          Histologicamente observam-se estruturas epiteliais-mioepiteliais caracterizadas  
12          pela presença de espaços ductiformes revestidos por células colunares luminais e  
13          envolvidos por uma ou mais camadas de células poligonais com diferentes padrões de  
14          diferenciação mioepitelial. Essa variabilidade é que dá um aspecto pleomórfico ao tumor,  
15          traduzido pela presença de áreas mixóides, condróides, hialinas, osteóides e lipomatosas  
16          (ELLIS et al., 1991; ELLIS & AUCLAIR, 1996; BARNES et al., 2005).

17          Devido à sua natureza benigna, os APs são tratados por excisão cirúrgica  
18          conservadora, observando sempre a necessidade de extensão extra-capsular (BRADLEY,  
19          2001). A incidência de recidiva do AP na parótida varia de 20 a 45% quando se realiza  
20          apenas a enucleação; em 2 a 5%, depois de uma parotidectomia parcial e até 0,4% quando  
21          a parotidectomia total é realizada (MERCANTE et al., 2002; ITO et al., 2005). Nas  
22          glândulas salivares menores, o risco de recidiva varia de 5 a 30% nas excisões cirúrgicas  
23          com margem de segurança. O prognóstico é considerado excelente, com um índice de cura  
24          de aproximadamente 95% (MERCANTE et al., 2002; ITO et al., 2005).

1           As lesões recidivantes apresentam maior potencial de transformação maligna,  
2 principalmente nos casos de AP localizados nas glândulas salivares menores. A  
3 transformação maligna do AP tem sido descrita, especialmente nos casos de longa duração  
4 e recidivas freqüentes (ELLIS & AUCLAIR, 1996). Nestes casos, as neoplasias são  
5 classificadas como tumor misto metastatizante ou Carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico  
6 (ELLIS & AUCLAIR, 1996; BRADLEY, 2001). As metástases usualmente são observadas  
7 em pulmões, ossos e outras vísceras (BRADLEY, 2001).

8

9           • **Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade**

10           O Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade (APBG) é  
11 considerado menos agressivo apresentando crescimento lento e indolor. O local de maior  
12 ocorrência é o palato (EVANS & BATSAKIS, 1984). No entanto, pode ser encontrado em  
13 outros locais, como lábio superior e bochecha (LOYOLA et al., 1995; KELSCH et al.,  
14 1997). Alguns autores mostraram a ocorrência de APBG em glândulas parótidas  
15 (RITLAND et al., 1993). Esta neoplasia tende a acometer mais mulheres, com maior  
16 incidência entre quarenta a setenta anos (VINCENT et al., 1994).

17           Histologicamente, as células tumorais apresentam forma cuboidal ou colunar, núcleos  
18 ovóides, vesiculosos, com homogeneidade em forma e tamanho. Vários padrões de  
19 crescimento são identificáveis entre os quais sólido, em cordões, ductal, cribriforme e  
20 cístico-papilar. As figuras mitóticas são incomuns. O estroma pode apresentar  
21 transformação mucóide ou hialinizações (KELSCH et al., 1997; ARAUJO et al., 1999).  
22 Invasão perineural é um achado comum (LUCARINI et al., 1994).

23           O tratamento mais adequado é a excisão cirúrgica. A sua recorrência é observada em  
24 17% dos casos e as metástases variam de 0,1% à 57,5% (VINCENT et al., 1994;  
25 CASTLE et al., 1999; EVANS & LUNA, 2000; POGODZINSKY et al., 2006).

## 1                   • **Carcinoma Mucoepidermóide**

2           Os Carcinomas Mucoepidermóides (CME) são os tumores malignos mais  
3   freqüentes de glândulas salivares, podendo representar 3 a 20% dos tumores de glândulas  
4   salivares e 12 a 40% das lesões malignas (AUCLAIR et al., 1992; LOYOLA et al., 1995;  
5   GUZZO et al., 2002). Podem acometer pacientes em qualquer faixa etária, mas apresentam  
6   pico de prevalência na 4ª e 5ª décadas, afetando ambos os sexos igualmente e acometendo  
7   preferencialmente a parótida e o palato entre as glândulas menores intra-orais (SPIRO et  
8   al., 1978; NASCIMENTO et al., 1986a, AUCLAIR & ELLIS, 1991; LOYOLA et al.,  
9   1995, BRANDWEIN et al., 2001). Usualmente, apresentam-se como aumento de volume  
10  assintomático, eventualmente associado à ulceração superficial, dor e parestesia  
11  (LOYOLA et al., 1995; GUZZO et al., 2002).

12       Histopatologicamente são caracterizados por crescimentos sólidos e císticos,  
13       constituídos por vários tipos celulares, tais como: células mucosas, epidermóides,  
14       intermediárias, claras e colunares (AUCLAIR et al., 1992). A gradação histológica dos  
15       carcinomas mucoepidermóides tem sido realizada utilizando vários critérios (AUCLAIR  
16       et al., 1992; BRANDWEIN et al., 2001). No entanto, estas classificações apresentam  
17       limitações quanto à reprodutibilidade de certos parâmetros, visto que incluem potencial  
18       subjetivo de avaliação, em especial o grau de anaplasia do tumor (AUCLAIR et al.,  
19       1992; HICKS et al., 1994; ELLIS & AUCLAIR, 1996; PIRES, 2002). Mais  
20       recentemente, a OMS (BARNES et al, 2005) tem recomendado os critérios  
21       desenvolvidos por Auclair et al. (1992) que se baseiam na proporção do componente  
22       intra-cístico, presença de invasão neural, necrose e anaplasia, quantificação de mitoses  
23       que favoreceram a distinção entre os três graus histológicos: baixo, moderado e alto.  
24       A modalidade terapêutica está vinculada à gradação histopatológica, localização e  
25       estágio clínico do tumor. Usualmente, o a ressecção cirúrgica ampla é a mais indicada,

1 associada ou não ao esvaziamento cervical, com indicação eventual de radioterapia pós-  
2 operatória (HAMPER et al., 1989; BRANDWEIN et al., 2001). O prognóstico depende  
3 do estágio e do grau histológico do tumor (BRADLEY, 2001).

4 As taxas médias de recidivas locais do CME situam-se próximas a 15%, variando de  
5 10% para os tumores de baixo grau a 75% para os de alto grau (PIRES et al., 2002). As  
6 taxas de sobrevida de cinco e dez anos, para todos os graus de malignidade situam-se  
7 em torno de 60 a 70% e 40 a 60%, respectivamente (HICKMAN et al., 1984; CLODE et  
8 al., 1991; SUZUKI et al., 1998; OKABE et al., 2001).

9 As metástases regionais e à distância do CME afetam cerca de 3 a 15% e 6 a 15% dos  
10 pacientes, respectivamente (NASCIMENTO et al., 1986a; BRADWEIN et al., 2001;  
11 PIRES, 2002) e são influenciadas pelo grau histológico, estágio clínico e a localização  
12 dos tumores (SPIRO et al., 1978; AUCLAIR et al., 1992). As metástases à distância têm  
13 sido identificadas entre treze e sessenta meses após o tratamento dos CMEs de alto grau,  
14 e normalmente estão localizadas nos pulmões, fígado, osso e parede abdominal  
15 (BRADLEY, 2001). Não obstante, há uma ampla variação cronológica descrita para o  
16 aparecimento de metástases.

17

#### 18 • **Carcinoma Adenóide Cístico**

19 O Carcinoma Adenóide Cístico (CAC) é um dos mais comuns e bem reconhecidos  
20 tumores malignos glandulares. Os locais de ocorrência mais freqüentes são glândula  
21 parótida, glândula submandibular e glândulas salivares menores do palato (SPIRO &  
22 HUVOS, 1992; KIM & SUNG, 1994; FIGUEIREDO, 1995; ELLIS & AUCLAIR, 1996).  
23 Raramente acomete pacientes com menos de vinte anos de idade, sendo comum entre a 4ª e  
24 a 6ª década de vida (ELLIS & AUCLAIR, 1996). Não há predileção por sexo (SPIRO &  
25 HUVOS, 1992). Geralmente, o crescimento é lento e a dor um achado comum desde o

1 início da doença. Em alguns casos pode provocar paralisia facial resultante da infiltração  
2 neoplásica nos espaços perineurais desta lesão (SPIRO & HUVOS, 1992; KIM & SUNG,  
3 1994).

4 Histopatologicamente são reconhecidos três padrões morfológicos: cribriforme,  
5 representado por cordões celulares que se anastomosam, originando espaços  
6 pseudocísticos e ductais; tubular com presença de estruturas tubulares em um estroma  
7 hialinizado; e sólido, no qual observam-se ilhotas ou ninhos celulares com raras  
8 formações pseudocísticas ou ductais, onde a necrose pode ser encontrada. Em geral, os  
9 três padrões podem ser vistos na mesma lesão (BATSAKIS et al., 1990; BARNES et  
10 al., 2005).

11 Geralmente, o tratamento de escolha é excisão cirúrgica radical combinada à  
12 radioterapia pós-operatória. A dissecação dos linfonodos é recomendada para os casos  
13 clinicamente positivos (MACIEJEWSKI et al., 2002). O prognóstico para o CAC é  
14 considerado pobre. Usualmente, o paciente vai a óbito devido a recidivas locais e  
15 metástases à distância (NASCIMENTO et al., 1986b; SPIRO & HUVOS, 1992; KIM &  
16 SUNG, 1994).

17 De acordo com Witten et al., 1990 e Spiro et al., 1992 a recorrência local é  
18 observada em quase 32% dos casos. O risco de metástase à distância também é alto (40%)  
19 e pode ocorrer em menos de oito anos depois do tratamento (SPIRO & HUVOS, 1992). O  
20 CAC apresenta uma alta probabilidade de desenvolver metástase quando ocorre em  
21 glândula submandibular e língua, com médias em torno de 47.1% e 50% , respectivamente.  
22 Na região do palato a incidência de metástase é baixa (HAUNG et al., 1997). A  
23 disseminação metastática ocorre mais comumente para os pulmões, linfonodos e ossos  
24 (HAUNG et al., 1997 e BRADLEY, 2001). Os pacientes com CAC têm uma sobrevida de  
25 cinco anos em 45% a 80% dos casos. Em dez anos, esta sobrevida diminui para 22 a 44% e

1 em 25 anos cai para 15% (COWIE & POINTON, 1984; NASCIMENTO et al., 1986b;  
2 SPIRO & HUVOS, 1992;).

3 A despeito dos progressos alcançados no diagnóstico e terapêutica dos tumores  
4 malignos, a elaboração do seu prognóstico está calcada preferencialmente nos aspectos  
5 morfo genéticos e no estadiamento clínico das lesões. A identificação de marcadores  
6 moleculares que prenunciassem o comportamento da lesão poderia contribuir  
7 significativamente para o aperfeiçoamento do prognóstico e tratamento. Entre estes se  
8 destacam aqueles associados à progressão tumoral, em especial à metástase.

9 O processo de metastatização é complexo, requer angiogênese, desprendimento das  
10 células do tumor primário, adesão e invasão da membrana basal, migração no estroma,  
11 penetração no sistema vascular ou linfático, escape da vigilância imunológica e  
12 colonização de locais distantes (ELLIS & FIDLER, 1996; VERMEULEN et al., 2002;  
13 BOCKHORN et al., 2007). No entanto, várias funções celulares associadas à metástase  
14 ainda não foram esclarecidas em nível bioquímico e genético. A elucidação destes  
15 fenômenos levaria às novas estratégias para o diagnóstico e tratamento do câncer, que  
16 reduziriam a incidência de metástase e melhorariam o prognóstico das lesões (HASAN et  
17 al, 2002).

## 18 **2.2. ANGIOGÊNESE**

19 Pouco se conhece sobre os mecanismos que desencadeiam a carcinogênese e a  
20 progressão dos tumores de glândulas salivares. Da mesma forma, permanece por ser  
21 esclarecido o significado de vários marcadores moleculares associados a estes eventos e  
22 sua relação com o prognóstico tumoral (LIM et al., 2003; SOUZA et al., 2006).

23 Neste contexto, assume especial significado a angiogênese tumoral que tem se  
24 apresentado como potencial marcador de comportamento biológico e prognóstico.

1 Inúmeros trabalhos têm investido na identificação de seu papel como preditor de  
2 metástases em tumores sólidos (HASAN et al., 2002; VERMEULEN et al., 2002;  
3 SHARMA et al., 2005).

4 A formação de vasos sanguíneos tem sido identificada sob duas designações:  
5 angiogênese e vasculogênese. A angiogênese foi estabelecida como brotamento de novos  
6 vasos a partir de células endoteliais diferenciadas de um vaso pré-existente. A  
7 vasculogênese é a formação de novos vasos sanguíneos *in situ*, em local onde não há  
8 vasos, através de estímulo de proliferação dos angioblastos (células precursoras do  
9 endotélio), originários do mesoderma esplâncnico. (CONWAY et al., 2001).

10 O processo de angiogênese desenvolve-se em duas fases: brotamento e maturação  
11 (FOLKMAN, 1995; CARMELIET, 2000). O brotamento é um processo complexo que  
12 envolve quatro etapas principais: 1) Lise da membrana basal que circunda o vaso por  
13 proteases secretadas pelas células endoteliais; 2) Migração de células endoteliais  
14 circulantes para o sítio de formação do vaso, onde proliferam e formam uma espécie de  
15 broto; 3) Nova proliferação e diferenciação das células endoteliais com conseqüente  
16 crescimento e formação da luz do novo vaso; e 4) Secreção de fatores de crescimento pelas  
17 células endoteliais que atraem células de suporte (pericitos e células musculares lisas), e  
18 formam a membrana basal. Tanto as células de suporte quanto a membrana basal são  
19 essenciais para o funcionamento e estabilidade do vaso formado. Nesse estágio final, os  
20 vasos adquirem características especializadas adequadas ao tecido ou órgão a que  
21 pertencem (CARMELIET, 2000).

22 A angiogênese é uma etapa essencial no desenvolvimento tecidual pré e pós-natal e  
23 também participa na cicatrização, reprodução, doenças inflamatórias e degenerativas,  
24 distúrbios metabólicos e neoplasia. A angiogênese associada aos tumores sólidos é um

1 processo em que novos capilares são formados no estroma tumoral a partir de células  
2 endoteliais de vasos pré-existentes (LIOTTA et al., 1991; FOLKMAN, 1995).

3 Diversos estudos têm procurado identificar marcadores de angiogênese,  
4 principalmente após 1971 quando Folkman propôs que a terapia anti-angiogênica poderia  
5 ser coadjuvante no tratamento do câncer. Desde então, considerou-se que o crescimento  
6 tumoral é angiogênese-dependente, a partir do isolamento do "fator de angiogênese do  
7 tumor". Numerosos fatores angiogênicos têm sido identificados e os mais freqüentemente  
8 encontrados em tumores são o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb), o fator de  
9 crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento endotelial derivado de  
10 plaquetas (PDEGF) (SENGUPTA et al., 2003). Estes são liberados pelas células tumorais,  
11 células endoteliais ou a partir da matriz extracelular. A formação de novos vasos  
12 sangüíneos também requer a inibição dos fatores inibidores da angiogênese, tais como:  
13 trombospondina-1, fator plaquetário 4, inibidores teciduais das metaloproteinases,  
14 prolactina, angiostatina, FGFb, fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) e interferon  
15 (FOLKMAN, 1995; BOCKHORN et al., 2007; RUDDON, 2007).

16 Na angiogênese tumoral tem sido verificado que tumores com mais de 1 mm de  
17 diâmetro necessitam de recrutar novos vasos, para garantir o suprimento de oxigênio e  
18 nutrientes, e a remoção de metabólicos tóxicos (FOLKMAN, 1995). Evidências  
19 experimentais demonstram que a angiogênese também contribui com o processo  
20 metastático, pois na medida em que há expansão da vascularização, maior é a superfície  
21 para o escape de células tumorais para a circulação. Este fenômeno pode em parte ser  
22 facilitado pela imaturidade dos novos vasos formados (FOLKMAN et al., 1989). Além  
23 disso, os fatores angiogênicos produzidos pelas células tumorais induzem a produção de  
24 enzimas, tais como, ativadores de plasminogênio e collagenases que contribuem para a

1 degradação da membrana basal. Estes eventos facilitam a penetração de células tumorais  
2 no interior dos vasos neoformados e favorecendo a metástase, indicando que o fenômeno  
3 de metástase é dependente da angiogênese intratumoral (VORAVUD et al.,1999;  
4 BOCKHORN et al., 2007; RUDDON, 2007).

5 O papel da angiogênese na progressão do tumor primário e sua associação com  
6 metástases hematogênicas e sobrevida tem sido extensivamente estudado, principalmente  
7 no carcinoma de mama, tumores de pulmão, trato gastrintestinal e geniturinário,  
8 demonstrando associação significativa entre a intensidade da neovascularização e um pior  
9 prognóstico (WEIDNER et al., 1991; DICKINSON et al., 1994).

#### 10 **2.2.1. Fator Vascular de Crescimento Endotelial**

11 Um número muito grande de fatores angiogênicos associados a tumores já foi  
12 isolado, sendo um dos mais importantes o fator angiogênico derivado de tumor  
13 reconhecido como fator vascular de crescimento endotelial (VEGF).

14 O VEGF é uma glicoproteína com um peso molecular de aproximadamente 45 kDa,  
15 sendo sintetizada e expressa em larga variedade de tecidos humanos normais (FOLKMAN,  
16 1992; FERRARA et al., 2003).

17 VEGF foi purificado e clonado em 1980 baseado em sua atividade indutora de  
18 permeabilidade vascular (SENGER et al., 1986; KECK et al., 1989; DVORAK et al.,  
19 1995) e como mitogênico para células endoteliais (FERRARA & HENZEL 1989; LEUNG  
20 et al, 1989).

21 Até o presente momento, cinco isoformas e dois receptores de VEGF foram  
22 seqüenciados. O VEGF-A, que regula o crescimento sanguíneo, VEGF-B está  
23 preferencialmente expresso no endotélio sanguíneo, o VEGF-C e o VEGF-D que regulam  
24 a angiogênese linfática, e o fator de crescimento placentário (PIGF) que é um fraco indutor

1 de angiogênese e de permeabilidade vascular (KECK et al., 1989; DVORAK et al., 1995;  
2 FERRARA et al., 2003).

3 A regulação da expressão de VEGF tem sido associada à tensão de oxigênio, sendo  
4 aumentada na presença de hipóxia e de fatores de crescimento como fator de  
5 transformação de crescimento ( $TGF\alpha$ ,  $TGF\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas  
6 (PDGF), fator de crescimento semelhante a insulina, e fator de crescimento de  
7 queratinócitos (FERRARA et al., 2003).

8 Por mais de uma década o papel de VEGF na regulação da angiogênese foi objeto  
9 de intensa investigação (FERRARA et al., 2003). O crescimento de um novo vaso e a sua  
10 maturação são processos altamente complexos e coordenados, e requerem a ativação de  
11 uma série de receptores por numerosos ligantes (YANCOPOULOS, 1992; FERRARA,  
12 1999), mas o sinal de VEGF parece representar um passo limitante na fisiologia  
13 angiogênica. VEGF também é importante na angiogênese patológica, como aquela  
14 associada ao crescimento tumoral (FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997). Outro papel  
15 importante do VEGF é o de fator de sobrevivência para as células endoteliais. Em estudo *in*  
16 *vitro*, VEGF inibiu a apoptose induzindo a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2  
17 (GERBER et al., 1998). *In vivo*, a inibição de VEGF resultou em extensa apoptose com  
18 mudanças nos vasos dos neonatos, mas não dos camundongos adultos (GERBER et al.,  
19 1999). Além disso, uma dependência marcante de VEGF pelas células endoteliais  
20 neoformadas, mas não nos vasos estabilizados dos tumores tem sido identificada (YUAN  
21 et al., 1996) A cobertura dos pericitos tem sido proposta como uma das chaves de eventos  
22 que resultam na perda da dependência de VEGF (BENJAMIN et al., 1998). A importância  
23 clínica do VEGF é enfatizada pelo fato que a inibição de VEGF inibe a angiogênese e o  
24 crescimento tumoral em modelos *in vivo* (KIM et al., 1993; SALEH et al., 1996).

1           Em tecidos normais de adultos a expressão de VEGF foi encontrada no cérebro,  
2 rins, pâncreas, glândulas salivares, músculo, adipócitos, pulmão e vasos de grande calibre  
3 (MAHARAJ et al., 2006). Os autores concluíram que a baixa expressão de VEGF nos  
4 tecidos normais favorecia a sobrevivência dos vasos.

5           Nos tecidos neoplásicos, o aumento da expressão de VEGF tem sido correlacionado  
6 com o aumento da densidade microvascular (DMV), influenciando o aparecimento de  
7 metástases e um pior prognóstico em carcinoma gástrico (MAEDA et al., 1996; 1999),  
8 carcinoma de cólon (TAKAHASHI et al., 1997), carcinoma de pulmão que não os de  
9 pequenas células (FONTANINI et al., 1998), carcinoma de mama linfonodo negativo  
10 (LINDERHOLM et al., 1998) e carcinoma epidermóide oral (MAEDA et al., 1998; SHIH  
11 et al., 2000). Mas, em outros estudos têm sido observada ausência de correlação entre  
12 VEGF e MVD como no carcinoma epidermóide oral (MORIYAMA et al., 1997).

13           Poucos trabalhos estudaram a expressão de VEGF em neoplasias de glândulas  
14 salivares, e os resultados ainda são bastante controversos. DOI et al. (1999) estudaram a  
15 expressão de p53, VEGF e DMV (CD34) em 31 tumores de glândulas salivares, sendo 11  
16 CAC, 10 CME, sete carcinomas de células acinares (CCA) e três Carcinomas  
17 Epidermóides (CE). A DMV foi significativamente maior no CME e CE que no CAC e  
18 CCA. A expressão de VEGF e DMV não mostrou associação significativa com a presença  
19 ou ausência de metástases, embora a expressão de VEGF tenha sido mais alta nos casos  
20 metastatizantes. Contudo, o pequeno número de casos não permitiu uma conclusão  
21 definitiva, e esses resultados podem refletir o comportamento biológico de cada tipo  
22 histológico. A expressão de p53 foi significativamente associada à presença de metástases.  
23 Uma maior expressão de p53, VEGF e DMV estava relacionada à redução na sobrevida.  
24 Diante disso, estes resultados indicam que a expressão de p53 correlacionado com VEGF e

1 DMV, pode ser um fator de prognóstico nos pacientes com carcinoma de glândula salivar,  
2 independente do tipo histológico

3 Li et al. (2001) avaliaram a expressão imuno-histoquímica de VEGF e a DMV em  
4 55 pacientes com CAC. Alta expressão de VEGF estava associada ao sítio e estágio  
5 clínico, mas não com a recidiva, metástases à distância, metástases regionais, gradação  
6 histológica e sobrevida. Não foi observada uma associação significativa entre DMV e estas  
7 variáveis. A média de DMV foi significativamente maior nos casos com alta expressão de  
8 VEGF, que em casos com baixa expressão. Do estudo, concluiu-se que para o CAC a  
9 DMV e VEGF podem ser utilizados como fatores prognósticos.

10 Lim et al. (2003) realizaram estudos imuno-histoquímicos para verificar a  
11 expressão de VEGF, p53 e Ki-67, em 45 carcinomas de glândulas salivares, consistindo de  
12 15 CAC, 14 CME, seis adenocarcinoma, quatro APBG, quatro carcinoma ex AP, e dois  
13 carcinomas do ducto salivar. Uma positividade moderada para VEGF foi observada nas  
14 células do endotélio vascular e fraca marcação no músculo, ácinos serosos, células ductais,  
15 macrófagos e polimorfonucleares. A expressão de VEGF foi baixa em 14 casos (31,1%),  
16 moderada em 15 casos (33,3%) e alta em 16 casos (35,6%). Uma associação significativa  
17 foi observada entre a marcação de VEGF e idade, tamanho do tumor, metástases para  
18 linfonodo, estágio clínico, invasão perineural, invasão vascular, recidiva e sobrevida,  
19 enquanto nenhuma associação foi encontrada entre sexo e localização do tumor. Os autores  
20 concluíram que VEGF é um importante fator prognóstico para carcinomas de glândulas  
21 salivares.

22 Yu et al. (2003) realizaram estudo com objetivo de discernir se DMV e expressão  
23 de VEGF poderiam ser indicadores de prognóstico para metástases e sobrevida de  
24 pacientes com CAC após cirurgia radical. Foi realizada análise imuno-histoquímica,  
25 utilizando anticorpos monoclonais anti-CD34 e anti-VEGF em 31 CAC primários, com

1 seguimento mínimo de 60 meses. Os valores de DMV foram estatisticamente maiores nos  
2 grupos óbito, metástases, recidiva, tumores sólidos e estágio avançado. Associação  
3 significativa também pode ser observada entre valores de DMV e a presença de metástases  
4 à distância nestas lesões. A análise univariada mostrou que os subtipos histológicos de  
5 CAC, o estadiamento clínico e a DMV estavam associados de forma significativa à pior  
6 sobrevida dos pacientes. Apenas a DMV mostrou-se como fator de prognóstico  
7 independente na análise multivariada.

8 Zhang et al. (2005) avaliaram a expressão de fator nuclear  $\kappa$ B, iNOS, VEGF e  
9 DMV (utilizando CD34) em 80 CAC. Os autores observaram expressão citoplasmática de  
10 VEGF nas células neoplásicas. A marcação de VEGF foi baixa em 19 casos (23,8%),  
11 moderada em 24 casos (30,0%), e alta em 37 casos (46,2%), e associando-se de forma  
12 estatisticamente significativa com tamanho, estágio clínico, invasão vascular, recidiva, e  
13 metástases à distância. A expressão de VEGF foi maior no CAC que nas glândulas  
14 salivares normais e positivamente associada à DMV. Esses resultados mostraram que  
15 VEGF no CAC pode ter um importante papel na estimulação da proliferação das células  
16 endoteliais. Além disso, na análise univariada os fatores associados a um pior prognóstico  
17 foram tipo histológico, invasão perineural, invasão vascular, metástases, expressão de fator  
18 nuclear  $\kappa$ B, iNOS, VEGF e CD34. Na análise multivariada fator nuclear  $\kappa$ B, iNOS, VEGF,  
19 CD34, subtipos histológicos e invasão perineural foram marcadores independentes de  
20 prognóstico para sobrevida. Esses resultados sugerem que esses marcadores podem ter um  
21 papel importante no prognóstico do CAC.

22 Swelan et al. (2005) para melhor entender a pobre vascularização do AP, estudaram  
23 por imuno-histoquímica a expressão qualitativa de marcadores endoteliais de angiogênese  
24 (VEGF, CD31, Flk-1 e Flt-1) e de condições de hipóxia (Lactato desidrogenase –LDH e  
25 HIF-1 $\alpha$ ) em 20 amostras de AP e sete glândulas submandibulares normais. Nas glândulas

1 salivares normais foi observada marcação de VEGF nos ácinos serosos e nos ductos  
2 epiteliais. A marcação de VEGF ocorreu nas formações ductais e áreas sólidas, sendo  
3 nestas mais fortes que nos ninhos tumorais. Nas áreas mixóides as células mioepiteliais  
4 também marcaram fortemente. Não ocorreu marcação de CD31 nas áreas sólidas e  
5 condróides, indicando à pobre vascularização do AP. A presença de VEGF nas células do  
6 AP mostra que a pobre vascularização desse tumor leva a uma condição de hipóxia que  
7 induz a expressão de VEGF. Além disso, VEGF pode estar associado à proliferação e  
8 diferenciação tubular no AP.

9 Shi et al. (2007) estudaram a expressão de caveolin-1, VEGF e CD34 em 75  
10 pacientes com CME em função de características clínico-patológicas. A expressão de  
11 VEGF foi observada nas células intermediárias e epidermóides, nas mucosas não foi  
12 observada marcação. Imunomarcação de VEGF foi observada em 54,7% dos casos, com  
13 uma DMV variando de 9 a 56 vasos ( $24,45 \pm 10.72$ ). Foi observada correlação positiva da  
14 expressão de VEGF e DMV, suportando o papel que o VEGF também é um fator de  
15 crescimento para células do endotélio vascular no CME. Maior DMV foi notada nos casos  
16 com estágio clínico avançado, alto grau de malignidade, e localizados em glândulas  
17 menores, associação que se deu de forma significativa. Ademais, a presença de  
18 sintomatologia clínica, sexo masculino, estágio clínico avançado, alto grau e aumento da  
19 DMV associaram-se significativamente com menor sobrevida. Pela análise multivariada foi  
20 observado que estágio clínico, grau histológico e DMV constituíram-se fatores  
21 prognósticos independentes.

22

23

24

25

### 1           **2.2.2. Fator Endotelial de Crescimento Vascular Derivado de Plaquetas /** 2           **Timidina Fosforilase**

3           Em 1987, uma nova proteína angiogênica foi isolada de plaquetas por Miyazono et  
4 al., a qual foi denominada fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PDEGF).  
5 É considerado quimiotático para células endoteliais, não mitogênico *in vitro* e angiogênico  
6 *in vivo* (ISHIKAWA et al., 1989; TOI et al., 2005). A transfecção de PDEGF em  
7 fibroblastos transformados de camundongos resultou em aumento da vascularização  
8 (ISHIKAWA et al., 1989). A atividade angiogênica de PDEGF ocorre por estimulação da  
9 migração de células endoteliais, não atuando como um fator de crescimento de células  
10 endoteliais por aumento da proliferação (MOGHADDAM et al., 1995). No ambiente  
11 tumoral a expressão de PDEGF é induzida pelo estresse causado por fatores como hipóxia,  
12 e atua impedindo a apoptose da célula, auxiliando na sua sobrevivência pelo estímulo do  
13 metabolismo do nucleosídeo e angiogênese (SÁNCHEZ-ELSNER et al., 2002; TOI et al.,  
14 2005).

15           Tsujiyama et al. (2004) discute que o efeito do PDEGF na angiogênese pode não ser  
16 direto, mas pode ser via outro fator de angiogênese ou facilitando a invasão endotelial pela  
17 sua atividade enzimática. Esses autores observaram uma alta expressão de VEGF nas  
18 células tumorais associadas à alta expressão de PDEGF nas células invasivas e a alta  
19 DMV.

20           Em 1992, Usuki et al. verificaram que o PDEGF compartilhava uma significativa  
21 identidade com a timidina fosforilase (TP) da *Escherichia coli*. Na década de 70, TP foi  
22 purificada da *Escherichia coli* e da *Salmonella typhimurium* (MIYAZONO et al., 1987;  
23 MIYAZONO et al., 1991). A análise estrutural da TP revelou um homodímero de 110 kDa  
24 em mamíferos e 90 kDa na *Escherichia coli* (MIYAZONO et al., 1987, MIYAZONO et

1 al., 1991). Posteriormente, a seqüência de aminoácidos de todos os quatro fragmentos de  
2 peptídeos purificados da TP humana foi detectada como idêntica à seqüência do PDEGF.  
3 (SUMIZAWA et al., 1993). Adicionalmente, foi descrita a atividade angiogênica do  
4 metabólito da timidina 2-deoxi-D-ribose que atua estimulando por quimiotaxia a migração  
5 das células endoteliais (HARAGUCHI et al., 1994).

6 A expressão de PDEGF é altamente regulada por citocinas liberadas durante a  
7 inflamação, angiogênese e hipóxia em tecidos neoplásicos malignos ou desordens de  
8 inflamação crônica. Dentre essas citocinas podemos citar o TNF- $\alpha$  e Interleucina-1,  
9 VEGF, Fator Indutor de Hipóxia-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) e Interferon- $\delta$  (FUJIMOTO et al., 1998,  
10 AKIYAMA et al., 2004).

11 Fox et al. (1995) encontraram imunoreatividade de PDEGF no núcleo e/ou  
12 citoplasma do endotélio de algumas regiões placentárias, no ovário, glândula salivar, e  
13 cérebro; além de macrófagos e células de Kupffer. Contudo, nenhuma marcação foi  
14 observada no epitélio gastrointestinal, nas células musculares, glândula adrenal, pulmão e  
15 testículo. Nas glândulas salivares a expressão de PDEGF foi evidenciada nos ácinos  
16 serosos, epitélio ductal e endotélio. Além disso, a marcação imuno-histoquímica de  
17 PDEGF tem sido observada no núcleo e citoplasma de carcinomas gástricos, de colo  
18 uterino, mama, cólon, e pulmão tipo “não de pequenas células” (FOX et al., 1995;  
19 TAKEBAYASHI et al., 1996; KOUKOURAKIS et al., 1998; TOKUNAGA et al., 2002;  
20 RYU et al., 2003). Esses diferentes padrões de marcação celular podem evidenciar os  
21 vários mecanismos de atuação do PDEGF/TP: no núcleo pode indicar a sua atuação como  
22 reguladora da replicação celular, e no citoplasma, a regulação e interação com enzimas  
23 localizadas nesse compartimento celular (FOX et al., 1995).

1 A expressão de PDEGF é estimulada após tratamentos radioterápicos e  
2 quimioterápicos, mostrando sua função enzimática na recuperação das células do estresse  
3 causado por essas terapias (RYU et al., 2003; TOI et al., 2005).

4 O valor prognóstico de PDEGF é reconhecido no câncer de mama (FOX et al.,  
5 1996). Uma correlação positiva entre alta expressão de PDEGF e DMV tem sido associada  
6 a atividade angiogênica do tumor e pior sobrevida em carcinoma de colo uterino,  
7 carcinoma de pulmão “não de pequenas células”, carcinoma cervical e carcinoma gástrico  
8 (KOUKOURAKIS et al., 1998; UEDA et al., 1999; FUJIWAKI et al., 2000; TSUJITANI  
9 et al., 2004). Por outro lado, tem sido observada a ausência de associação da expressão de  
10 PDEGF e DMV, embora seja identificado como fator prognóstico independente, sugerindo  
11 que a expressão de PDEGF atua na progressão tumoral independente da angiogênese  
12 (KITAZONO et al., 1998). Outros estudos não têm verificado associação de PDEGF com  
13 prognóstico (YAMAMOTO et al., 1998; MORINAGA et al., 2003).

14 Em carcinomas de pulmão, mama e gástrico, a atividade de PDEGF nos tumores  
15 primários tem sido associada à presença de metástases à distância (NISHIDA et al., 1996;  
16 TAKEBAYASHI et al., 1996).

17 Em 1995, Moghaddam et al. observaram a expressão de PDEGF por imuno-  
18 histoquímica nos carcinomas ductais invasivos de mama e em mama normal. Na mama  
19 normal a marcação foi mais fraca e ocorreu no epitélio ductal e as células mioepiteliais  
20 foram negativas. Nos carcinomas ductais invasivos a positividade foi observada nas células  
21 tumorais, nas áreas inflamatórias, no endotélio vascular e em algumas células do estroma,  
22 sendo usualmente maior que nas células normais. Não foi observada associação da  
23 expressão de PDEGF e DMV. Kitazono et al. (1998) sugeriram que essa maior expressão  
24 de PDEGF no carcinoma de mama estivesse relacionada a resistência conferida pelo

1 PDEGF a apoptose induzida por hipóxia, permitindo um crescimento *in vivo* sem aumento  
2 na DMV.

3 Konno et al. (2003) verificaram a expressão de PDEGF em 116 pacientes com  
4 carcinoma gástrico e encontraram uma associação significativa de alta marcação de  
5 PDEGF com invasão, metástases para linfonodo, estágio clínico, recidiva e metástases à  
6 distância. Esses achados sugerem que PDEGF está associado à incidência de metástases  
7 nos carcinomas gástricos.

8 Morinaga et al. (2003) estudaram por ELISA (ensaio imunoenzimático, do inglês  
9 *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) a expressão de PDEGF nos carcinomas  
10 hepatocelulares, no fígado adjacente ao tumor e em fígado normal. A proteína PDEGF foi  
11 detectada tanto no tecido normal quanto no carcinoma hepatocelular, mas sua expressão foi  
12 maior no carcinoma hepatocelular e no fígado adjacente ao tumor, que no fígado normal.  
13 As concentrações de PDEGF foram maiores nos carcinomas menos diferenciados com  
14 maior DMV, mas não estava associada ao prognóstico.

15 Ryu et al. (2003) avaliaram a expressão de PDEGF e VEGF em pacientes com  
16 adenocarcinoma de colo uterino com radioterapia prévia, e observaram marcações de  
17 VEGF e PDEGF no citoplasma e/ou núcleo das células tumorais. A positividade para  
18 VEGF foi encontrada em 54,7% dos casos, para PDEGF em 44,6% dos casos e 76,6% dos  
19 casos expressavam ambas as marcações. Não foi observada associação de VEGF e PDEGF  
20 com idade, grau de malignidade, subtipo histológico. Contudo, a expressão de PDEGF foi  
21 maior nos casos estágio II e II que nos III e IV. Assim, foi identificado como fator  
22 prognóstico independente associado à melhor sobrevida. Não foi observada correlação da  
23 expressão de VEGF e PDEGF. Esses resultados sugerem que a alta expressão de PDEGF  
24 proporcione um incremento na oxigenação do tecido favorecendo o efeito da radioterapia e  
25 melhora na sobrevida dos pacientes.

### 1           **2.3. DENSIDADE MICROVASCULAR (DMV)**

2           A natureza vascular dos tumores foi reconhecida há muitos séculos quando Fallopio  
3           em 1600 notou a presença de vasos dilatados e Hunter em 1828 identificou o aumento do  
4           número de vasos nos tumores. Contudo, o estudo sistemático de Goldman (1907) e  
5           subsequentemente de Lewis (1927), Ide (1939) e Algire (1945) revelaram a natureza  
6           seqüencial da vascularização do tumor.

7           Entretanto, a quantificação histológica da angiogênese tumoral humana teve início  
8           em 1991 quando Noel Weidner e colegas estudaram por imuno-histoquímica a expressão  
9           do fator VIII nos vasos sanguíneos e contaram o número de microvasos na área mais  
10          vascularizada do tumor (*hot spots*), determinada como DMV. Weidner et al. (1991)  
11          demonstraram associação das metástases para linfonodo e a DMV nos carcinomas de  
12          mama, e posteriormente (WEIDNER et al., 1992) mostraram que a DMV foi um fator  
13          prognóstico independente para sobrevida. Subsequentemente, uma avalanche de estudos  
14          foi realizada utilizando uma diversidade de anticorpos marcadores de endotélio e  
15          metodologias de contagem variadas para diferentes tipos tumorais, cujos resultados foram  
16          parcialmente concordantes.

17          Não obstante, depois desses estudos iniciais utilizando imuno-histoquímica e  
18          confirmando que a DMV era um significativo fator de prognóstico em carcinoma de mama,  
19          ovário e glândula salivar (WEIDNER et al., 1991; 1992; OBEMAIR et al., 1999; LIM et  
20          al., 2003), e indicador de metástases em carcinoma de mama, carcinoma gástrico  
21          (WEIDNER et al., 1991; MAEDA et al., 1995; VERMEULEN et al., 2002) apareceram  
22          estudos contradizendo esses achados, inclusive em carcinomas de mama, (FOX &  
23          HARRIS, 2004).

24          Trabalhos como o de Moriyama et al. (1997) em carcinoma epidermóide de boca  
25          encontraram maior DMV nos casos não metastáticos em relação aos metastatizantes. Essa

1 variação nos achados tem sido atribuída às variações na metodologia de seleção e tamanho  
2 das amostras, tipo de anticorpo utilizado, diversidade de marcadores endoteliais (CD31,  
3 CD34, Fator VIII), técnicas de identificação antigênica, metodologias de quantificação de  
4 vaso, e às diferenças biológicas entre os tumores estudados (HASAN et al., 2002;  
5 VERMEULEN et al., 2002).

6       Dentre os marcadores de endotélio, o Fator VIII identifica apenas uma pequena  
7 proporção de capilares, e também identifica vasos linfáticos. O CD34 é atualmente  
8 considerado por Fox & Harris (2004) como um ótimo marcador para quantificação da  
9 angiogênese em tumores, superando o CD31 como marcador endotelial de escolha para  
10 cânceres invasivos (VERMEULEN et al., 2002). Contudo, tem sido relatada a expressão de  
11 CD34 no estroma de células da mama e de neoplasias de glândulas salivares (SOMA et al.,  
12 2001), bem como marcação de vasos linfáticos (HASAN et al., 2002). As desvantagens  
13 associadas à marcação de CD31 incluem marcação das células inflamatórias, que podem  
14 ser facilmente distinguidas das células endoteliais pelas características morfológicas.

15       Mais recentemente, têm sido introduzidos nesta discussão marcadores considerados  
16 específicos para endotélio em proliferação, o CD105, apresentando fraca marcação para  
17 vasos linfáticos e vasos sanguíneos normais. Em estudo com 106 pacientes com carcinoma  
18 de mama, a MVD foi verificada pela marcação de CD34 e CD105, apenas o último pode  
19 ser associado a pior sobrevida (KUMAR et al., 1999).

20

### 21       **2.3.1. CD34**

22       O CD34 (CD- *cluster of differentiation* do inglês: grupos de diferenciação) é um  
23 antígeno protéico na transmembrana de 120 kD expresso nas células progenitoras  
24 hematopoiéticas, cujo gene codificador foi mapeado no cromossomo 1q (NIKOLLOF,  
25 1991; VAN de RIJN and ROUSE, 1994).

1           É encontrado na superfície de células endoteliais, especialmente durante a  
2 angiogênese (KUZU et al., 1992), cuja expressão pode ser observada tanto em tecido  
3 normal quanto neoplásico. Este marcador também pode ser evidenciado em outras células  
4 como as dendríticas da derme, células ao redor da estrutura vascular, nervos, músculos, e  
5 anexos da pele normal (NIKOLOFF, 1991; LINDENMAYER & MIETTINEN 1995).

6           Acredita-se que o CD34 tenha um papel de suporte na maturação ou na proliferação  
7 das células adjacentes aos vasos (WEISS & NICKOLOFF, 1993).

8           Sua presença nas lesões malignas tem sido investigada na tentativa de auxiliar na  
9 formulação do prognóstico destas lesões. Vários autores têm encontrado um aumento da  
10 DMV obtida por CD34 associada a um pior prognóstico em carcinoma de ovário,  
11 carcinoma de esôfago, carcinoma epitelial de glândulas salivares (DOI et al., 1999;  
12 OBEMAIR et al., 1999; ELPEK et al., 2001; ZHANG et al., 2005 ) e a ocorrência de  
13 metástases em carcinoma de esôfago, carcinoma epitelial de glândulas salivares (HANSEN  
14 et al., 2000; ELPEK et al., 2001, YU et al., 2003; ZHANG et al., 2005).

15           Por outro lado, a expressão da DMV pelo CD34 mostra resultados conflitantes,  
16 como nos carcinomas gástricos, onde Maeda et al. (1995) observaram que a alta DMV  
17 estava associada apenas a metástases para linfonodos. Tanigawa et al. (1996) relataram  
18 que alta DMV estava associada a metástases do carcinoma gástrico para fígado, mas não  
19 estava associada a metástases para linfonodo.

20           Gleich et al. (1997) em pacientes com carcinoma epidermóide (CE) de boca T2-T4,  
21 não tem encontrado a DMV como preditor de metástase tumoral ou sobrevida. Diante  
22 desses achados os autores sugeriram que o crescimento tumoral do CE é independente de  
23 angiogênese, ou que a angiogênese é mais um dos muitos fatores que regulam o  
24 crescimento tumoral.

1 Na literatura, a maioria dos trabalhos que verificaram a associação de DMV com  
2 prognóstico e metástases em neoplasias de glândulas salivares utilizou o CD34 como  
3 marcador vascular (DOI et al., 1999; YU et al., 2003; ZHANG et al., 2005; SHI et al,  
4 2007). Nesses tumores, Yu et al. (2003) e Zhang et al. (2005) encontraram a DMV  
5 associada a metástases e pior prognóstico, mas Doi et al. (1999) e Shi et al. (2007)  
6 encontraram associação da DMV apenas com pior prognóstico.

7 A marcação de CD34 em glândulas salivares foi verificada por Nakayama et al.  
8 (1999) que estudaram 21 AP realizando estudo imuno-histoquímico com CD31 e CD34  
9 para distinguir os vasos sanguíneos das células intersticiais positivas. Foi encontrada  
10 positividade de CD31 e CD34 nas células endoteliais, mas CD34 foi positivo nas células  
11 estromais ao redor dos ninhos tumorais. Os autores consideram o CD31 um melhor  
12 marcador para obter a DMV, devido a sua maior especificidade em relação ao CD34.

13 Devido à forte marcação e a facilidade do uso, o CD34 tem sido considerado um  
14 ótimo marcador de endotélio vascular, que sobrepuja o CD31 e o fator VIII  
15 (VERMEULEN et al., 2002).

16

### 17 **2.3.2. CD105 (Endogлина)**

18 CD105, também conhecida como endogлина, é uma glicoproteína de membrana,  
19 com peso molecular de 180kDa, que interage com receptores de vários membros da família  
20 do fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) (GOUGOS & LETARTE, 1988; LI et al.,  
21 2001). Foi inicialmente descrita em 1988, como uma glicoproteína homodimérica,  
22 associada à leucemia, por meio de anticorpos monoclonais específicos (GOUGOS &  
23 LETARTE, 1988). No 5º Workshop Internacional de Antígenos de Diferenciação da  
24 Leucemia Humana (LETARTE et al., 1995), a endogлина foi reconhecida como o grupo de  
25 diferenciação (CD- do inglês *cluster of differentiation*) número 105.

1 O gene codificador para endoglina encontra-se localizado no cromossomo humano  
2 9q34 e foi identificado como gene alvo para uma doença autossômica dominante  
3 conhecida como telangiectasia hemorrágica tipo I. Sua identificação foi realizada  
4 utilizando hibridização *in situ* por imunofluorescência e sua região decodificadora contém  
5 14 exons (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 1993). Duas isoformas diferentes, a L e S, foram  
6 encontradas com capacidade de se ligar ao TGF- $\beta$ . A isoforma L-CD105 consiste em 633  
7 aminoácidos, enquanto a S-CD-105 tem 600 aminoácidos. Ambas as formas foram  
8 detectadas utilizando-se o PCR na célula endotelial, nas células promonocíticas HL-60 e  
9 U-937, e na placenta. Quando se realizou a técnica de Western-Blot a isoforma L-CD105  
10 foi à forma predominante na célula endotelial (LI et al., 2000).

11 CD105 atua suprimindo o sinal do TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3, bloqueando seus receptores,  
12 e modulando sua resposta. O TGF- $\beta$  é uma citocina que regula várias funções celulares  
13 incluindo proliferação, diferenciação, migração, síntese da matriz extracelular e  
14 hematopoiese (MASSAGUÉ, 1987). Também está envolvido na vasculogênese,  
15 cicatrização e angiogênese (ROBERTS et al., 1986). A hipóxia é um potente estimulador  
16 para expressão do gene CD105 nas células endoteliais e também potencia a combinação de  
17 CD105 com receptores de TGF- $\beta$ 1 (DUFF et al, 2003). Acredita-se que o desenvolvimento  
18 da resposta angiogênica também possa depender de um balanço entre os níveis de ativação  
19 de TGF- $\beta$  e a expressão de CD105 (LI et al., 2000).

20 A seqüência aminoácida do CD105 contém o tripeptídeo ácido arginina-glicina-  
21 aspartato (RGD) localizado na região exposta do domínio extracelular. O polipeptídeo  
22 RGD é a chave para a estrutura de reconhecimento encontrada em proteínas como a  
23 fibronectina, vitronectina, fator de Von Willebrand, colágeno tipo I e fibrinogênio sendo  
24 reconhecido pelas integrinas de superfície celular. Por isso tem sido proposto o papel de

1 CD105 como ligante para arginina e/ou outros receptores RGD (GOUGOS & LETARTE,  
2 1990).

3 Endoteliócitos vasculares e os sinciotrofoblastos da placenta são as células que  
4 mais expressam CD105. Em outras células incluindo células da musculatura estriada,  
5 fibroblastos, macrófagos, células estromais, células leucêmicas pré-B ou de origem  
6 mielomonocítica e precursores eritróides, a marcação é fraca (GOUGOS & LETARTE,  
7 1988; FONSATTI et al., 2001; DUFF et al., 2003).

8 Investigações realizadas em tumores sólidos de diferentes tipos histológicos  
9 utilizando anticorpos monoclonais anti-CD105 mostraram que a expressão antigênica foi  
10 identificada quase exclusivamente no endotélio venoso e arterial dos vasos peri e  
11 intratumorais (BODEY et al., 1998; KUMAR et al., 1999; FONSATTI et al., 2001).  
12 Ocasionalmente, as marcações se deram fracamente no citoplasma das células do sarcoma  
13 de diferentes subtipos, carcinomas de ovário, carcinomas de mama, componentes do  
14 estroma de carcinomas endometrióides ovarianos (FONSATTI et al., 2001).

15 Além disso, vale ressaltar que Burrows et al. (1995) encontraram altos níveis de  
16 expressão de CD105 nas células endoteliais da veia humana umbilical (HUVEC – do  
17 inglês *human umbilical vein endothelial cells*) com níveis de proteína, RNA e DNA  
18 consistentes com ativação e proliferação. Em adição a essa observação, foram encontrados  
19 altos níveis de expressão de CD105 em HUVEC em proliferação em cultura (FONSATTI  
20 et al., 2000), bem como associados aos marcadores de proliferação celular como Ki-67 em  
21 tumores endoteliais (MILLER et al., 1999). Adicionalmente, foi demonstrado que a  
22 expressão de CD31 está inversamente correlacionada a HUVEC em proliferação  
23 (FONSATTI et al., 2000). Ademais, foi observada forte intensidade de marcação para  
24 CD105 no endotélio vascular de tecidos normais com atividade angiogênica ativada, como  
25 nos processos de regeneração e inflamação (BODEY et al., 1998; KUMAR et al., 1999).

1           As pesquisas têm mostrado uma imunomarcção forte para CD105 nos vasos ao  
2 redor do tumor, e nenhuma marcação tem sido detectada nos grandes vasos ou vasos  
3 sanguíneos dos tecidos normais (BODEY et al., 1998; KUMAR et al., 1999). Por isso,  
4 alguns estudos têm sugerido que o CD105 é um marcador mais específico e sensível para  
5 vasos neoformados em relação aos outros anticorpos pan-endoteliais (CD31, CD34 e fator  
6 VIII) nos carcinomas de cervix, cólon, endométrio e mama (BODEY et al., 1998;  
7 BREWER et al., 2000; SAAD et al., 2003).

8           Minhajet et al. (2006) compararam a expressão de CD31 e CD105 em carcinomas  
9 de cólon. Os autores evidenciaram que CD31, estava expresso universalmente nos  
10 pequenos vasos e capilares, e CD105 expressou marcação mais intensa nas células  
11 endoteliais do carcinoma em relação ao adenoma e não foi encontrado no tecido normal e  
12 nos vasos linfáticos. Esses resultados confirmam que CD105 é expresso apenas nos novos  
13 vasos do carcinoma de cólon.

14           Alta densidade microvascular obtida pela expressão de CD105 tem sido relatada  
15 como indicadora de prognóstico independente em uma série de neoplasias, sendo  
16 relacionada com uma redução da sobrevida (SRIVASTAVA et al., 1988; TANIGAWA et  
17 al., 1997; KUMAR et al., 1999). Entretanto, outros autores não conseguiram encontrar tal  
18 relação (GLEICH et al, 1997; TAE et al, 2000; GRUDZINSKI et al., 2006). Alguns  
19 trabalhos têm encontrado associação da expressão de CD105 e a ocorrência de metástases  
20 em carcinoma de hipofaringe, carcinomas de mama, carcinoma de endométrio (SAAD et  
21 al., 2003; DALES et al., 2004; CHIEN et al., 2006)

22           Kumar et al. (1999) estudaram a expressão de CD34 e CD105 em 106 carcinomas  
23 de mama por meio de ensaio imuno-histoquímico. A marcação de CD105 foi forte nas  
24 células endoteliais dos vasos do estroma tumoral, mas não foi detectada ou apenas fraca  
25 marcação foi identificada nos vasos da maioria dos tecidos normais. Não foi possível

1 encontrar correlação significativa entre os valores de DMV obtidos a partir da expressão de  
2 CD34 e CD105. A expressão de CD105 teve uma correlação estatisticamente significativa  
3 com sobrevida e tempo livre de doença, mas com o CD34 isto não foi observado. Análise  
4 multivariada confirmou que valores de DMV usando CD105 o identificaram como  
5 marcador de prognóstico independente. Esses resultados mostraram que o uso de CD105  
6 deve reduzir a incidência de marcação falso-positiva em vasos sanguíneos induzidos pelo  
7 tumor, diferenciando-os daqueles localizados próximos à massa tumoral e que por serem  
8 maduros podem não estar associados ao crescimento tumoral. Os autores chamam a  
9 atenção para o fato de que seria importante na determinação da angiogênese tumoral  
10 considerar a distinção entre a neovascularização tumoral e a existência de vasos pré-  
11 existentes. A investigação desta diferença deveria ser relevante para o estabelecimento da  
12 potencial influência da vascularização no potencial metastático e no prognóstico dos  
13 tumores.

14 Atualmente, várias evidências suportam a idéias que o CD105 está envolvido na  
15 angiogênese e representa um poderoso marcador de neovascularização (FONSATTI et al.,  
16 2001).

17 Li et al. (2000) relataram um aumento do nível de CD105 em amostra de plasma de  
18 pacientes com câncer de mama quando comparado com um grupo controle, sugerindo que  
19 o CD105 também pode ser utilizado para identificar pacientes com alto risco de metástase  
20 e recidivas.

21 Schimming & Marmé (2002), estudaram 51 casos de carcinoma epidermóide de  
22 boca, e evidenciaram a expressão aumentada da endogлина no endotélio vascular dos  
23 tecidos tumorais, quando comparados com a mucosa normal. A expressão de CD 105  
24 também foi maior nos casos com estágio III, sugerindo que a endogлина tenha um  
25 importante papel na progressão do carcinoma epidermóide de boca.

1 Chien et al. (2006) estudaram a marcação de VEGF e CD105 em 73 casos de  
2 carcinoma epidermóide de hipofaringe. Foi encontrada uma alta marcação de VEGF no  
3 tecido tumoral que se correlacionou de forma significativa com os estádios mais avançados  
4 da doença. A imunomarcação de CD105 ocorreu apenas nos vasos do tumor e mostrou  
5 significativa correlação com metástases para linfonodos e os estádios mais avançados da  
6 doença. Além disso, foi observada uma correlação positiva da expressão de VEGF e  
7 CD105. Diante disso, os autores concluíram que um maior número de vasos neoformados  
8 no tumor, permite que esse seja mais agressivo, e que CD105 pode ser um marcador  
9 promissor na predição do prognóstico nesses tumores.

10 Recentemente, alguns autores têm observado uma associação entre a alta DMV  
11 determinada pelo CD105 e menor sobrevida em câncer retal, e valor de CD105 como  
12 marcador de prognóstico (ROMANI et al., 2006).

13 Nikiteas et al (2007) avaliaram a expressão imuno-histoquímica de VEGF e CD105  
14 em 100 carcinomas gástricos. A expressão de VEGF foi forte no citoplasma de 36% dos  
15 casos. Em todos os casos, a alta expressão de VEGF foi acompanhada de alta expressão de  
16 CD105, mostrando-se também relacionados à menor sobrevida. Também foi observada  
17 associação da expressão de VEGF e CD105 com a presença de metástases para linfonodo.  
18 Acredita-se que VEGF e CD105 são dois valiosos indicadores de metástases. Esses  
19 resultados mostram que VEGF pode induzir a neoformação de vasos sanguíneos e a  
20 expressão de CD105 em células endoteliais proliferativas na vasculatura do tumor pode ser  
21 um bom alvo para terapia anti-angiogênica.

22

23

24

25

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22

**HIPÓTESE**



### 1           **3. HIPÓTESES**

2           **3.1.** Os tumores malignos apresentariam diferenças na expressão de fatores de  
3 crescimento endoteliais (VEGF e PDEGF) e de angiogênese (representados pela  
4 quantificação de CD34 e CD105) relativamente aos benignos; entre os tumores malignos,  
5 sua expressão seria diferenciada entre os grupos metastatizantes e não metastatizantes,  
6 sendo a expressão mais acentuada associada às lesões metastatizantes.

7  
8           **3.2.** A expressão dos fatores angiogênicos e dos marcadores de angiogênese estaria  
9 associada ao potencial metastático como fatores preditivos independentes de outros fatores  
10 clínico-patológicos classicamente reconhecidos nesta predição como estadiamento clínico  
11 e o grau histológico de malignidade.

12  
13           **3.3.** A superexpressão dos antígenos VEGF, PDEGF, CD34 e CD105 estaria  
14 associada ao pior prognóstico expresso pela sobrevida dos pacientes investigados, de forma  
15 independente de outros parâmetros clínico-patológicos, clássicos marcadores de  
16 prognósticos, tais como localização, tamanho, estadiamento clínico e a gradação  
17 histológica de malignidade.

18  
19           **3.4.** Independentemente do tipo tumoral estudado, acreditamos encontrar uma  
20 correlação positiva entre os índices de marcação de VEGF, PDEGF e os marcadores  
21 vasculares CD34 e CD105.

22

23

24

25

26

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

**OBJETIVO**



## 1           **4. OBJETIVOS**

2

3           **4.1. OBJETIVO GERAL:** Estudar a angiogênese tumoral e sua associação com  
4 potencial metastático de neoplasias epiteliais primárias de glândula salivar.

5

### 6           **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

7                   4.2.1. Caracterizar os aspectos sócio-demográficos, clínico-patológicos e de  
8 comportamento biológico da amostra de tumores de glândula salivar selecionada.

9                   4.2.2. Caracterizar qualitativamente na amostra selecionada, a expressão  
10 imuno-histoquímica de antígenos associados à angiogênese, a saber: CD34, CD105, Fator  
11 Endotelial de Crescimento Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Endotelial Derivado de  
12 Plaquetas (PDEGF).

13                  4.2.3. Avaliar a densidade microvascular da amostra de tumores selecionada  
14 por meio de análise quantitativa da expressão imuno-histoquímica de antígenos marcadores  
15 vasculares CD34 e CD105.

16                  4.2.4. Avaliar, por meio de análise semi-quantitativa, a expressão tumoral  
17 dos antígenos VEGF e PDEGF na amostra selecionada.

18                  4.2.5. Investigar a existência de diferenças de índices de expressão dos  
19 antígenos mencionadas no item 4.2.2 entre os grupos de tumores benignos e malignos, e  
20 entre os tumores malignos primários metastatizantes e não metastatizantes como grupo e a  
21 partir dos diferentes subtipos histológicos.

22                  4.2.6. Investigar a existência de associações entre os índices de expressão  
23 imuno-histoquímica dos antígenos descritos no item 4.2.2 e o potencial metastatizante dos  
24 tumores malignos amostrados.

1           4.2.7. Verificar a associação entre a expressão imuno-histoquímica dos  
2 antígenos descritos no item 4.2.2 e o prognóstico das lesões traduzido pela sobrevida dos  
3 pacientes, procurando validá-los como fatores prognósticos independentes de outros  
4 classicamente conhecidos (localização, estadiamento tumoral, dimensão).

5           4.2.8. Investigar a existência de correlação entre os índices de expressão  
6 antigênica tumoral descritos nos itens 4.2.3. e 4.2.4.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

**MATERIAIS E MÉTODOS**



## 1           **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

2           Inicialmente, foram recuperados 732 casos de tumores epiteliais de glândulas  
3           salivares diagnosticados e tratados no Instituto Nacional do Câncer do Ministério da  
4           Saúde, localizado na cidade do Rio de Janeiro (RJ) (INCA)<sup>1</sup>, no período de 1998 a 2003  
5           (KALLUF, 2006). Esta seleção foi realizada a partir da pesquisa ativa de prontuários de  
6           pacientes portadores de tumores epiteliais de glândulas salivares, baseada nos dados  
7           registrados nos arquivos da Divisão de Patologia e do Departamento de Cirurgia de Cabeça  
8           e Pescoço daquela Instituição. Para o levantamento inicial foram considerados os seguintes  
9           parâmetros: **1-** a relação dos diferentes tipos histológicos dos tumores descritos pela  
10          Organização Mundial de Saúde (OMS) (SEIFERT & SOBIN, 1991; BARNES et al.,  
11          2005); **2-** termos descritores dos tipos de glândulas salivares maiores (parótidas,  
12          submandibulares, sublinguais); e **3-** termos descritores de topografias das glândulas  
13          salivares menores (lábio, mucosa de bochecha, mucosa de sulco vestibular, trígono  
14          retromolar, palato, palato mole, assoalho bucal, língua). Esta pesquisa ainda foi  
15          complementada pela utilização dos códigos identificadores de doenças descritos no Código  
16          Internacional de Doenças para Oncologia – CID ONCO 10 (FRITZ et al., 2000).

17          Todos os casos levantados foram reavaliados quanto ao diagnóstico  
18          histopatológico, tendo como base os critérios estabelecidos pela OMS (BARNES et al.,  
19          2005) (TABELA 1).

---

<sup>1</sup> Esta cooperação foi desenvolvida por intermédio dos Drs. Fernando Dias e Roberto Araújo Lima (Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, INCA-MS, Rio de Janeiro, RJ) e das Drs. Ana Lúcia Eisenberg Amaral e Marilena Figueira do Nascimento (Divisão de Patologia do INCA-MS, Rio de Janeiro, RJ).

1 **TABELA 1 - Tipos tumorais epiteliais de glândulas salivares reconhecidos pela Classificação dos**  
 2 **Tumores de Glândulas Salivares de origem epitelial da OMS (BARNES et al., 2005).**  
 3

Neoplasias Benignas	Neoplasias Malignas
Adenoma Pleomórfico	Carcinoma Adenóide Cístico
Tumor de Warthin	Carcinoma Mucoepidermóide
Adenoma de células basais	Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau
Mioepitelioma	Carcinoma de Células Acinares
Oncocitoma	Adenocarcinoma de Células Basais
Adenoma canalicular	Carcinoma epitelial Mioepitelial
Adenoma sebáceo	Carcinoma mioepitelial
Linfadenoma	Carcinoma de Células Claras
Sebáceo	Adenocarcinoma SOE
Não Sebáceo	Carcinoma epidermóide
Papiloma ductal	Carcinoma de ductos salivares
Papiloma ductal invertido	Carcinoma ex Adenoma Pleomórfico
Papiloma intra-ductal	Carcinossarcoma
Sialadenoma papilífero	Carcinoma de células pequenas
Cistoadenoma	Carcinoma linfoepitelial
	Carcinoma oncócítico
	Adenoma pleomórfico metastatizante
	Adenocarcinoma mucinoso
	Cistoadenocarcinoma
	Linfadenocarcinoma sebáceo
	Sialoblastoma
	Cistadenocarcinoma cribriforme de baixo grau

4

5           A partir deste levantamento (KALLUF, 2006), foram selecionados todos os casos  
 6 identificados como Adenoma Pleomórfico (AP), Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo  
 7 Grau de Malignidade (APBG), Carcinoma Adenóide Cístico (CAC) e Carcinoma  
 8 Mucoepidermóide (CME) de glândulas salivares, independentemente de sua localização.  
 9 Estes tipos tumorais foram selecionados em função de sua maior frequência, e de seu  
 10 comportamento biológico, que favoreceram o estabelecimento de grupos definidos como **1.**  
 11 Tumores Benignos representados pelos APs; **2.** Tumores malignos de baixo grau, com  
 12 baixos índices metastáticos constituídos por APBGs; e **3.** Tumores malignos de alto grau,  
 13 classicamente conhecidos por apresentarem maiores índices de metástases, a saber: CACs  
 14 e CMEs (SPEIGHT & BARRET, 2002; BARNES et al., 2005).

15           A partir desta amostra, foram registrados os seguintes dados: sócio-demográficos  
 16 dos pacientes, dados clínico-patológicos dos tumores (localização, dimensão do tumor,  
 17 tempo de evolução, sinais e sintomas, tipo histológico e estadiamento clínico), tipo de

1 tratamento, tempo de seguimento dos pacientes e dados de intercorrência na evolução pós-  
2 operatória (presença de recorrências, metástases regionais e distantes).

3 Para a seleção da amostra utilizada no desenvolvimento do presente trabalho, os  
4 seguintes critérios foram adotados: 1. tumores primários que não receberam nenhum tipo  
5 de tratamento; 2. comprovação de metástases regionais ou distantes a partir de exames de  
6 imagem obtidos por radiografia (RX), tomografia computadorizada (TC), e ressonância  
7 magnética (RM), e/ou exame cito e histopatológico revelador do comprometimento  
8 linfonodal e/ou de outros órgãos; 3. presença de material em quantidade suficiente para a  
9 realização das análises pretendidas; 4. presença de todos os dados sócio-demográficos e  
10 clínico-patológicos mencionados anteriormente. O detalhamento dos fatores relacionados à  
11 exclusão de casos na composição da presente amostra e a relação dos casos excluídos deste  
12 estudo estão descritos no ANEXO 1 e 2. A TABELA 2 mostra a distribuição da amostra  
13 incluída no presente estudo.

14  
15 **TABELA 2 - Distribuição dos casos selecionados classificadas segundo o tipo histológico e a presença**  
16 **ou não de metástases após reavaliação histopatológica e preenchimento dos critérios de inclusão,**  
17 **provenientes do Instituto Nacional do Câncer no período de 1998 a 2003.**  
18

Neoplasia	Primários não metastatizantes ( <i>PNM</i> )	Primários metastatizantes ( <i>PM</i> ) <sup>1</sup>	Total de casos <sup>2</sup>
AP	30	–	30
APBG	17	2	19
CME	37	3	40
CAC	39	11	50
<i>TOTAL</i>	<b>123</b>	<b>16</b>	<b>139</b>

19 <sup>1</sup>– Considerou-se primários metastatizantes (*PM*) os tumores dos quais as metástases originaram.

20 <sup>2</sup>– O número total de casos compreende as lesões primárias benignas e malignas não metastatizantes (*PNM*),  
21 e malignas metastatizantes (*PM*).

22 **AP** – adenoma pleomórfico; **APBG** – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; **CME** – carcinoma  
23 mucoepidermóide; **CAC** – carcinoma adenóide cístico

24  
25

1           Após a seleção da amostra, realizamos a imunomarcação de VEGF, PDEGF, CD34  
2 e CD105. Para isto utilizamos o método estreptavidina-biotina-peroxidase descrito por Hsu  
3 e et al., 1981, adaptando a técnica às nossas condições laboratoriais de trabalho: incubação  
4 com anticorpo primário por 19 horas em temperatura ambiente e resgate antigênico em  
5 microondas com 1mM EDTA – NaOH, pH 8.0 (Nuclear, Diadema-SP, Brasil) (SOUZA et  
6 al., 2003).

7           Todos os espécimes foram fixados em formol a 4% e incluídos em parafina. Cortes  
8 histológicos de 3µm foram obtidos e montados em lâminas de vidro previamente  
9 recobertas com organosilano (3-aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical Co., St.  
10 Louis, MO, USA). Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinados por meio de  
11 duas passagens de 20 minutos em xilol novo à temperatura ambiente, e hidratados em  
12 concentrações decrescentes de etanol (100%, 90% e 70%) por 5 minutos cada. Em seguida,  
13 os cortes histológicos foram submetidos à lavagem em água corrente por 10 minutos e  
14 subseqüentemente em água destilada por cinco minutos.

15           Para a recuperação dos epitopos antigênicos, os cortes foram submersos em 500 ml  
16 de tampão EDTA 1mM, pH 8.0, e submetidos a três ciclos de aquecimento por 5 minutos  
17 cada em microondas em potência máxima. A cada ciclo, o volume evaporado foi restituído  
18 com água bidestilada e tampão de forma alternada. Em seguida, a cuba foi colocada em  
19 local fresco e arejado, à temperatura ambiente, para o devido resfriamento por 20 minutos.

20           Alcançado o equilíbrio térmico, os cortes foram lavados em água corrente por cinco  
21 minutos e em seguida colocados em cubas de Couklin, onde receberam quatro banhos de  
22 cinco minutos cada de água oxigenada (10 V), para bloqueio da atividade da peroxidase  
23 endógena. Logo após, as lâminas novamente foram lavadas em água corrente e colocadas  
24 em Tampão fosfato salina (PBS, do inglês, phosphate buffer saline, traduzido como  
25 tampão fosfato salino) 0,1M pH 7.4, por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados

1 com solução bloqueadora de biotina endógena (DAKO, Co Carpenteria, CA, USA),  
2 seguido da incubação com a solução de avidina, por um período de 20 minutos e lavados  
3 com três banhos de PBS por 3 minutos cada. Logo após foi realizada a incubação dos  
4 cortes histológicos com solução de biotina, por 20 minutos. Imediatamente, após os três  
5 banhos de três minutos cada em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpos  
6 primários, os quais foram mantidos em câmara escura por 19 h a temperatura ambiente.  
7 Para bloquear a coloração de fundo devido a interações hidrofóbicas entre tecidos e  
8 proteínas reagentes, acrescentou-se à solução PBS (utilizada como diluente do anticorpo  
9 primário), 1% de soro albumina bovina (Sigma Chemical Co, USA) com 0,1% de azida  
10 sódica (Sigma Chemical Co, USA).

11 Subseqüentemente à incubação com os anticorpos primários, os cortes histológicos  
12 foram lavados em PBS (três banhos de três minutos), re-incubados com o anticorpo  
13 secundário biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) por 30 minutos, a  
14 37°C. Em seguida, procedeu-se a lavagem em três banhos de três minutos cada em PBS e  
15 os cortes foram incubados com complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO, Co  
16 Carpenteria, CA, USA).

17 A revelação da reação foi feita utilizando 0,08g do cromógeno DAB (3', 3'  
18 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride). Os fragmentos teciduais foram contra-corados com  
19 a solução de hematoxilina de Harris. Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo  
20 primário por solução de BSA a 1%, diluída em tampão PBS, pH 7,4. Os controles positivos  
21 para as reações com diferentes anticorpos foram obtidos seguindo-se as orientações dos  
22 fabricantes, a saber: CD34, tumor do estroma gastrointestinal; CD105, linfoma e amígdala;  
23 PDEGF, amígdala; e VEGF, carcinoma ductal de mama. Vários casos apresentavam  
24 fragmentos teciduais de glândulas salivares onde se observavam parênquima e estroma

1 com aspectos usuais de normalidade, cujos componentes também foram observados quanto  
2 à expressão ou não dos antígenos pesquisados.

3 Na TABELA 3 estão distribuídos os dados referentes às procedências e condições  
4 de trabalho que foram utilizadas nas reações.

5 **TABELA 3 – Anticorpos primários e condições de trabalho utilizadas na técnica imuno-histoquímica.**  
6

Reagentes	Clone	Procedência	Titulação de Ac Primário	Fonte
CD105	SN6h	DAKO <sup>1</sup>	1:100	Camundongo
CD34	QBend10	DAKO <sup>1</sup>	1:300	Camundongo
PDEGF	P-GF. 44c	Novocastra <sup>2</sup>	1:400	Camundongo
VEGF	VC-1	Santa Cruz <sup>3</sup>	1:50	Coelho

7 1 – Dako Cyto Co, Carpenteria, CA, USA.

8 2 – Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK.

9 3 – Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA.  
10

## 11 **5.1. ANÁLISE QUALITATIVA DA EXPRESSÃO ANTIGÊNICA** 12 **TUMORAL**

13 A análise qualitativa foi desenvolvida a partir da observação e descrição do padrão  
14 de expressão dos diferentes antígenos pesquisados considerando o parênquima e o estroma  
15 tumoral, a saber:

- 16 1. Parênquima tumoral: Este padrão de descrição foi adotado para os antígenos  
17 PDEGF e VEGF. As marcações foram consideradas segundo a  
18 compartimentalização celular (citoplasma, núcleo e membrana  
19 citoplasmática), os tipos celulares marcados (células luminiais, não luminiais,  
20 epidermóides, intermediárias, mucosas, claras), e a localização das  
21 marcações nos diversos padrões arquiteturais dos tumores investigados.
- 22 2. Estroma tumoral: Esta topografia foi considerada particularmente para  
23 avaliação de CD34 e CD105 nos vasos sanguíneos. Aí foram consideradas  
24 as localizações dos vasos marcados assim caracterizadas: próximas aos

1                   lóbulos tumorais, seja na periferia ou no seu interior do lóbulo (estroma  
2                   englobado pelo parênquima tumoral); distantes do tumor, considerando as  
3                   áreas do estroma mais afastadas do parênquima tumoral, seja no interior ou  
4                   na periferia do crescimento neoplásico.

5

## 6                   **5.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO ANTIGÊNICA TUMORAL:**

7                   Para a avaliação dos padrões de expressão antigênica estudados, foram utilizadas  
8                   duas análises: quantitativa e semi-quantitativa.

9

### 10                   **Avaliação Quantitativa:**

11                   A análise quantitativa dos antígenos CD34 e CD105 para quantificação  
12                   microvascular tumoral foi realizada a partir da construção de índices de expressão  
13                   antigênica ou índices de marcação imuno-histoquímica (IM) do antígeno. O método de  
14                   quantificação microvascular utilizado foi o de Weidner et al, (1991), recentemente  
15                   modificado conforme Consenso Internacional para Avaliação da Angiogênese em Tumores  
16                   Sólidos Humanos (VERMEULEN, 2002). Inicialmente, a secção histológica foi observada  
17                   sob média ampliação (ampliação original de 200 X, área do campo 0,82 mm<sup>2</sup>) utilizando-se  
18                   um microscópio de luz visível (NIKON Eclipse E-400, Nikon Inc., Japão) a fim de  
19                   identificar áreas com maior densidade vascular, designadas como *hot spots* (“áreas  
20                   quentes”), traduzidas pela maior densidade de coloração de tonalidade marrom. Nessas  
21                   áreas, foi realizada a contagem de 10 diferentes campos com ampliação original de 400x  
22                   (área do campo 0,2 mm<sup>2</sup>). Para a facilitação dos trabalhos, foram capturados, nestas áreas,  
23                   10 campos sequenciais por meio de câmara fotográfica digital acessória ao microscópio  
24                   (Coolpix 4300, Nikon Inc., Japão). As imagens foram transferidas e salvas como arquivos  
25                   com extensão “JPG” no *software* Adobe Photoshop<sup>®</sup> CS2, versão 9.0 (Adobe Systems Inc.,

1 USA, 2005), sendo a contagem realizada a partir destes arquivos. As contagens médias  
2 para cada caso foram então registradas como densidade microvascular (DMV). Não foram  
3 incluídos na contagem os vasos marcados em áreas próximos à inflamação, necrose e  
4 fibrose (WEIDNER et al., 1991; UZZAN et al., 2004; SHARMA et al., 2005).

5 Além disso, para realizar-se análise de associação e sobrevida foi utilizada a  
6 mediana de marcação dos AP para determinar o valor de *cut-off* no CD34 e CD105. Para  
7 CD34 valores acima de 8,3 foram considerados positivos, e para CD105, valores acima de  
8 0,1 foram considerados positivos.

9 Vale ressaltar que todas as avaliações foram realizadas por quatro observadores,  
10 Kelen Christine do Nascimento Souza, Prof. Dr. Adriano Mota Loyola (Orientador, Doutor  
11 e Professor em Patologia da Universidade Federal em Uberlândia), Paulo Rogério de Faria  
12 (Doutor e Professor em Patologia) e Sérgio Vitorino Cardoso (Pós-doutor e Professor em  
13 Patologia da Universidade Federal em Uberlândia).

14

#### 15 **Avaliação Semi-Quantitativa:**

16 Para os antígenos PDEGF e VEGF a análise semi-quantitativa foi empregado um  
17 índice obtido, considerando dois padrões: o padrão de intensidade de expressão  
18 predominante, e o percentual de marcação antigênica tumoral, independente do padrão de  
19 intensidade predominante (LIM et al, 2003; ZHANG et al, 2005). O desenvolvimento desta  
20 metodologia obedeceu a seguinte dinâmica: inicialmente, em aumento original de 400X,  
21 foram avaliadas as intensidades que predominavam nos tumores, classificando-as em três  
22 categorias: **1** – fraca; **2** – moderada; e **3** - forte. Em seguida, utilizando-se objetiva de  
23 200X, estimou-se o percentual de células marcadas nos tumores, categorizando-o nos  
24 seguintes intervalos: 0 a 19% (**0**), 20 a 39% (**1**), 40 a 59% (**2**), e 60-100% (**3**). Daí, os  
25 valores obtidos foram somados, resultando em índices de marcação traduzindo três

1 categorias semi-quantitativas de expressão antigênica: **1-2**: expressão fraca; **3-4**: expressão  
2 moderada, e **5-6**: expressão forte.

3 Todas as avaliações e análises foram realizadas por três observadores. Os casos  
4 discordantes foram reavaliados e discutidos para o estabelecimento de um padrão comum  
5 de interpretação.

6

### 7 **5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

8 Os resultados obtidos foram descritos segundo os princípios da estatística descritiva  
9 utilizando-se médias, desvio-padrão e percentuais de observações. Previamente as análises  
10 estatísticas pertinentes, os dados foram testados quanto a normalidade de sua distribuição  
11 pelo teste de KOLMOGOROV-SMIRNOV (SIEGEL, 1975).

12 Os resultados desta análise determinaram a utilização de testes não paramétricos  
13 para CD105, VEGF e PDEGF, e paramétricos para CD34 nas diferentes análises propostas  
14 e explicitadas a seguir (SIEGEL, 1975)

15 1. Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças nos resultados  
16 obtidos da quantificação de CD34 e CD105, os testes t de Student (CD34) e U de  
17 Mann-Whitney (CD105) foram aplicados nas seguintes situações:

18 a. Comparar AP (tumores benignos) e o conjunto dos tumores primários  
19 malignos (*Pmalig*, representados pelo conjunto de todos os tumores  
20 metastatizantes e não metastatizantes);

21 b. Comparar o conjunto dos tumores primários metastatizantes (*PM*) e não  
22 metastatizantes (*PNM*)

23 c. Comparar os tumores primários metastatizantes (*pm*) e não metastatizantes  
24 (*pnm*) para cada subtipo histológico (APBG, CME, CAC),

- 1        2. A investigação de diferenças de angiogênese entre os diferentes subtipos  
2        histológicos (APBG, CME e CAC), a partir da expressão de CD34 e CD105 foi  
3        analisada utilizando-se o teste ANOVA com pós-teste de Tuckey, para CD34 e  
4        Kruskall-Wallis, com correção de Dunn para os valores de CD105.
- 5        3. A análise dos resultados de VEGF e PDEGF foi realizada utilizando os testes Qui-  
6        Quadrado e Exato de Fisher, para verificação de associação da intensidade de  
7        expressão (**FRACA**, soma final dos escores intensidade e frequência igual a 1 ou 2;  
8        e **FORTE**, escores finais entre 3 e 6) com:
  - 9            a. A natureza das lesões (AP e *Pmalig*);
  - 10           b. Com a presença de metástases ou não considerando o conjunto das  
11           neoplasias malignas (*PM* e *PNM*);
  - 12           c. Com os subtipos histológicos (APBG, CME e CAC) isoladamente, e  
13           também considerando a presença de metástases (*pm*) ou não (*pnm*);
- 14        4. A investigação da presença de associação entre as expressões de CD34 e CD105  
15        com a presença ou não de metástases foi realizada utilizando-se o teste do Qui-  
16        quadrado e o teste Exato de Fisher.
- 17        5. A análise de associação entre sobrevida e os diferentes marcadores avaliados foram  
18        realizados pelo teste de Breslow e Log-Rank a partir de *cut-offs* previamente  
19        estabelecidos, como mencionado nos itens referentes a avaliação quantitativas e  
20        semi-quantitativas das avaliações.
- 21        6. Foram analisadas a presença de correlação entre a expressão de CD34, VEGF e  
22        PDEGF, e CD105, VEGF e PDEGF pelo Teste de correlação de *rank* de Spearman.  
23        Todas as análises foram realizadas com nível de confiança de 95%, considerando-se  
24        significativos os valores de  $p < 0,05$ . A maioria das análises foram realizadas utilizando-se  
25        o software Bioestat 4.0 (AYRES, 2004). A análise de sobrevida foi realizada utilizando-se

1 os programas KMSurv e CoxSurv para análise uni e multivariada, respectivamente  
2 (CAMPOS-FILHO & FRANCO, 1990).

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

**RESULTADOS**



## 1           **6. RESULTADOS**

2

3           Os dados relativos à idade, ao sexo e à localização dos tumores, bem como os  
4 relativos à classificação histológica são mostrados na TABELA 4 e TABELA 5,  
5 respectivamente.

6           Os tumores malignos primários não metastatizantes tiveram um período de  
7 acompanhamento que variou de zero a noventa meses.

8           Na amostra de AP (30 casos) todos os casos foram tratados com enucleação  
9 cirúrgica (100%), não foi observada recorrência e todos os casos estavam vivos sem  
10 doença (VSD) (100%) (TABELAS 4 e 5). O tempo de acompanhamento foi em média de  
11 10 meses.

12           Nos APBG (19 casos), a recorrência foi observada em 5,2% dos casos. Metástases  
13 ocorreram em 10,5% dos casos (dois casos): um caso apresentou metástase regional e à  
14 distância (5,2%) e outro desenvolveu metástases à distância para pulmão (5,2%). O  
15 tratamento cirúrgico exclusivo foi à modalidade terapêutica empregada em cinco casos  
16 (26,3%); para 13 casos (68,4%) foram tratados com cirurgia e radioterapia adjuvante; em  
17 um caso (5,2%) após biópsia incisional realizou apenas radioterapia. No período de  
18 acompanhamento, 14 pacientes estavam vivos sem doença (VSD) (73,6%), três pacientes  
19 foram à óbito relacionado ao câncer (ORC) (15,7%), um vivo com doença primária  
20 (VCDp) (5,2%), e um vivo com doença recorrente (VCDr) (5,2%) (TABELAS 4 e 5). O  
21 tempo de acompanhamento foi em média de 41,5 meses.

22           Em relação ao CME (40 casos), metástases foram detectadas em 7,5% dos casos  
23 (três casos). Em dois casos as metástases foram para linfonodo (5,0%); em um acometeu  
24 linfonodo e pulmão (2,5%). Nenhuma recorrência foi observada. Vinte e um casos (52,5%)  
25 foram tratados exclusivamente por cirurgia, 18 tratados por cirurgia associada à

1 radioterapia (45,0%) e um, por ter sido considerado fora de possibilidade de tratamento  
2 realizou apenas radioterapia paliativa após a biópsia incisional (2,5%). No período de  
3 acompanhamento considerado, 36 pacientes estavam VSD (90,0%) e quatro pacientes  
4 foram a ORC (10,0%) (TABELAS 4 e 5). O tempo de acompanhamento foi em média de  
5 48,5 meses.

6        Dos 50 casos de CAC incluídos no estudo, onze pacientes tinham metástases  
7 (22,0%), desses cinco apresentaram metástases à distância (10,0%), dois cervicais (4,00%)  
8 e três cervicais e à distância (8,00%). Seis pacientes apresentaram recidivas (12,0%).  
9 Trinta e cinco casos (70,0%) foram tratados por cirurgia e radioterapia, 11 tratados  
10 exclusivamente por cirurgia (22,0%), dois após biópsia incisional, apenas radioterapia  
11 (4,0%) e dois realizaram apenas biópsia incisional (4,0%). Quanto aos dados do  
12 acompanhamento dos pacientes, 31 estavam VSD (62,0%), nove pacientes foram a ORC  
13 (18,0%), três estavam vivos com doença metastática (VCDm) (6,0%), cinco VCDr  
14 (10,0%), um VCDp (2,0%) e um óbito não relacionado ao câncer (ORnC) (2,0%)  
15 (TABELAS 4 e 5). O tempo de acompanhamento foi em média de 46,5 meses.

**TABELA 4- Distribuição dos tumores epiteliais de glândulas salivares da amostra estudada, provenientes do INCA, diagnosticadas e tratadas no período de 1997 a 2003, de acordo com sua natureza histológica e principais dados sócio-demográficos e clínico.**

Neoplasias <sup>δ</sup>	N <sup>o#</sup>	Idade <sup>(α)</sup>	Cor (%) <sup>β</sup>			M:F	Dimensão <sup>(α)</sup> (cm)	Tempo de queixa <sup>(β)</sup> (meses)	Sinais e sintomas Prevalentes	Estadiamento			
			B	P	N					I	II	III	IV
AP	30	48,13 ± 16,2	40,0%	14,3%	46,7%	0,5 : 1	3,2 ± 1,7	43,2 ± 36,5	Tumoração assintomática	NA	NA	NA	NA
APBG	19	60,50 ± 9,4	58,0%	21,0%	21,0%	0,9 : 1	4,2 ± 2,2	41,5 ± 20,0	Tumoração e dor	3	5	8	3
CME	40	39,8 ± 18,7	37,5%	40,0%	22,5%	0,5 : 1	3,5 ± 1,8	48,5 ± 23,2	Tumoração e dor	9	19	6	6
CAC	50	51,4 ± 16,9	48,0%	40,0%	12,0%	0,5 : 1	3,7 ± 2,3	46,3 ± 24,1	Tumoração e dor	8	21	8	13

**δ** - AP – adenoma pleomórfico; **APBG** – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; **CME** – carcinoma mucoepidermóide; **CAC** – carcinoma adenóide cístico;  
**# N** - número da amostra; **α** - valores calculados por média e desvio padrão; **β** - **B** - branco; **P** - pardo; **N** - negro; **NA** - não se aplica;

**TABELA 5- Distribuição das neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares de origem epitelial selecionadas para compor a amostra, registradas no INCA/MS-RJ, no período de 1998 a 2003, segundo: tipos histológicos, localização, procedimento realizado, recorrência, metástases, e estado atual.**

Neoplasia	N	Tipos Histológicos	Localização	Intervenção realizada	Recorrência	Metástases	Estado atual
AP	30	NA	Parótida (17) Submandibular (7) Palato (5) Bochecha (1)	30 EC	-	-	30 VSD
APBG <sub>pnm</sub>	17	NA	Palato (11) Bochecha (5) Parótida (1)	5 EC 12 EC + RT	1	-	14VSD 1VCDr 1VCDp 1 ORC
APBG <sub>pm</sub>	2	NA	Base da língua (1) Lábio inferior (1)	1 EC + RT 1 BX + RT		1 MD 1 MC + MD	2 ORC
CME <sub>pnm</sub>	37	Alto grau (11) Moderado (9) Baixo grau (17)	Parótida (14) Palato (11) Base da língua (3) Assoalho (2) Trígono retromolar (2) Mucosa bochecha (2) Submandibular (2) Lábio superior (1)	21 EC 15 EC + RT 1 BX + RT		-	34 VSD 3 ORC
CME <sub>pm</sub>	3	Alto grau (2) Baixo grau (1)	Parótida (1) Assoalho (1) Trígono retromolar (1)	3 EC + RT	-	2 MC 1 MC + MD	2 VSD 1 ORC
CAC <sub>pnm</sub>	39	Tubular (13) Cribriforme (22) Sólido (4)	Palato (11) Parótida (8) Base de língua (5) Submandibular (4) Bochecha (4) Sublingual (3) Lábio Superior (2)	27 EC + RT 9 EC 2BX + RT 1 BX	6	-	33 VSD 3 VCDr 2 ORC 1OnRC 1VCDp
CAC <sub>pm</sub>	11	Tubular (1) Cribriforme (4) Sólido (6)	Submandibular (6) Trígono retromolar (2) Assoalho (1) Base de língua (1) Parótida (1)	8 EC + RT 2 EC 1 BX	-	2 MC 3 MC + MD 6 MD	5 ORC 3 VCDm 3 VSD

AP – adenoma pleomórfico; APBG – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CME – carcinoma mucoepidermóide; CAC – carcinoma adenóide cístico, *pnm* – primário não metastatizantes, *pm* – primário metastatizante, EC- enucleação cirúrgica, VSD – vivo sem doença, ORC – óbito relacionado ao câncer, VCDr- vivo com doença recidivada, VCDp- vivo com doença primária, VCDm- vivo com doença metástases, BX- biópsia incisional, RXT- radioterapia, MD- metástases a distância, MC- metástases cervical, NA - não se aplica, VSD – vivo sem doença; ORC – óbito relacionado ao câncer; VCDr- vivo com doença recidivada; VCDp- vivo com doença primária; VCDm- vivo com doença metástases.

## 6.1. ANÁLISE QUALITATIVA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO ANTIGÊNICA

### Fator Endotelial de Crescimento Vascular - VEGF

#### • Glândula Normal

Em geral, os ductos intercalares e interlobulares não marcaram ou apresentaram uma expressão antigênica fraca. Os ductos excretores apresentaram uma marcação mais forte. Em todos os casos avaliados, os ácinos mucosos não apresentaram imuno-reatividade ao VEGF. Nos ácinos serosos, observou-se positividade no citoplasma e sobreposta a um segmento da membrana, sugerindo marcação de célula mioepitelial. As estruturas vasculares presentes nas glândulas apresentaram expressão imuno-histoquímica variando de fraca a forte (FIGURA 1A).

#### • Epitélio de Revestimento Normal e outros Tecidos

A marcação do tecido epitelial de superfície ocorreu no citoplasma das células da camada basal, parabasal e intermediária, variando de fraca a forte. Alguns segmentos epiteliais não mostraram imunomarcação. As camadas mais superficiais foram homoganeamente negativas. Na lâmina própria papilar e reticular a marcação mostrou-se forte nos vasos sanguíneos. O músculo estriado presente em vários cortes apresentou marcação citoplasmática de fraca a moderada (FIGURA 1B). Os adipócitos apresentaram marcação na membrana citoplasmática de fraca a moderada.

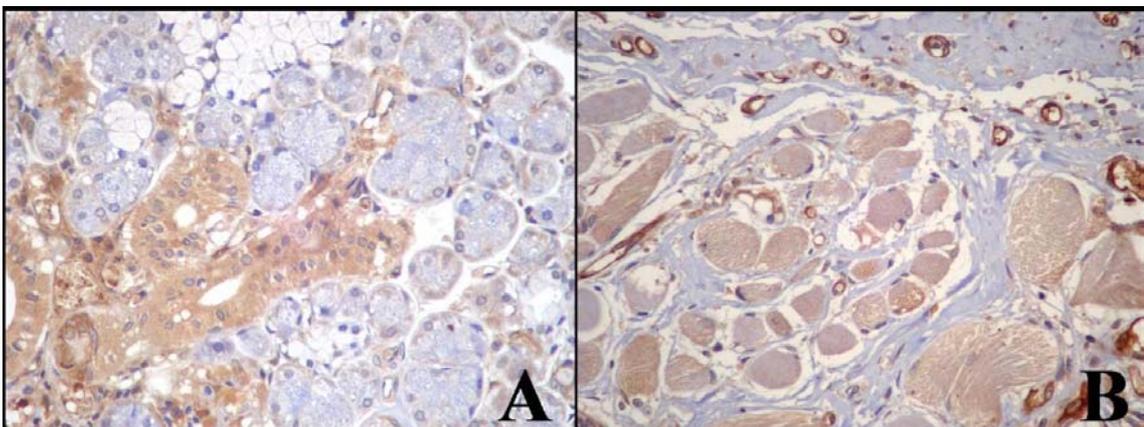
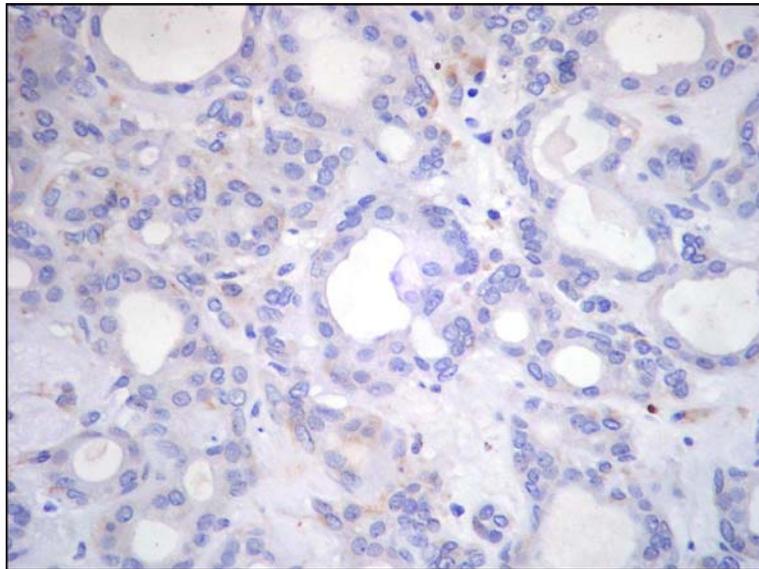


FIGURA 1- Expressão de VEGF em glândula salivar normal. A) Presença de parênquima salivar apresentando unidades secretoras e seguimentos de ductos salivares intralobulares. Observar a presença de marcação intensa nos túbulos e ausência de marcação nas células acinares. Expressão antigênica também é observada em pequenos vasos no interstício glandular; B) Estroma de região periglandular, onde se observam feixes musculares esqueléticos com positividade moderada e pequenos vasos intensamente marcados. (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X).

1       • **AP**

2           Quando observadas, as marcações variaram de fraca a moderada, localizadas em  
3 estruturas ductais, tanto em células luminais quanto em células não luminais. A maior  
4 intensidade de marcação prevaleceu nas células luminais. As áreas condróides e mixóides  
5 não apresentaram marcação. A marcação vascular também variou de fraca a moderada  
6 (FIGURA 2). Todavia, alguns vasos não expressaram reatividade.

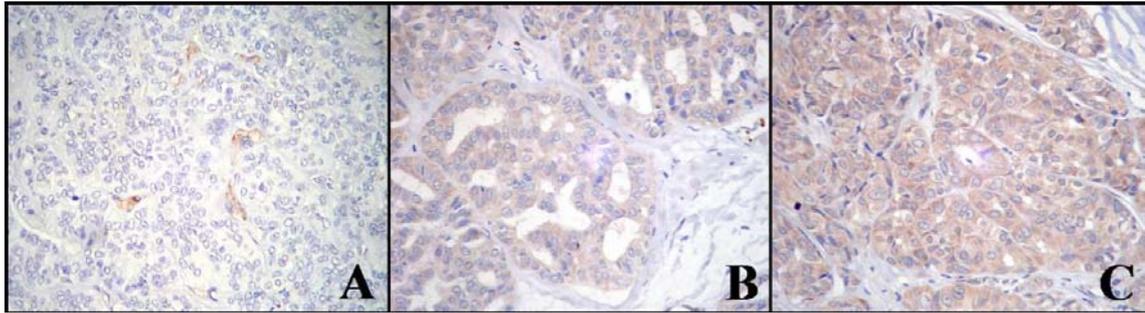


7  
8  
9  
10  
11  
12

**FIGURA 2-Expressão de VEGF em AP. Área predominada pela presença de estruturas discreta expressão em células ductais luminais (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X). ductais onde prevalece**

13       • **APBG**

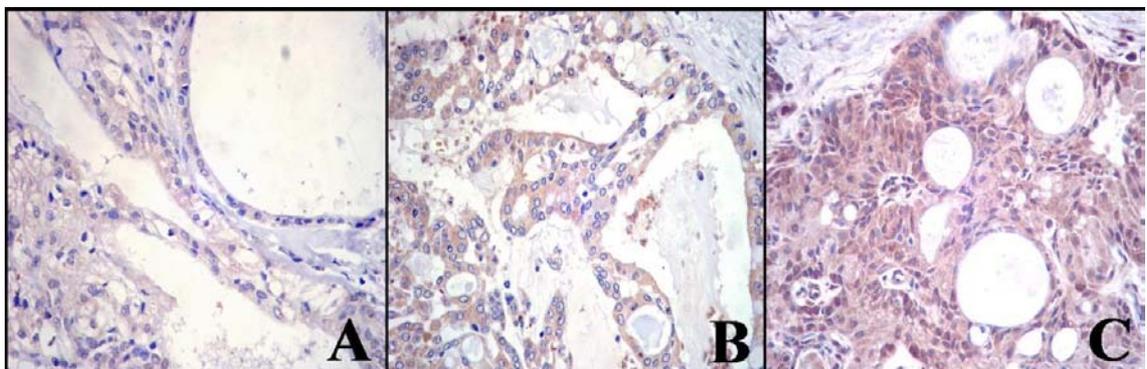
14           A marcação variou de fraca a moderada intensidade, sendo observada no citoplasma  
15 tanto das células luminais quanto das não-luminais, prevalecendo maior intensidade nas  
16 primeiras. Nas áreas sólidas, cribriformes e cístico-papilares não foi possível observar um  
17 padrão particular e repetitivo de expressão. Nestas áreas, notou-se uma expressão em  
18 mosaico (heterogeneidade de intensidade) (FIGURA 3). Nas células margeando áreas de  
19 necrose foram observadas marcações mais intensas.



1  
2  
3 **FIGURA 3- Expressão de VEGF em APBG. A) Observam-se pequenos vasos expressos no estroma**  
4 **tumoral permeando áreas sólidas da lesão. Nesta região, as células neoplásicas são negativas; B)**  
5 **Presença de crescimento papilar, mostrando a marcação de células cubóides, em intensidade**  
6 **moderada; C) Área do tumor predominada pela presença de áreas ductais e sólidas justapostas. Aqui,**  
7 **nota-se intensa expressão antigênica citoplasmáticas em todas as células tumorais. (Streptavidina-**  
8 **biotina-peroxidase, 400x)**  
9  
10

11 • **CME**

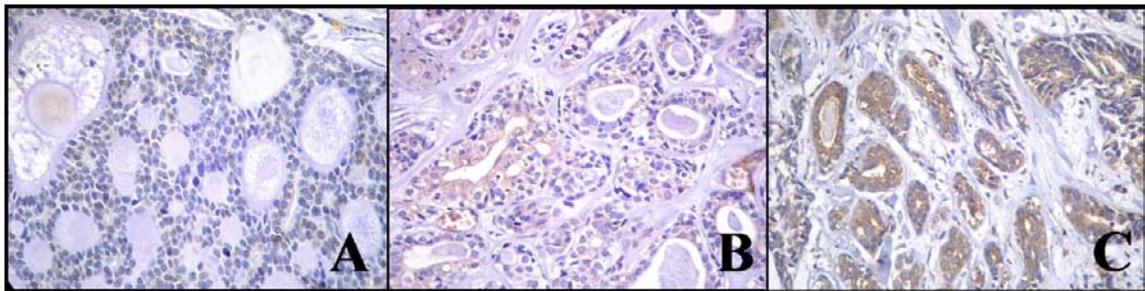
12 Neste tumor a marcação ocorreu tanto nas áreas císticas quanto nas áreas sólidas,  
13 mas foi menos intensa na primeira. A imuno-reatividade, também num padrão em mosaico,  
14 foi mais evidente no citoplasma das células intermediárias, epidermóides e luminais  
15 (FIGURA 4). Células superficiais das estruturas císticas, células colunares, caliciformes e  
16 mucosas foram negativas para essa proteína. Os vasos apresentaram marcação de  
17 moderada a forte. Células neoplásicas margeando áreas de necrose mostraram maior  
18 intensidade de expressão antigênica.



19  
20  
21 **FIGURA 4- Expressão de VEGF em CME. Em A, nota expressão antigênica predominantemente fraca**  
22 **associada às células intermediárias e epidermóides, incluindo aquelas situadas no revestimento do**  
23 **espaço cístico. Ausência de marcação nas células mucosas; B) Áreas cístico-papilares mostrando**  
24 **células colunares intermediárias com marcação de moderada intensidade; C) Nódulos com padrão de**  
25 **crescimento sólido, com presença de estruturas ductais. Todas as células, com aspecto de células**  
26 **intermediárias e epidermóides com intensa marcação para VEGF (Streptavidina-biotina-peroxidase,**  
27 **400X).**

1       • **CAC**

2           Neste tumor, a marcação variou de fraca a moderada intensidade, com áreas  
3 desprovidas de marcação. Localizavam-se preferencialmente no citoplasma das células  
4 lumbais e não-lumbais e também num padrão em mosaico (FIGURA 5). Nas formações  
5 sólidas, as marcações foram mais fortes. Nas áreas ductais das formações cribriformes e  
6 tubulares, as expressões mais intensas foram observadas nas células lumbais. Diferentes  
7 intensidades de imunomarcação foram observadas nos vasos sanguíneos do estroma  
8 tumoral. Células neoplásicas margeando áreas de necrose mostraram maior intensidade de  
9 expressão antigênica. Para todos os tumores analisados, não foi possível verificar uma  
10 preferência de imunomarcação vascular vinculada à topografia dos vasos no estroma  
11 tumoral.



12  
13  
14 **FIGURA 5- Expressão de VEGF em CAC. A) Área da lesão com padrão cribriforme de crescimento. A**  
15 **marcação fraca é observada em células ductais lumbais e, aparentemente, em células não lumbais; B)**  
16 **área do tumor com padrão tubular apresentando marcação moderada em células lumbais das**  
17 **estruturas ductais. Alguns vasos são positivos no mesmo padrão de marcação, com**  
18 **expressão antigênica também presente em hemácias; C) Área com padrão tubular de crescimento com**  
19 **marcante expressão em células ductais lumbais. (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X)**  
20  
21

22 Fator endotelial de crescimento endotelial derivado de plaquetas - PDEGF

23       • **Glândula normal e tecido epitelial**

24           No geral, o tecido epitelial e ácinos mucosos e serosos foram negativos; alguns  
25 casos, contudo, marcação nos ácinos foi observada, com a intensidade variando de fraca a  
26 forte; quando negativas, a marcação era visível apenas nos ductos intralobulares e  
27 interlobulares (intensidade forte), apesar de que ductos não marcados também foram  
28 observados; em poucos casos era possível notar marcação em tecido epitelial de superfície  
29 ora restringindo-se às camadas mais profundas ora às mais superficiais.

1       • **AP**

2           No geral, a imunoreatividade foi negativa, mas focos de marcação fraca a moderada  
3       foi observada em algumas estruturas ductais. Nestes casos, a marcação se restringia a  
4       células luminais. Áreas condróides e condromixóides foram sempre negativas. Células  
5       mioepiteliais foram usualmente negativas, mas em alguns casos uma fraca marcação pode  
6       ser verificada (FIGURA 6).

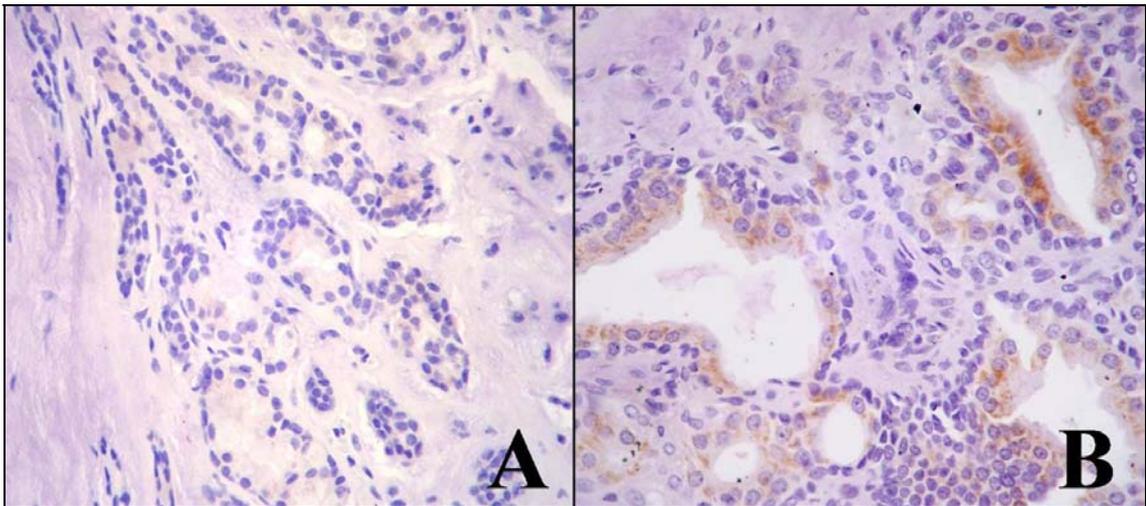
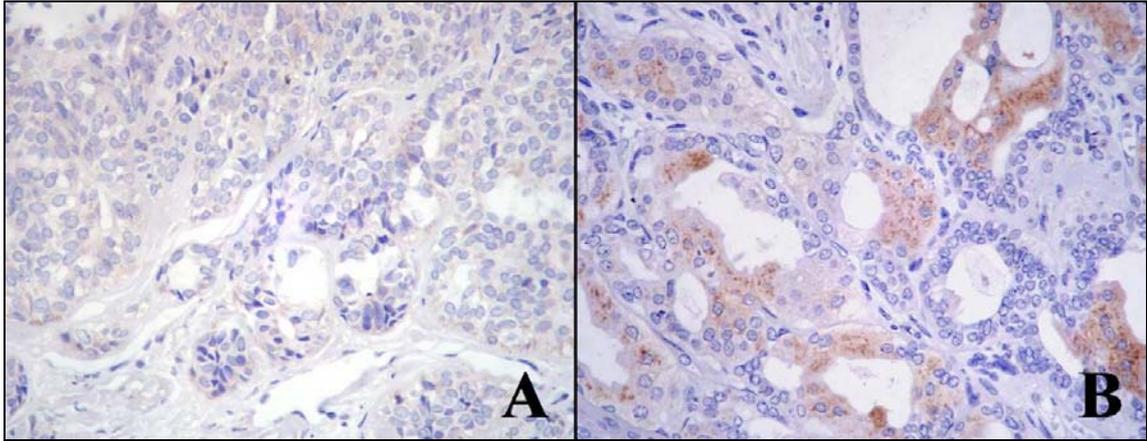


FIGURA 6- Expressão de PDEGF em AP. A) Áreas com predomínio de estruturas ductais, apresentando fraca expressão de PDEGF em células luminais; B) Outra área com estruturas epiteliais-mioepiteliais, onde os ductos mostram uma expressão antigênica mais acentuada (Streptavidina-peroxidase, 400X).

14       • **APBG**

15           Uma variação intratumoral e intertumoral foi observada: em alguns tumores, a  
16       imunoreatividade era difusa, mas, em outros, focal; a marcação era predominantemente  
17       citoplasmática, mas células isoladas apresentavam também uma discreta marcação nuclear;  
18       naqueles de marcação difusa, a mesma era observada nas áreas sólidas, tubulares,  
19       glomerulares. Em um caso em particular, a imunoreatividade se restringia as estruturas  
20       tubulares e glandulares, de intensidade moderada a forte, e citoplasmática (FIGURA 7).



1  
2  
3 **FIGURA 7- Expressão de PDEGF em APBG. A) Área do tumor predominada por estruturas sólidas e**  
4 **tubulares em que a expressão aparece fraca. B) Outra área caracteristicamente tubular em que as**  
5 **células luminais apresentam expressão antigênica intensa (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X).**  
6

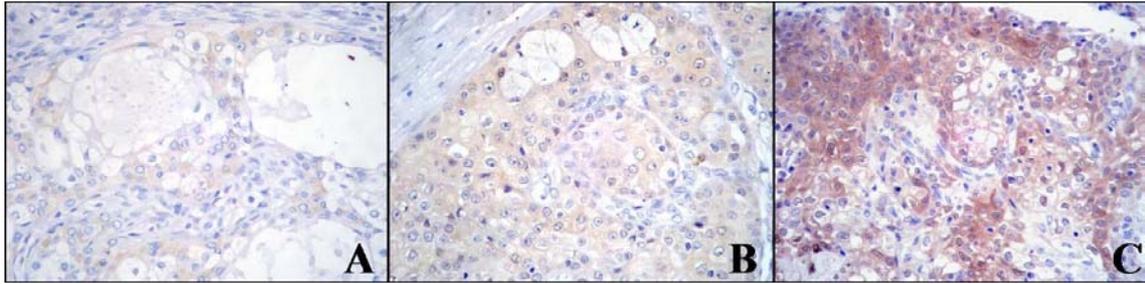
7       • **CME**

8           Nos tumores cuja marcação foi predominantemente de intensidade fraca, uma  
9       variação intralesional foi observada, ou seja, áreas de marcação de intensidade um pouco  
10      mais forte eram notadas nas regiões mais sólidas do tumor (FIGURA 8); regiões  
11      constituídas pelas células mucosas e intermediárias eram negativas.

12           Nos tumores de marcação forte a imunoreatividade era difusa e, no geral,  
13      homogênea; contudo áreas de intensidade mais forte foram observadas dentro do mesmo  
14      tumor, principalmente nas áreas mais epidermóides. Células mucosas eram negativas, mas  
15      células intermediárias mostravam marcação predominantemente citoplasmática e de  
16      intensidade moderada a forte em alguns casos. Nas áreas microcísticas e ductais, a  
17      marcação era variável, sendo mais intensa quando as células apresentavam diferenciação  
18      escamosa.

19           No geral, a marcação era predominantemente citoplasmática, mas marcação nuclear  
20      também foi notada, principalmente em áreas de intensidade mais forte.

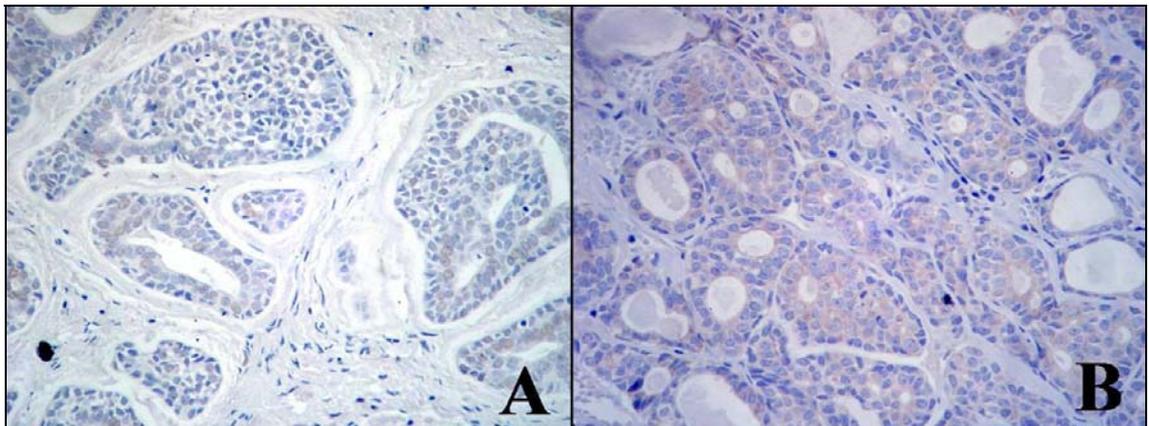
21



1  
2  
3 **FIGURA 8- Diferentes áreas do CME expressando PDEGF. A) Área constituída por estrutura cística e**  
4 **presença de células mucosas. Células intermediárias e epidermóides apresentando fraca expressão. B)**  
5 **Expressão variando de fraca a moderada nas células intermediárias e epidermóides em área sólida do**  
6 **CME; C) Padrão de crescimento tumoral semelhante ao visto em B, apresentando marcações fortes em**  
7 **células intermediárias e epidermóides (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X).**  
8  
9

10 • **CAC**

11 A imunoreatividade, no geral, em praticamente todos os tumores foi fraca; quando  
12 presente ela apresentava um padrão difuso e citoplasmático, inclusive em células ductais.  
13 Células revestindo as estruturas microcísticas também foram negativas; nos tumores  
14 sólidos, histologicamente mais agressivos, a imunoreatividade era a mesma quando  
15 comparado aos demais tipos histológicos, ou seja, ou era ausente ou fraca (FIGURA 9).



16  
17  
18 **FIGURA 9- Expressão de PDEGF em CAC. A. Marcação de intensidade fraca (A) e moderada (B),**  
19 **observada principalmente em células luminiais de estruturas cribriformes e tubulares**  
20 **(Streptavidina-biotina-peroxidase, 400X).**  
21  
22  
23

## 1            **CD34**

### 2            • **Glândula Normal**

3            Foi observada marcação nos vasos presentes no estroma de todos os tipos de  
4 glândulas salivares maiores e menores. Nas áreas de inflamação foi observada maior  
5 densidade vascular reconhecida pela expressão do CD34.

### 6            • **AP**

7            Presença de marcação nos vasos que margeiam o tumor em áreas bem  
8 celularizadas. Ausência de marcação nas áreas condróides, e menos freqüente nas áreas  
9 mixóides. Eventualmente, as áreas próximas à cápsula fibrosa apresentavam maior  
10 vascularização (FIGURA 10A).

### 11           • **APBG**

12           A marcação ocorreu nos vasos que margeavam o tumor e também nos vasos  
13 localizados no estroma que separa as ilhas tumorais. Eventualmente, foi observada maior  
14 densidade de expressão (vascularização) em áreas de invasão tumoral (FIGURA 10B).

### 15           • **CME**

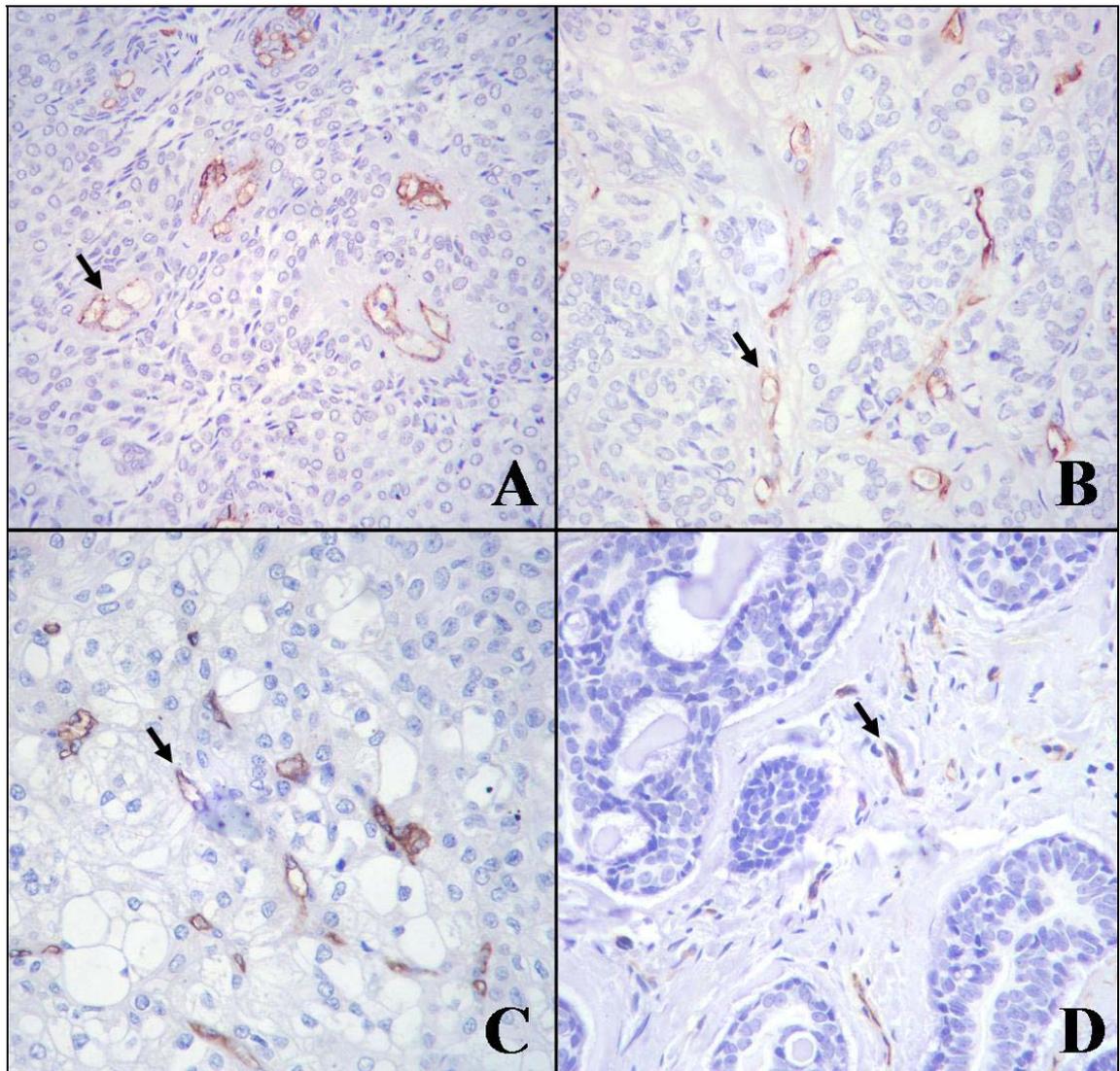
16           Foi observada marcação nos vasos que margeam o tumor e no tecido conjuntivo  
17 que dá sustentação as ilhotas, sendo observada maior densidade de marcação  
18 (vascularização) nas áreas mais celularizadas que nas áreas císticas (FIGURA 10C). Nas  
19 áreas próximas as ilhotas de células mucosas, foram observadas menor quantidade de  
20 vasos. A densidade tumoral próxima à necrose e inflamação não foi aparentemente  
21 semelhante aquelas observadas próximas ao tumor.

### 22           • **CAC**

23           Os vasos apresentaram marcação nas áreas do estroma que envolve a lesão e  
24 margeando as ilhotas tumorais (FIGURA 10D). Eventualmente foi observada maior  
25 vascularização nas áreas de invasão de tecido adiposo, epitélio de revestimento (em

1 neoplasias de glândulas menores) e músculo. Em algumas áreas de inflamação foi  
2 observada maior densidade de vasos.

3 Em todas as lesões malignas, muitos lóbulos aparentemente sólidos dispunham-se  
4 em torno de vasos, dando a impressão que o crescimento tumoral apresenta uma tendência  
5 de crescimento angiocêntrico.



6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

**FIGURA 10- Expressão de CD34 nos tumores de glândulas salivares. A) Presença de vasos marcados em áreas hialinizadas de uma área celular mioepitelial do AP (seta); B) Vasos marcados em estroma permeando áreas sólidas do APBG (seta); C) Marcação vascular em delicados septos CME (seta) e D) CAC com nódulos sólidos e estruturas tubulares mostrando estroma permeado por discretos vasos positivos (seta) (Streptavidina-biotina-peroxidase, 400).**

1            **CD105**

2            • **Glândula Normal**

3            Ausência de marcação dos vasos presentes no estroma, independente do tipo  
4 glandular analisado.

5            • **AP**

6            Foi observada marcação vascular de intensidade fraca em apenas três casos. Esses  
7 vasos estavam margeando as ilhotas tumorais, na periferia da lesão em áreas de estroma  
8 hialino (FIGURA 11A).

9            • **APBG**

10           A intensidade de marcação e a densidade vascular foram aparentemente reduzidas  
11 comparativamente àquela observada para CD34. Estes vasos estavam localizados  
12 preferencialmente no estroma marginal as ilhotas tumorais (FIGURA 11B).  
13 Eventualmente, observou-se maior densidade de marcação (vascularização) na periferia  
14 dos fragmentos ensaiados.

15           • **CME**

16           As marcações observadas variaram em intensidade, de fraca a forte. Pode-se  
17 perceber uma aparente densidade vascular que superava aquela observada nos outros  
18 tumores analisados (FIGURA 11C). As expressões observadas mostraram localizações  
19 margeando as ilhotas tumorais de áreas mais celularizadas.

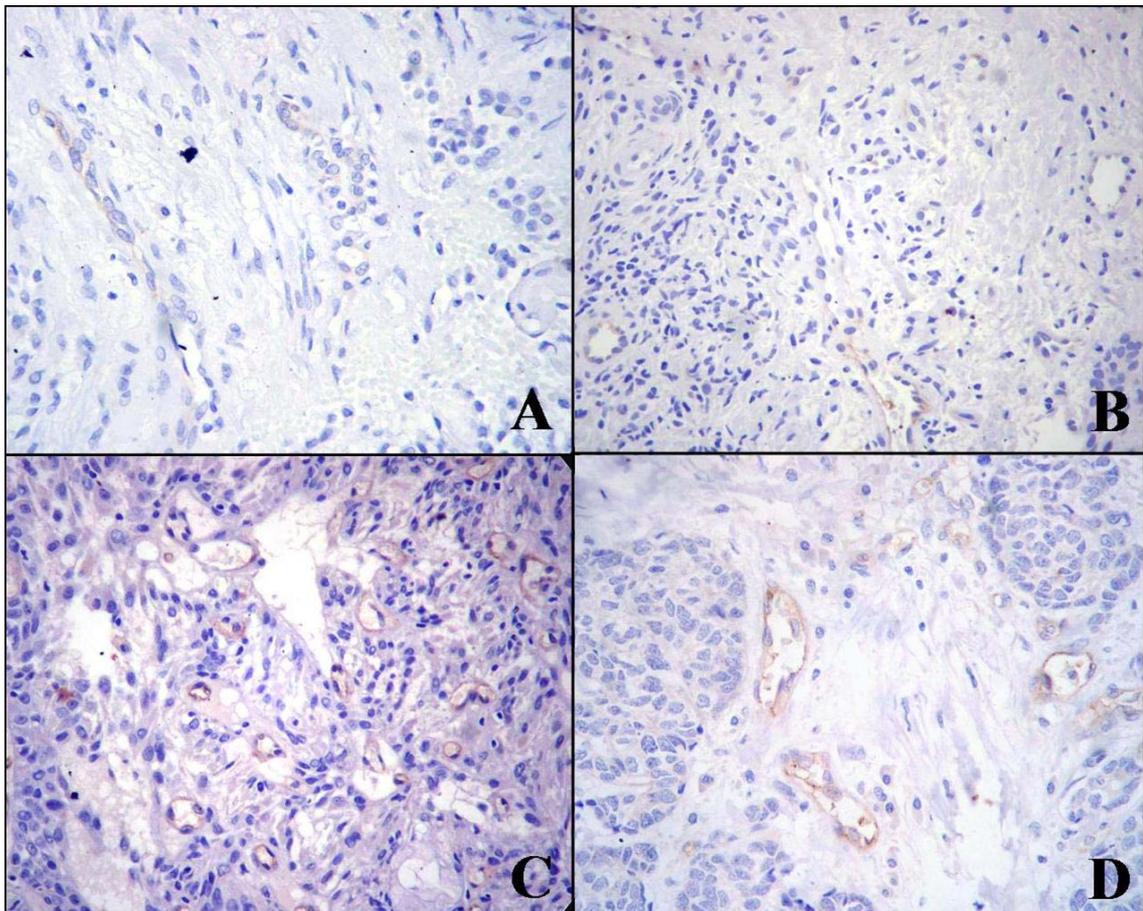
20           • **CAC**

21           Foram observadas marcação dos vasos em apenas cinco casos: dois correspondendo  
22 a lesões metastáticas, e três primários metastatizantes. A quantidade de vasos marcados foi  
23 aparentemente menor que para CD34, e esses estavam localizados tanto no centro quanto  
24 na periferia dos cortes (FIGURA 11D).

1 Foi marcante a diferença em intensidade de marcação observada entre os tumores.  
2 Enquanto no CME predominou marcação mais forte, nas outras lesões observaram-se  
3 marcações variando de fracas a moderadas.

4 Na Figura 7 estão ilustrados os aspectos mais significativos da expressão antigênica  
5 do CD105 nos diferentes tumores estudados.

6



7  
8

9 **FIGURA 11- Expressão de CD105 nos tumores de glândulas salivares. A) Região de AP com estroma**  
10 **parcialmente hialinizado, apresentando pequenos vasos com uma intensidade fraca de marcação**  
11 **(setas). Alguns destes vasos não mostram positividade de expressão; B) Região periférica ao**  
12 **crescimento do APBG mostrando pequenos vasos positivos para CD105 (setas); C) Pequenos vasos**  
13 **com marcação de moderada intensidade em estroma intra-tumoral (setas); D) Região estroma do CAC**  
14 **mostrando vasos com moderada intensidade de expressão antigênica (Streptavidina-biotina-**  
15 **peroxidase, 400X).**

16  
17  
18  
19  
20

1           **5.2. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE CD34 E CD105**  
 2           **NAS NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE GLÂNDULAS**  
 3           **SALIVARES:**

4  
 5           Nas Tabelas 6 e 7 podemos observar a distribuição dos diferentes grupos de  
 6 tumores avaliados e suas respectivas médias percentuais de marcação para CD34 e CD105,  
 7 respectivamente.

8           A densidade microvascular (DMV) obtida pela imunomarcação de CD34 foi maior  
 9 no grupo de tumores malignos (*Pmalig*) sendo 14,4 vasos que no grupo de tumores  
 10 benignos (AP), 9,9 vasos. Além disso, a DMV do grupo de tumores não metastatizantes  
 11 (*PNM*) foi de 12,7 vasos, sendo menor que no grupo de tumores metastatizantes (*PM*), que  
 12 foi de 14,2 vasos. Para cada subtipo histológico, notou-se maior DMV nos casos primários  
 13 não-metastatizantes (*pnm*) que nos primários metastatizantes (*pm*), sendo que as maiores  
 14 DMV foram observadas no *CMEpnm* (17,0 vasos) e no *CMEpm* (14,2 vasos).

16           **TABELA 6- Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares ensaiados para**  
 17           **identificação de CD34 segundo a média e a variação percentual de células marcadas.**

Neoplasia <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	CD34 Média % (variação)
AP	30	9,9 (2,1 - 39,2)
<i>Pmalig</i>	109	14,4 (3,9 - 35,9)
<i>PNM</i>	93	12,7 (5,2 - 33,4)
<i>PM</i>	16	14,2 (3,9 - 35,9)
<i>APBGpnm</i>	17	11,3 (6,0 - 20,5)
<i>APBGpm</i>	2	9,3 (7,30 - 11,30)
<i>CMEpnm</i>	37	17,0 (5,3 - 35,8)
<i>CMEpm</i>	3	14,2 (10,4-16,9)
<i>CACpnm</i>	39	12,9 (3,9 - 33,9)
<i>CACpm</i>	11	13,3 (5,2 - 33,4)

18           **1 - AP** – adenoma pleomórfico; **APBG** – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; **CME** – carcinoma  
 19 mucoepidermóide; **CAC** – carcinoma adenóide cístico, *pnm* – primário não metastatizantes, *pm* –  
 20 primário metastatizante, *Pmalig* – primários malignos.

21           2 - número

22

1 Nas marcações obtidas pelo CD105, foi verificada menos DMV que no CD34.  
 2 Novamente, foi observada maior DMV no grupo *Pmalig* (2,2 vasos) que no AP (0,1 vaso).  
 3 Além disso, a DMV do grupo de *PNM* (2,2 vasos) foi maior que do grupo de *PM* (1,6  
 4 vasos). Para cada subtipo histológico, as maiores DMV foram observadas no *CME<sub>pm</sub>* (5,0  
 5 vasos) e no *CME<sub>pnm</sub>* (4,8 vasos). No *APBG<sub>pm</sub>* e *CAC<sub>pnm</sub>* não foram observados vasos  
 6 com expressão de CD105.

7  
 8 **TABELA 7- Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares ensaiados para identificação de**  
 9 **CD105 segundo a média e a variação percentual de células marcadas.**

Neoplasia <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	CD105
		Média% (variação)
<b>AP</b>	30	0,1 (0 – 3,6)
<b><i>Pmalig</i></b>	109	2,2 (0 – 26,2)
<b><i>PNM</i></b>	93	2,2 (0 – 26,2)
<b><i>PM</i></b>	16	1,6 (0 – 8,6)
<b><i>APBG<sub>pnm</sub></i></b>	17	1,6 (0 – 6,6)
<b><i>APBG<sub>pm</sub></i></b>	2	0 (0)
<b><i>CME<sub>pnm</sub></i></b>	37	4,8 (0 – 26,2)
<b><i>CME<sub>pm</sub></i></b>	3	5,0 (4,8-8,6)
<b><i>CAC<sub>pnm</sub></i></b>	39	0 (0)
<b><i>CAC<sub>pm</sub></i></b>	11	0,6 (0 - 3,4)

10 **1 - AP** – adenoma pleomórfico; **APBG** – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; **CME** – carcinoma  
 11 mucoepidermóide; **CAC** – carcinoma adenóide cístico, ***pnm*** – primário não metastatizantes, ***pm*** – primário  
 12 metastatizante, ***Pmalig*** – primários malignos.

13 **2** – número.

14

### 15 **5.3. AVALIAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE VEGF E** 16 **PDEGF NAS NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE GLÂNDULAS** 17 **SALIVARES:**

18

19 Nas Tabelas 8 e 9, os tumores de glândulas salivares estão distribuídos segundo os  
 20 padrões semi-quantitativos de marcação para VEGF e PDEGF, respectivamente.

21 A marcação de VEGF no grupo de lesões benignas (AP) foi mais FRACA (70,0%)  
 22 que MODERADA (30,0%), não sendo observado nenhum caso FORTE. No grupo de

1 tumores malignos (*Pmalig*) a maioria dos casos tiveram marcação MODERADA (38,5%) e  
 2 FORTE (40,4%). No grupo de tumores *PNM* a maioria dos tumores foi FORTE (43,0%) e  
 3 MODERADO (35,5%), já no grupo de tumores *PM* a maioria foi MODERADO (56,2%) e  
 4 FORTE (25,0%). Para cada subtipo histológico, o *APBG<sub>pnm</sub>* teve a maior quantidade de  
 5 MODERADO (53,0%) e o *APBG<sub>pm</sub>* 50,0% foram MODERADO e 50,0% FORTE. Nos  
 6 *CME<sub>pnm</sub>* e *CME<sub>pm</sub>* a maioria foi MODERADO (40,5% e 66,7%, respectivamente). Para  
 7 o *CAC<sub>pnm</sub>* foi observada a maior expressão de FORTE (56,4%) e no *CAC<sub>pm</sub>* uma maioria  
 8 de MODERADA (54,4%).

9 **TABELA 8 - Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares, benignas e malignas**  
 10 **(primários não metastatizantes e primários metastatizantes), ensaiadas segundo a presença de**  
 11 **reatividade para VEGF.**

Neoplasias <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	VEGF		
		FRACA (N/%)	MODERADA (N/%)	FORTE (N/%)
AP	30	21 (70,0)	9 (30,0)	0 (0)
<i>Pmalig</i>	109	23 (21,1)	42 (38,5)	44 (40,4)
<i>PNM</i>	93	20 (21,5)	33 (35,5)	40 (43,0)
<i>PM</i>	16	3 (18,8)	9 (56,2)	4 (25,0)
<i>APBG<sub>pnm</sub></i>	17	3 (17,6)	9 (53,0)	5 (29,4)
<i>APBG<sub>pm</sub></i>	2	0 (0)	1 (50,0)	1 (50,0)
<i>CME<sub>pnm</sub></i>	37	9 (24,3)	15 (40,5)	13 (35,2)
<i>CME<sub>pm</sub></i>	3	0 (0,0)	2 (66,7)	1 (33,3)
<i>CAC<sub>pnm</sub></i>	39	8 (20,5)	9 (23,0)	22 (56,4)
<i>CAC<sub>pm</sub></i>	11	3 (27,3)	6 (54,5)	2 (18,2)

12 **1 - AP** – adenoma pleomórfico; **APBG** – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; **CME** – carcinoma  
 13 mucoepidermóide; **CAC** – carcinoma adenóide cístico, **pnm** – primário não metastatizantes, **pm** – primário  
 14 metastatizante, **Pmalig** – primários malignos, n- número e %-porcentagem.

15 2 – número

16  
 17 A expressão de PDEGF no grupo de lesões benignas (AP) foi sempre FRACA  
 18 (100,0%). No grupo *Pmalig* a maioria dos casos tiveram marcação FRACA (74,3%). No  
 19 grupo de tumores *PNM* a maioria dos tumores também foi FRACA (72,0%), sendo  
 20 observados maior número de FORTE (16,2%) que no grupo de tumores *PM*  
 21 (FORTE,12,5%), nesses a maioria foi FRACA (87,5%). Para cada subtipo histológico, o

1 APBG $_{pnm}$  teve a maior quantidade de FRACA (82,3%) e o APBG $_{pm}$  todos foram  
 2 FRACA (100,0%). Nos CME $_{pnm}$  a maioria foi FRACA (46,0%) e MODERADA (16,2%),  
 3 já no CME $_{pm}$  a maioria foi FORTE (66,7%). Para o CAC $_{pnm}$  foi observada a maior  
 4 expressão de FRACA (92,3%) e no CAC $_{pm}$  todos os casos foram FRACA (100,0%).

5

6 **TABELA 9 - Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares, benignas e malignas**  
 7 **(primários não metastatizantes, primários metastatizantes), ensaiadas segundo a presença de**  
 8 **reatividade para PDEGF.**

Neoplasias <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	PDEGF		
		FRACA (N/%)	MODERADA (N/%)	FORTE (N/%)
AP	30	30 (100,0)	0 (0)	0(0)
<i>Pmalig</i>	109	81 (74,3)	11 (10,0)	17 (15,7)
<i>PNM</i>	93	67 (72,0)	11 (11,8)	15 (16,2)
<i>PM</i>	16	14 (87,5)	0 (0)	2 (12,5)
APBG $_{pnm}$	17	14 (82,3)	3 (17,7)	0 (0)
APBG $_{pm}$	2	2 (100,0)	0 (0)	0 (0)
CME $_{pnm}$	37	17 (46,0)	6 (16,2)	4 (10,8)
CME $_{pm}$	3	1 (33,3)	0 (0)	2 (66,7)
CAC $_{pnm}$	39	36 (92,3)	2 (5,2)	1 (2,5)
CAC $_{pm}$	11	11 (100,0)	0	0

9 **1 - AP** – adenoma pleomórfico; **APBG** – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; **CME** – carcinoma  
 10 mucoepidermóide; **CAC** – carcinoma adenóide cístico, ***pnm*** – primário não metastatizantes, ***pm*** – primário  
 11 metastatizante, ***Pmalig*** – primários malignos, n- número e %-porcentagem.  
 12 **2** – número

13

14

#### 5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

15

##### CD34

16

17

18

19

20

21

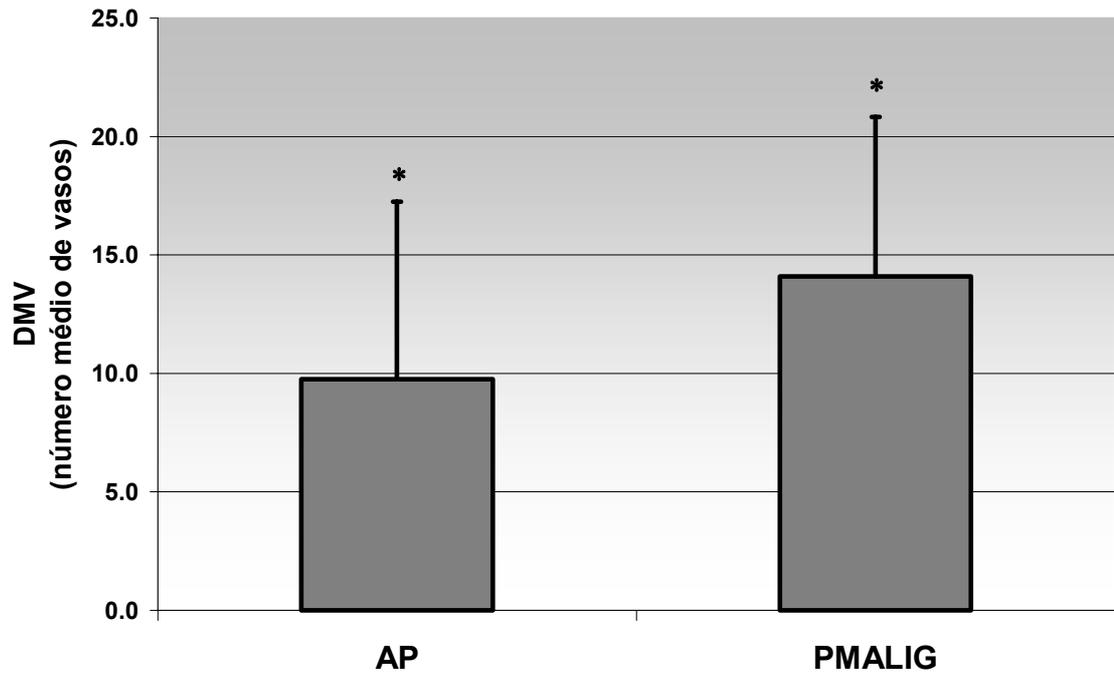
22

Observou-se que o índice médio de marcação de CD34 foi maior no grupo *Pmalig* que em AP, conforme mostrado na FIGURA 12, e que essa diferença se mostrou estatisticamente significativa ( $p = 0,003$ ). Por outro lado, a DMV foi significativamente maior nos CME do que em APBG ou em CAC ( $p < 0,0001$ ), mas não entre esses dois últimos grupos de lesões primárias, como apresentado na FIGURA 13.

Por meio da quantificação de CD34 pode-se também observar que a DMV das lesões malignas *PNM* foi um pouco superior que a das neoplasias malignas *PM*; entretanto,

1 essa diferença não foi significativa. Ainda, quando analisadas por subtipos histológicos  
2 isoladamente (CME, APBG e CAC), não se verificou diferença na expressão de CD34  
3 entre os grupos de comportamento metastáticos diferentes (*pnm* ou *pm*).

4



5

6

7 **FIGURA 12 - Comparação da expressão de CD34 entre o grupo de tumores benignos (AP) e os**  
8 **tumores *Pmalig* (APBG, CME e CAC).**

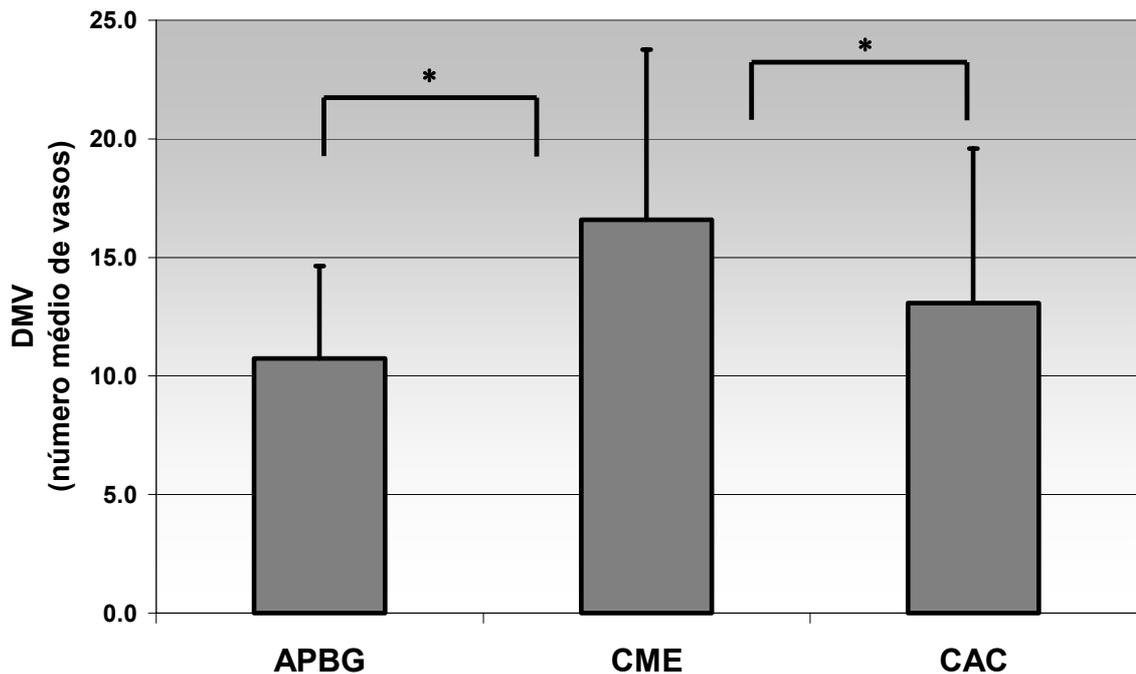
9

1- Teste *t* de Student,  $p = 0,003$

10

2- AP- Adenoma Pleomórfico, *Pmalig*- grupo de tumores primários malignos

11



1  
2 **FIGURA 13- Comparação da expressão de CD34 entre os tipos histológicos das neoplasias malignas**  
3 **primárias entre si (APBG, CME e CAC).**

4 1- \*Teste ANOVA, com pós-teste de Tuckey,  $p < 0,0001$

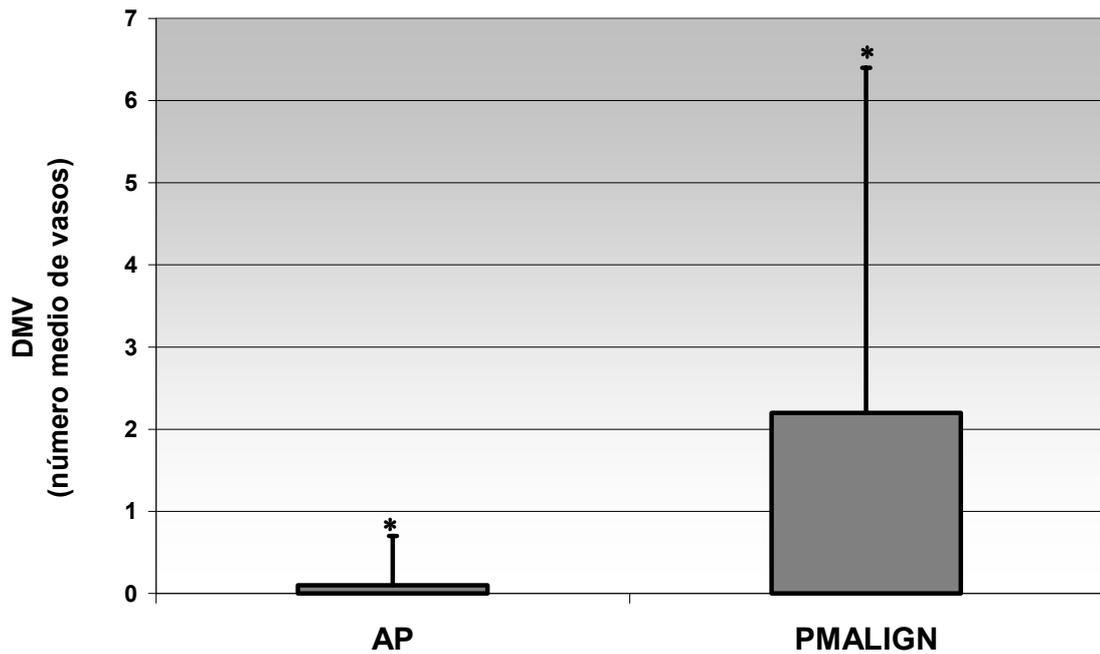
5 2- APBG- Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade, CME- Carcinoma  
6 Mucoepidermóide, CAC- Carcinoma Adenóide Cístico.

## 8 CD105

9 O índice médio de marcação para CD105 foi maior no grupo *Pmalig* que em AP,  
10 conforme mostrado na FIGURA 14, e que essa diferença se mostrou estatisticamente  
11 significativa ( $p = 0,003$ ). Por outro lado, a DMV foi significativamente maior nos CME do  
12 que em APBG ou em CAC ( $p < 0,0001$ ), mas não entre esses dois últimos grupos de lesões  
13 primárias, como apresentado na FIGURA 15.

14 Segundo a identificação da expressão de CD105, a DMV das lesões *PNM* foi um  
15 pouco maior que a das neoplasias *PM*; entretanto, essa diferença não foi significativa,  
16 estatisticamente. Ainda, quando analisadas isoladamente, não se verificou diferença na  
17 expressão de CD105 entre os grupos de comportamento metastático diferente (*PNM* ou  
18 *PM*) para cada tipo histológico das lesões malignas (APBG, CME, CAC).

19



1

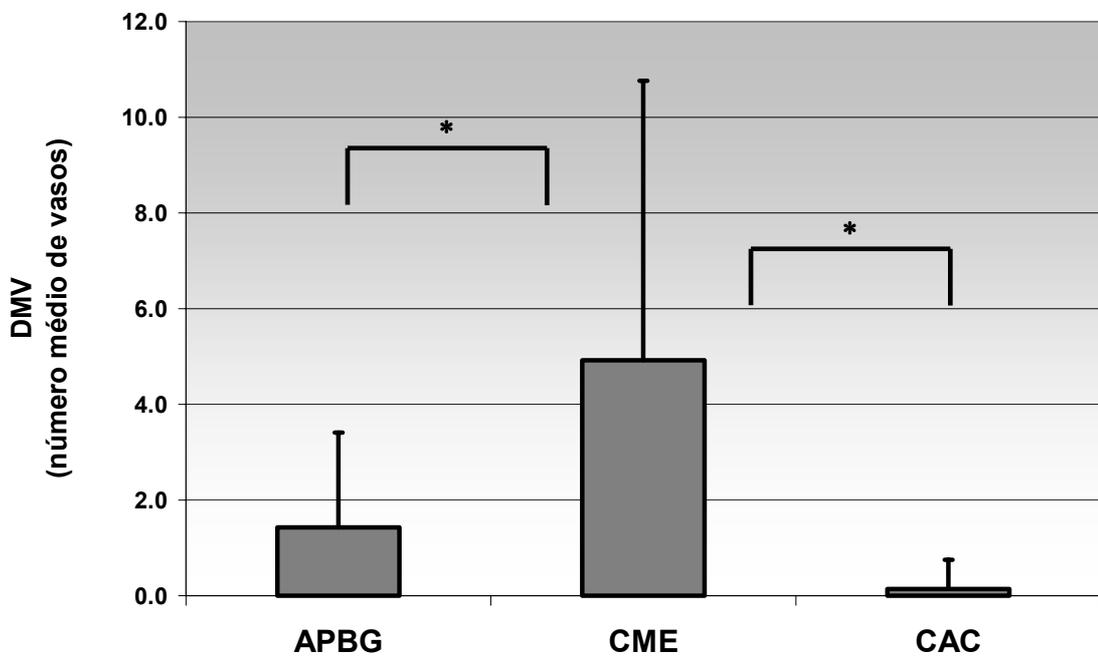
2 **FIGURA 14- Comparação da expressão de CD105 entre o grupo de tumor benigno (AP) e os tumores**  
 3 ***Pmalig* (APBG, CME e CAC).**

4 1- \* Teste U de Mann-Whitney,  $p = 0,003$

5 2- AP- Adenoma Pleomórfico, *Pmalig*-grupo de neoplásias primárias malignas

6

7



8

9 **FIGURA 15- Comparação da expressão de CD105 entre os tipos histológicos das neoplasias malignas**  
 10 **primárias entre si (APBG, CME e CAC).**

11 1- \*Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn,  $p < 0,0001$

12 2- APBG- Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade, CME- Carcinoma  
 13 Mucoepidermóide, CAC- Carcinoma Adenóide Cístico.

## 1 VEGF

2 A análise estatística para verificação de associação entre a expressão de VEGF e  
3 metástases foi realizada com base na estratificação das amostras em duas categorias: um  
4 grupo com as freqüências de marcação FRACA (soma final dos escores intensidade e  
5 freqüência igual a 1 ou 2), e outro com freqüências correspondentes a marcação FORTE  
6 (escore final entre 3 e 6) entre os diversos grupos de interesse.

7 Assim, observou-se significativa associação de FORTE marcação com o grupo dos  
8 tumores *Pmalig* (Teste do Qui-quadrado,  $p < 0,0001$ ) (TABELA 10). Por outro lado, não  
9 se identificou nenhuma associação significativa entre o subtipo histológico das lesões  
10 malignas primárias com a marcação do VEGF.

11 Da mesma forma, não foi identificada nenhuma associação significativa entre a  
12 presença de metástases e a marcação de VEGF para as lesões malignas metastatizantes,  
13 quer seja como grupo (*PM*) ou como quando analisadas isoladamente (*pm*) a partir dos  
14 subtipos histológicos (APBG, CAC e CME).

15

16 **TABELA 10 – Associação da expressão de VEGF nos AP e no grupo de neoplasias *Pmalig*<sup>1</sup>.**

Neoplasias	FRACA (n/%)	FORTE (n/%)
AP	21 (70,0)	9 (30,0)
<i>Pmalig</i>	23 (21,1)	86 (78,9) <sup>2</sup>

17 1. *Pmalig*- Neoplasias malignas primárias, AP- Adenoma Pleomórfico, n- número e %-porcentagem.

18 2. Teste de Qui-quadrado ( $p < 0,0001$ )

19

## 20 PDEGF

21 Houve diferença significativa entre os grupos de AP e *Pmalig*, com uma associação  
22 significativa de marcação FORTE com as neoplasias primárias malignas (Teste exato de  
23 Fisher,  $p = 0,0006$ ) (TABELA 11). Por outro lado, a ocorrência de marcação de FORTE

1 intensidade foi significativamente maior nos CME do que em APBG ou em CAC ( $p <$   
2 0,01), não havendo diferença significativa para essas duas últimas lesões (TABELA 12).

3 Da mesma forma, não foi identificada nenhuma associação significativa entre a  
4 ocorrência (*PM*) ou não (*PNM*) de metástase e a frequência de marcação do PDEGF.  
5 Ainda, quando analisadas isoladamente, não se verificou associação na frequência de  
6 marcação FRACA ou FORTE de PDEGF entre os grupos de comportamento metastático  
7 diferente (*pnm* e *pm*) para cada tipo histológico das lesões malignas (APBG, CME, CAC).

8

9 **TABELA 11 – Associação da expressão de PDEGF nos AP e no grupo de neoplasias *Pmalig*<sup>1</sup>.**

Neoplasias	FRACA (n/%)	FORTE (n/%)
AP	30 (100,0)	0 (0)
<i>Pmalig</i>	81 (74,3)	28 (25,7) <sup>2</sup>

10 1. *Pmalig*- Neoplasias malignas primárias, AP- Adenoma Pleomórfico, n- número e %-porcentagem.11 2. Teste exato de Fisher,  $p=0,0006$ 

12

13

14

15 **TABELA 12 – Associação da expressão de PDEGF entre APBG, CME e CAC<sup>1</sup>.**

Neoplasias	FRACA (n/%)	FORTE (n/%)
APBG	16 (84,2)	3 (15,8)
CME	18 (45,0)	22 (55,0)
CAC	47 (94,0)	3 (6,0)

16 1. APBG- Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade, CME- Carcinoma Mucoepidermóide,  
17 CAC- Carcinoma Adenóide Cístico, n- número e %-porcentagem.18 2- Teste Exato de Fisher ( $p < 0,01$ )

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

Na análise de sobrevida, a mediana de marcação para CD34 e CD105 dos AP foi estabelecida como *cut-off*, sendo negativo abaixo desse valor e positivo acima. A mediana de marcação do AP para CD 34 foi de 8,25; e para CD105, 0,1. A distribuição dos casos positivos e negativos para imunomarcção de CD34 e CD105, utilizando o *cut-off* está na TABELA 13. Os dados correlacionados com a sobrevida estão nas TABELAS 14 a 16 e nas FIGURAS 16 a 21.

1 TABELA 13 - Distribuição dos casos de neoplasias de glândulas salivares, benignas e malignas  
 2 (primários não metastatizantes, primários metastatizantes e lesão metastática), ensaiadas segundo a  
 3 presença de reatividade para CD34 e CD105. (*cut-off foi a mediana de marcação no AP, md= 8,25 para*  
 4 *CD34 e md=0,1 para CD105).*

Neoplasias <sup>1</sup>	(n) <sup>2</sup>	CD34	CD105
		Positivo (n/%)	Positivo (n/%)
AP	30	15 (50,0)	2 (6,6)
<i>Pmalig</i>	109	91 (83,5)	42 (38,5)
<i>PNM</i>	93	79 (85,0)	36 (38,7)
<i>PM</i>	16	12 (75,0)	6 (37,5)
<i>APBGpnm</i>	17	14 (82,3)	8 (47,0)
<i>APBGpm</i>	2	1 (50,0)	0 (0)
<i>CMEpnm</i>	37	32 (86,5)	28 (75,7)
<i>CMEpm</i>	3	3 (100,0)	3 (100,0)
<i>CACpnm</i>	39	31 (79,5)	0 (0)
<i>CACpm</i>	11	8 (72,8)	3 (27,2)

5 1 - AP – adenoma pleomórfico; APBG – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CME – carcinoma  
 6 mucoepidermóide; CAC – carcinoma adenóide cístico, *pnm* – primário não metastatizantes, *pm* – primário  
 7 metastatizante.

8 2 - número

9

10

11

12

TABELA 14 – Avaliação do impacto prognóstico de características clínico-patológicas de neoplasias malignas de glândulas salivares.

VARIÁVEL	CATEGORIAS	RDE*	p
TNM (estadiamento clínico)	1+2	0,000	0,000*
	3	0,004	
	4	0,010	
TAMANHO	até 2cm	0,000	0,000*
	> 2cm, até 4cm	0,000	
	> 4cm	0,010	
DIAGNÓSTICO	APBG	0,003	0,40
	CME	0,001	
	CAC	0,003	
COMPORTAMENTO	<i>PNM</i>	0,001	0,000*
	<i>PM</i>	0,011	
RECIDIVA	NÃO	0,002	0,41
	SIM	0,005	
SÍTIO	Glândulas maiores	0,003	0,89
	Glândulas menores	0,002	
CAC GRAU HISTOLÓGICO	TUBULAR	0,001	0,01*
	CRIBRIFORME	0,003	
	SÓLIDO	0,009	
CME GRAU HISTOLÓGICO	BAIXO	0,001	0,63
	INTERMEDIÁRIO	0,000	
	ALTO	0,002	

13

14

1. \* Teste de Breslow ou Log-Rank p<0,05.

2. md- mediana, *PM*- primários metastatizantes, *PNM*- primários não metastatizantes.

1 **TABELA 15 – Avaliação do impacto prognóstico de marcadores angiogênicos neoplasias malignas de**  
 2 **glândulas salivares.**

VEGF	1	0,002	0,85
	2+3	0,002	
PDEGF	1	0,002	0,79
	2+3	0,002	
PDEGF-N	0 (< 10%)	0,002	0,54
	1 (> 10%)	0,001	
CD105	< ou = AP (0.1)	0,003	0,48
	> AP	0,002	
CD34	< ou = AP (8,3)	0,006	0,02*
	> AP	0,001	

3 1- \* Teste de Breslow ou Log-Rank  $p < 0,05$ .

4 2- md- mediana, *PM*- primários metastatizantes, *PNM*- primários não metastatizantes.

5  
6  
7  
8  
9  
10

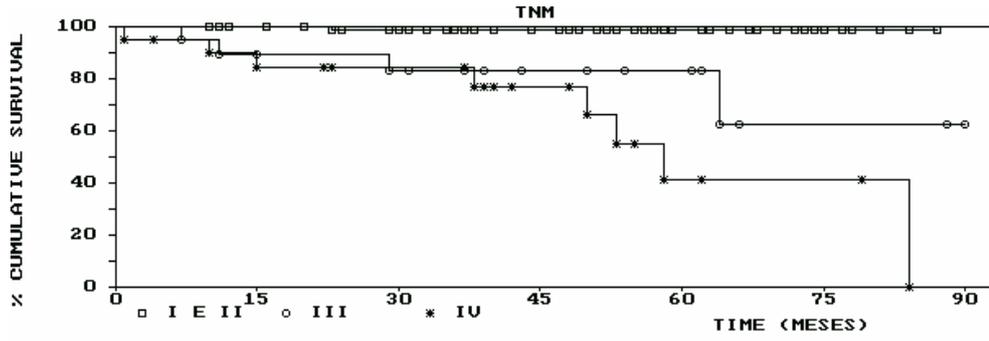
**TABELA 16 – Avaliação do impacto prognóstico de marcadores angiogênicos nos subtipos histológicos das neoplasias malignas de glândulas salivares.**

APBG CD34	< ou = md AP (8,3)	0,006	0,52
	> md AP	0,003	
APBG CD105	< OU = md AP (0.1)	0,005	0,53
	> md AP	0,003	
APBG PDEGF	1	0,002	0,29
	2+3	0,008	
APBG VEGF	1	0,000	0,31
	2+3	0,004	
CME CD34	< ou = md AP (8,3)	0,005	0,14
	> md AP	0,001	
CME CD105	< ou = md AP (0.1)	0,002	0,65
	> md AP	0,001	
CME PDEGF	1	0,002	0,44
	2+3	0,000	
CME VEGF	1	0,002	0,71
	2+3	0,001	
CAC CD34	< ou = md AP (8,3)	0,007	0,05*
	> md AP	0,002	
CAC CD105	< ou = md AP (0.1)	0,003	0,32
	> md AP	0,009	
CAC PDEGF	1	0,003	0,40
	2+3	0,007	
CAC VEGF	1	0,004	0,73
	2+3	0,003	

11 1- \* Teste de Breslow ou Log-Rank  $p < 0,05$ .

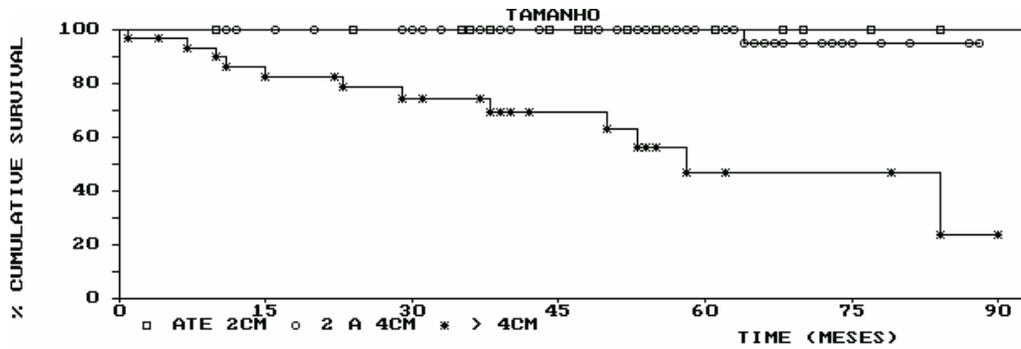
12 2- APBG- Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau, CME- Carcinoma Mucoepidermóide, CAC-  
 13 Carcinoma Adenóide Cístico.

14 3- md- mediana, *PM*- primários metastatizantes, *PNM*- primários não metastatizantes.



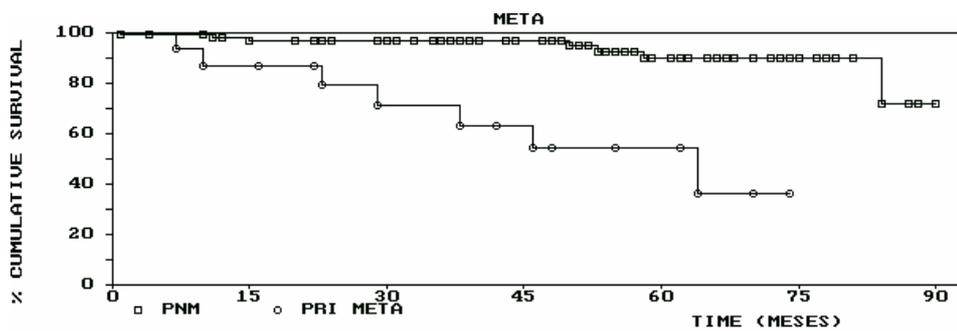
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7

FIGURA 16 - Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo estadiamento clínico pelo sistema TNM ( $p < 0,0001$ ).



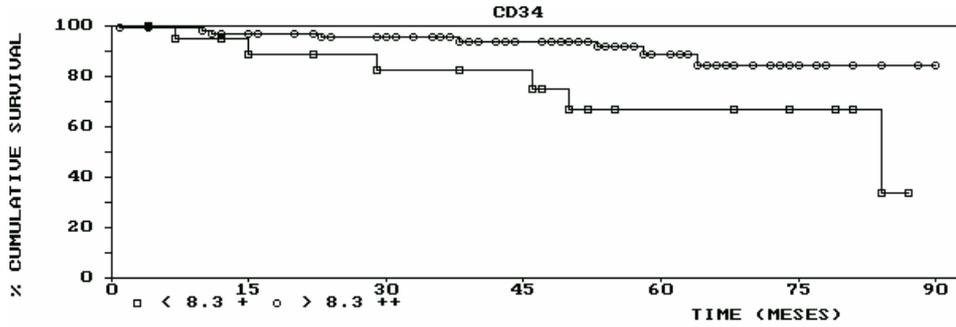
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

FIGURA 17 - Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo o tamanho da lesão ( $p < 0,0001$ ).



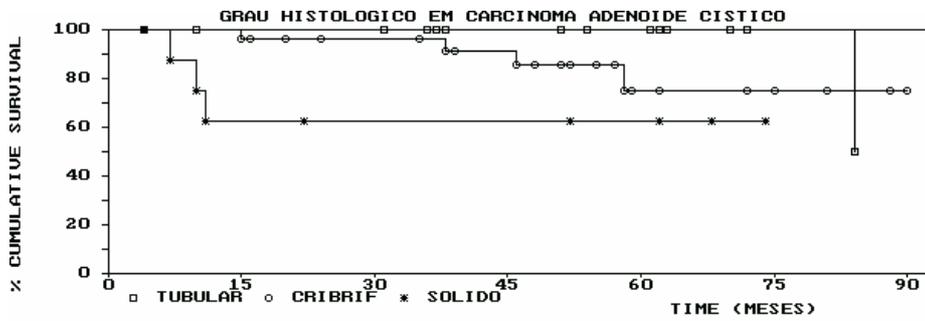
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

FIGURA 18- Curva Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo a presença (PM) ou ausência (PNM) de metástases ( $p < 0,0001$ ).



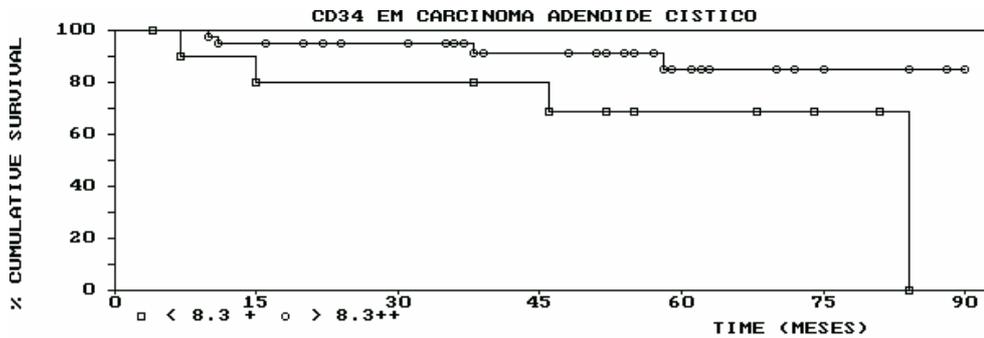
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9

FIGURA 19- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo a imunomarcção de CD34 ( $p=0,02$ ).



10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

FIGURA 20- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes estudados, segundo o grau histológico (tubular, cribriforme e sólido) ( $p=0,01$ ).



18  
19  
20  
21  
22  
23

FIGURA 21- Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes com CAC, segundo a imunomarcção de CD34 ( $p=0,05$ ).

1           Tendo em vista que os parâmetros “estadiamento clínico”, tamanho, ocorrência de  
2 metástases e imunomarcção do antígeno CD34 foram capazes de diferenciar os casos na  
3 análise univariada, os mesmos foram então avaliados quanto à sua utilidade em um modelo  
4 multivariado. Após a realização da rotina estatística de razão proporcional (modelo de  
5 Cox), utilizando-se do programa CoxSurv, obteve-se um modelo em que as variáveis  
6 tamanho e ocorrência de metástases mostraram valor independente na previsão da  
7 sobrevida ( $p < 0,001$ ), enquanto que o estadiamento clínico e a expressão de CD34 não se  
8 mostraram úteis.

9           Os resultados obtidos na análise de correlação utilizando o teste de Correlação de  
10 Rank de Spearman, entre a expressão de CD34, CD105, VEGF e PDEGF, estão expressos  
11 na TABELA 15. Foi encontrada uma correlação positiva da expressão de VEGF e CD34  
12 apenas para o *CAC<sub>pm</sub>*. Uma correlação positiva também foi verificada entre PDEGF e  
13 CD34 no grupo de *PNM*; e entre PDEGF e CD105 nos grupos *PNM* e *PM*, e para o  
14 *CME<sub>pnm</sub>* e *CME<sub>pm</sub>*. Além disso, uma correlação positiva também foi observada entre  
15 CD34 e CD105 para o *CME<sub>pnm</sub>*.

1 **TABELA 17- Correlação entre a expressão de CD34, CD105, VEGF e PDEGF nos diferentes grupos**  
 2 **de neoplasias.**

Neoplasias	VEGF x PDEGF	VEGF x CD34	VEGF x CD105	PDEGF x CD34	PDEGF x CD105	CD34 x CD105
AP	NA	$p = 0,24$ $rs = 0,22$	$p = 0,15$ $rs = 0,26$	NA	NA	$p = 0,10$ $rs = 0,30$
<i>Pmalig</i>	$p = 0,59$ $rs = 0,05$	$p = 0,31$ $rs = 0,09$	$p = 0,44$ $rs = -0,07$	$p = 0,61$ $rs = -0,04$	$p = 0,29$ $rs = 0,10$	$p = 0,07$ $rs = 0,17$
<i>PNM</i>	$p = 0,56$ $rs = -0,05$	$p = 0,27$ $rs = 0,11$	$p = 0,36$ $rs = -0,09$	$p = 0,04^*$ $rs = 0,20$	$p = 0,002^*$ $rs = 0,30$	$p = 0,06$ $rs = 0,19$
<i>PM</i>	$p = 0,34$ $rs = 0,25$	$p = 0,06$ $rs = 0,47$	$p = 0,46$ $rs = -0,19$	$p = 0,76$ $rs = 0,08$	$p = 0,01^*$ $rs = 0,61$	$p = 0,82$ $rs = 0,05$
<i>APBG<sub>pn</sub>m</i>	$p = 0,59$ $rs = 0,13$	$p = 0,28$ $rs = 0,27$	$p = 0,63$ $rs = 0,12$	$p = 0,54$ $rs = -0,15$	$p = 0,35$ $rs = 0,23$	$p = 0,38$ $rs = 0,22$
<i>APBG<sub>p</sub>m</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>CME<sub>pn</sub>m</i>	$p = 0,98$ $rs = 0,00$	$p = 0,23$ $rs = 0,20$	$p = 0,17$ $rs = 0,22$	$p = 0,93$ $rs = 0,01$	$p = 0,03^*$ $rs = 0,33$	$p = 0,007^*$ $rs = 0,43$
<i>CME<sub>p</sub>m</i>	$p = 0,66$ $rs = 0,50$	$p = 0,33$ $rs = -0,86$	$p = 0,33$ $rs = -0,86$	$p = 0,33$ $rs = -0,86$	$p = 0,000^*$ $rs = 0,000$	$p = 0,66$ $rs = 0,50$
<i>CAC<sub>pn</sub>m</i>	$p = 0,50$ $rs = 0,08$	$p = 0,84$ $rs = 0,03$	$p = 0,40$ $rs = 0,13$	$p = 0,75$ $rs = -0,05$	$p = 0,77$ $rs = -0,04$	$p = 0,82$ $rs = -0,03$
<i>CAC<sub>p</sub>m</i>	NA	$p = 0,03^*$ $rs = 0,64$	$p = 0,06$ $rs = -0,58$	NA	NA	$p = 0,31$ $rs = -0,33$

3 1- \* teste de Correlação de Rank de Spearman,  $p < 0,05$

4 2- **AP** – adenoma pleomórfico; **APBG** – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; **CME** – carcinoma  
 5 mucoepidermóide; **CAC** – carcinoma adenóide cístico, *Pmalig*- grupo de tumores malignos; *PM*- grupo  
 6 de tumores primário metastatizante; *PNM*- grupo de tumores primário não metastatizantes; *pnm* –  
 7 primário não metastatizantes, *pm* – primário metastatizante.

8

9

10

11

12

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

**DISCUSSÃO**



1

## 2           **7- DISCUSSÃO**

3           No presente trabalho, procurou-se avaliar a expressão de VEGF e PDEGF e dos  
4           marcadores endoteliais vasculares CD34 e CD105 em neoplasias malignas epiteliais de  
5           glândulas salivares, considerando sua aplicabilidade na predição do potencial metastático  
6           das lesões malignas glandulares. A partir dos nossos resultados, foi possível observar uma  
7           associação entre a natureza do tumor e a maior expressão dos fatores angiogênicos  
8           estudados, ocorrendo maior expressão nas lesões malignas, comparativamente às benignas.  
9           Todavia, não conseguimos observar uma associação entre o aumento dos fatores de  
10          angiogênicos e a agressividade dos tumores malignos, representada pelo seu maior  
11          potencial metastático, desde que nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a  
12          expressão destes fatores entre os grupos *PM* e *PNM*. Por outro lado, foi possível evidenciar  
13          que na análise univariada, a angiogênese, dada pela expressão de CD34 (mas não de  
14          CD105, VEGF e PDEGF), mostrou-se associado com pior prognóstico. Este fato não se  
15          repetiu em uma análise multivariada. Desta forma, nossos achados não evidenciaram  
16          associação entre angiogênese tumoral e metástases ou prognóstico das lesões.

17          Cabe, então, fazer a apreciação de alguns tópicos relacionados ao desenho e  
18          aspectos metodológicos do estudo que, a nosso ver, poderão auxiliar na visibilidade e na  
19          interpretação dos resultados.

20          Para este trabalho, foi selecionada uma amostra constituída por tumores benignos e  
21          malignos. No primeiro grupo, escolheu-se o Adenoma Pleomórfico (AP), que é a lesão  
22          benigna de glândula salivar mais comum (BARNES et al., 2005). No segundo grupo,  
23          foram selecionados três tipos de lesões malignas em que a metástase aparece como um  
24          evento provável. Deste fizeram parte o Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de  
25          Malignidade (APBG), o Carcinoma Mucoepidermóide (CME) e o Carcinoma Adenóide

1 Cístico (CAC) (EVANS & LUNA, 2000; BRADLEY, 2001; BARNES et al., 2005;  
2 POGODZINSKY et al., 2006). A partir daí, foram obtidas amostras de tumores primários  
3 não metastatizantes (*pnm*) e primários metastatizantes (*pm*).

4 Com este desenho, procuramos atender a possibilidade de avaliar tumores para os  
5 quais o evento de metástases é conceitualmente ausente, ou pelo menos improvável, os  
6 quais foram representados pelo AP. Por outro lado, para compor o grupo de lesões  
7 malignas, em que as metástases surgem como eventos possíveis e prováveis, escolhemos o  
8 APBG, onde o evento tem sido descrito com menor frequência. E, para aquelas lesões onde  
9 as metástases são mais frequentes, selecionamos o CAC e o CME, especialmente porque se  
10 constituem nas neoplasias malignas mais comuns desta localização. Aqui, vale ressaltar  
11 que há lesões mais agressivas em glândulas salivares tais como o carcinoma do ducto  
12 salivar, carcinossarcoma, carcinoma ex-adenoma pleomórfico e adenocarcinoma NOS, por  
13 exemplo. Não obstante, não foi possível recuperar um número suficiente de tumores  
14 representativo para o trabalho. Especialmente ao que tange a não inclusão dos  
15 adenocarcinomas NOS no estudo, entendemos que se trata de um grupo heterogêneo e mal  
16 definido do ponto de vista morfológico que também não apresenta ainda um padrão de  
17 comportamento conhecido.

18 As neoplasias de glândulas salivares correspondem a aproximadamente 3% das  
19 neoplasias que acometem a região de cabeça e pescoço (ELLIS et al., 1991; BARNES et  
20 al., 2005). Por serem tumores incomuns, foram observadas dificuldades na seleção e  
21 aproveitamento de casos para a composição de uma amostra numericamente  
22 representativa. Além disto, consideramos necessário, especialmente para os casos de  
23 neoplasias malignas, não considerar para o estudo tumores recidivantes e que tenham  
24 recebido terapia prévia, incluindo radio e/ou quimioterapia. Assim, todos os tumores foram

1 primários, o que favoreceu uma redução significativa dos casos disponíveis para estudo, o  
2 que pode ser revisto no ANEXO 1.

3 Para os Adenomas Pleomórficos (AP), observou-se uma idade média de 48 anos,  
4 com predileção pelo sexo feminino (EVESON & CAWSON, 1985; ITO et al., 2005;  
5 KALLUF, 2006). A parótida foi o sítio de acometimento mais freqüente, assim como  
6 observados por outros autores (AUCLAIR & ELLIS, 1991; LOYOLA et al., 1995;  
7 BARNES et al., 2005). Todos os casos foram tratados com enucleação cirúrgica  
8 (MERCANTE et al., 2002; ITO et al., 2005). Nenhum caso de recorrência foi identificado,  
9 e todos os pacientes estavam vivos sem doença dentro do período de seguimento  
10 registrado. O tempo de acompanhamento foi em média de 10 meses, com um tempo  
11 máximo de 62 meses. O período de acompanhamento para o AP, apesar de curto, está  
12 dentro daquele considerado no protocolo de condutas do Instituto Nacional do Câncer  
13 (INCA) que orienta um seguimento de 12 meses para os pacientes com neoplasias  
14 benignas. Após este período, estando os pacientes bem, recebem alta.

15 Em relação ao APBG, a idade média foi de 60,5 anos, prevalecendo o sexo  
16 feminino (VINCENT et al., 1994; KALLUF, 2006). A maioria dos casos não  
17 metastatizantes ocorreram no palato, conforme descrito na literatura (EVANS &  
18 BATSAKIS, 1984; KELCH et al., 1997; BARNES et al., 2005), os dois casos primários  
19 metastatizantes ocorreram no lábio inferior e base de língua. Dezoito casos foram tratados  
20 por excisão cirúrgica, e nesses, 13 receberam radioterapia posterior. Em um caso foi  
21 realizada apenas biópsia incisional seguida por radioterapia paliativa devido à extensão do  
22 tumor no momento do diagnóstico. A taxa de recorrência foi de 5%, e um caso  
23 desenvolveu metástases regionais e à distância (5,0%) e outro apenas metástases à  
24 distância (5,0%). Estas freqüências de recidiva e metástases encontram-se dentro daquelas  
25 encontradas na literatura, cujos valores situam-se entre 0,1% e 57,5% (EVANS & LUNA,

1 2000; POGODZINSKY et al., 2006). Esses casos metastáticos evoluíram para óbito  
2 relacionado ao câncer.

3 Para o grupo dos CME, observou-se uma idade média de 39,8 anos, mais comum  
4 no sexo feminino (BARNES et al., 2005). A parótida foi o sítio de acometimento mais  
5 freqüente, assim como observados por outros autores (AUCLAIR & ELLIS, 1991;  
6 LOYOLA et al., 1995; BRANDWEIN et al., 2001). O tratamento de escolha foi a  
7 ressecção cirúrgica ampla, e para alguns casos, seguida do esvaziamento cervical e  
8 radioterapia pós-operatória (ELLIS & AUCLAIR, 1996; BRANDWEIN et al., 2001). Os  
9 resultados mostraram que, à semelhança dos achados da literatura (NASCIMENTO et al.,  
10 1986a; BRANDWEIN et al., 2001; GUZZO et al., 2002; BARNES et al., 2005), a maioria  
11 dos tumores primários não metastatizantes foi classificada como de baixo grau de  
12 malignidade. Em contrapartida, a maioria dos CME<sub>pm</sub> foram classificados como de alto  
13 grau de malignidade. Não foi observada recidiva local. A ocorrência de metástases foi  
14 observada em dois casos para linfonodo (5,0%); e em um acometeu linfonodo e pulmão  
15 (2,5%) (NASCIMENTO et al., 1986a; BRANDWEIN et al., 2001 e PIRES et al., 2002).

16 A predileção para o sexo também foi encontrada para o grupo dos CAC. A média  
17 de idade dos pacientes foi de 51,4 anos, dados esses semelhantes aos descritos por Spiro &  
18 Huvos (1992) e Ellis & Auclair (1996). Os locais mais acometidos foram glândulas  
19 submandibulares e palato (NASCIMENTO et al., 1986b; SPIRO & HUVOS, 1992; ELLIS  
20 & AUCLAIR, 1996). O tratamento de escolha foi ressecção local ampla e, em alguns  
21 casos, seguida de esvaziamento cervical e radioterapia pós-operatória. A recidiva local foi  
22 observada em 41,7% dos CAC<sub>pm</sub> e em 14,3% dos CAC primários não metastatizantes;  
23 dados semelhantes aos observados por Witten et al. (1990) e Spiro & Huvos (1992). A  
24 ocorrência de metástases regionais, à distância e ambas foi de 4,0%, 6,0% e 12,0% dos  
25 casos, respectivamente (SPIRO & HUVOS, 1992; HAUNG et al., 1997).

1            Desta forma, foi possível observar que a amostra resultante apresentou  
2 características sócio-demográficas e clínico-patológicas semelhantes àquelas já descritas na  
3 literatura.

4            Vários fatores prognósticos tumorais já têm sido identificados para as neoplasias  
5 malignas, independentemente de sua histogênese, a saber: subtipo histológico, tamanho e  
6 extensão topográfica do tumor, e status do linfonodo no tempo do diagnóstico e a presença  
7 de metástases à distância.

8            Entre estes, a ocorrência de metástases tem sido relatada como principal causa de  
9 morte em pacientes com tumores malignos (ELLIS & FIDLER, 1996). Assim, tem sido  
10 considerado na literatura como altamente desejável a identificação de marcadores  
11 específicos previamente ao tratamento, genéticos ou não, preditivos de agressividade  
12 tumoral, neste caso, de metástases. Esta identificação favoreceria precocemente a  
13 percepção deste comportamento e, conseqüentemente, maior pertinência na formulação do  
14 tratamento e do prognóstico.

15            Neste sentido, muita atenção tem sido dada à compreensão do processo metastático  
16 para, a partir daí, analisar os diferentes fatores potencialmente envolvidos no processo que  
17 sejam também identificáveis e aplicáveis na predição de comportamento tumoral.

18            É classicamente conhecido que o processo de metástases consiste em um processo  
19 múltiplo, complexo, interativo e interdependente. Para tanto, as células tumorais destacam-  
20 se uma das outras devido a redução da sua adesividade; a seguir as células apresentam  
21 potencial de invadir tanto a matriz extracelular quanto a circulação. Após a invasão  
22 vascular as células precisam sobreviver ao sistema de defesa imune e novamente atravessar  
23 o endotélio e assim atingir o parênquima de algum órgão, e neste responder a fatores de  
24 crescimento e induzir proliferação e angiogênese (RUBBIN, 2007).

1            Desta forma, os antígenos envolvidos direta ou indiretamente no processo de  
2 angiogênese tumoral, constituem-se em um grupo alvo para estudo.

3            Dentre estes marcadores encontram-se as proteínas VEGF e PDEGF e os  
4 marcadores endoteliais vasculares CD34 e CD105. Sua relação com a angiogênese e  
5 progressão tumoral nos tumores sólidos foram revistos na introdução deste trabalho.

6            Foi assim construída uma hipótese a qual considerou que maior angiogênese  
7 tumoral quantificada pela expressão de CD34 e CD105, e maior expressão dos fatores de  
8 crescimento endoteliais tumorais (VEGF e PDEGF), estaria associada à ocorrência de  
9 metástases e, portanto, ao pior prognóstico, de forma independente de outros fatores  
10 clínico-patológicos já descritos anteriormente. Também foi proposto que esta investigação  
11 seria realizada a partir da expressão imuno-histoquímica dos antígenos mencionados. Esta  
12 abordagem foi escolhida tendo em vista que se constitui uma ferramenta amplamente  
13 utilizada nos laboratório de patologia para diagnóstico, em especial na identificação da  
14 histogênese tumoral. Ademais, seu emprego tem sido rotineiro na identificação de  
15 marcadores de agressividade e na melhoria da formulação de prognósticos do câncer de  
16 mama, por exemplo. Para estes casos, o protocolo de formulação do diagnóstico já prevê a  
17 inclusão e quantificação da expressão de marcadores hormonais e de proliferação celular.

18            A imunomarcação de VEGF foi observada no citoplasma das neoplasias epiteliais  
19 de glândulas salivares, no endotélio vascular, músculo estriado, membrana citoplasmática  
20 dos adipócitos, ductos das glândulas mucosas e serosas normais; e macrófagos (LIM et al.,  
21 2003; ZHANG et al., 2005; MAHARAJ et al., 2006).

22            Dados da literatura mostram que a expressão de VEGF nos CAC é  
23 predominantemente forte, com um número menor, mas aproximado, de casos com  
24 expressão moderada (LIM et al., 2003; ZHANG et al., 2005). Para a expressão de VEGF  
25 em CME, a literatura tem mostrado resultados contraditórios. Em um (LIM et al., 2003)

1 predominou fraca expressão; em outro (DOI et al., 1999) foram observados  
2 aproximadamente 70% dos casos com expressão distribuída entre moderada e forte. Este  
3 padrão de expressão também se repetiu para os APBG. Assim, nossos resultados estão  
4 mais próximos dos de DOI et al. (1999), já que observamos mais de 70 % das lesões  
5 malignas expressando VEGF em moderada e forte intensidade. Este padrão de expressão  
6 nas neoplasias malignas é o inverso daquela observada para as benignas. Embora  
7 heterogênea, a expressão de VEGF no AP foi predominantemente FRACA (70,0%).  
8 Todavia, quando observadas, as marcações estavam localizadas em estruturas ductais,  
9 tanto em células luminais quanto em células não luminais, com maior intensidade de  
10 marcação nas luminais. As áreas condróides e mixóides não apresentaram marcação,  
11 achados estes que foram semelhantes aos descritos por SWELAN et al. (2005). Este  
12 quadro pode estar consoante a função de VEGF na manutenção e diferenciação ductal.

13 Quando analisamos a expressão de CD34 e CD105, pudemos perceber que a  
14 angiogênese foi significativamente maior nas lesões malignas de todos os tipos  
15 histológicos, comparativamente às lesões benignas. Estes achados acompanham a  
16 expressão diferenciada de VEGF nas mesmas lesões, embora não pudéssemos observar  
17 uma correlação positiva apenas nos CAC primários metastatizantes. Um achado curioso foi  
18 que a angiogênese foi mais acentuada no CME (CD34 e CD105) que no CAC (DOI et al.,  
19 1999) e no APBG. Todavia, nenhuma diferença foi observada entre os dois últimos.

20 A expressão distinta entre tumores malignos e benignos parece sugerir que VEGF  
21 teria um papel diferenciado na progressão das neoplasias malignas, favorecendo,  
22 provavelmente, por um lado, aumento da sobrevivência celular. A propósito, um aumento  
23 gradativo na expressão de VEGF tem sido relacionado com a progressão da displasia para  
24 carcinoma epidermóide invasivo (TAE et al., 2000; JOHNSTONE & LOGAN, 2007).  
25 Neste sentido, nossos achados são similares, apontando na mesma direção, desde que a

1 expressão nas neoplasias malignas foi maior que nas benignas. Vale salientar que embora  
2 este dado não seja objetivamente comprovador da associação de VEGF com a proliferação  
3 celular, há evidências de que VEGF está diretamente envolvido na indução de bcl-2, cuja  
4 atividade é anti-apoptótica (FERRARA et al., 2003), o que poderia favorecer a entrada da  
5 célula em atividade proliferativa. Nesta linha, há inúmeras evidências mostrando maiores  
6 frações de proliferação celular nos tumores de glândula salivar malignos comparativamente  
7 aos benignos (SOINI et al., 1992; SOUZA et al., 2003).

8        Outro aspecto favorecedor da progressão neoplásica é a relação da expressão de  
9 VEGF com a angiogênese. Neste sentido, o aumento da expressão de VEGF tem sido  
10 correlacionado com aumento da densidade vascular intratumoral (DMV), influenciando  
11 metástases e prognóstico em carcinoma gástrico (MAEDA et al., 1996, 1999), cólon  
12 (TAKAHASHI et al., 1997), pulmão não de pequenas células (FONTANINI et al., 1998),  
13 câncer de mama linfonodo negativo (LINDERHOLM et al., 1998) e carcinoma  
14 epidermóide oral (MAEDA et al., 1998). Contudo, poucos estudos têm sido publicados  
15 mostrando a relação da expressão de VEGF e pior prognóstico em carcinomas de glândulas  
16 salivares (DOI et al., 1999; LIM et al., 2003; YU et al., 2003; ZHANG et al., 2005).

17        Correlação entre expressão de VEGF e DMV tem sido notada em diferentes tipos  
18 de neoplasias, inclusive de glândulas salivares (ZHANG et al., 2005; SHI et al., 2007).  
19 Este fato é relevante, tendo em vista que indica maior angiogênese e maior permeação  
20 tumoral pelos vasos sanguíneos. Com isto, teoricamente, haveria maior chance de ocorrer  
21 permeação vascular metastática. Assim, nossa expectativa era de que encontrássemos não  
22 só a associação de VEGF com DMV, mas também com a presença de metástases. Todavia,  
23 no presente estudo a expressão de VEGF não possibilitou a discriminação dos tumores  
24 primários não metastatizantes (*pnm*) dos tumores primários metastatizantes (*pm*), tanto  
25 para o grupo de tumores malignos (APBG, CAC e CME), quanto na comparação entre *pnm*

1 e *pm* para cada tipo histológico. Resultados semelhantes também foram descritos por DOI  
2 et al. (1999) e YU et al. (2003). Este fato também se repetiu na avaliação da DMV (DOI et  
3 al., 1999).

4 Além disso, também não observamos correlação entre a expressão de VEGF e  
5 DMV com sobrevida, nem para os tumores malignos como grupo (*Pmalig*, *PNM* e *PM*),  
6 nem para cada subtipo histológico (APBG, CME, CAC). Estes resultados discordam do  
7 que foi relatado por Yu et al. (2003) e Shi et al. (2007) que encontraram uma associação  
8 entre DMV e prognóstico. Nesta linha, Li et al. (2001) e Zhang et al. (2005) encontraram  
9 associação entre VEGF e DMV e entre estes marcadores e o prognóstico, e Lim et al.  
10 (2003) que encontraram associação entre VEGF e prognóstico. Esta ausência de  
11 homogeneidade nos resultados presentes na literatura e em nosso trabalho não parece ter  
12 uma explicação simples. Embora possamos discutir questões relativas à modulação da  
13 expressão de VEGF, nossos resultados e os estudos descritos não apresentam metodologia  
14 que permita esta apreciação. Talvez uma avaliação do tempo de evolução do tumor, a  
15 presença de fatores intercorrentes não identificados ou relatados pelos autores e mesmo a  
16 utilização de casos recidivantes possam eventualmente ser considerados em uma futura  
17 investigação para melhor elucidação destas diferenças. A propósito, Shi et al. (2007) e Doi  
18 et al. (1999) relatam que utilizaram casos recidivantes na sua amostra, mas não fizeram  
19 qualquer comentário sobre a expressão de VEGF ou de DMV nestes casos. Seria  
20 importante avaliar se estas diferenças de expressão poderiam refletir ambientes tumorais  
21 distintos entre lesões primárias estabelecidas e lesões recidivantes.

22 Ainda outra questão que merece reflexão, diz respeito à metodologia utilizada tanto  
23 para a avaliação de VEGF quanto da DMV. Diretrizes estabelecidas pelo 2º Consenso  
24 Internacional sobre Metodologia e Critérios de Avaliação da Quantificação de  
25 Angiogênese em Tumores Sólidos Humanos orientam que as mensurações de DMV devem

1 excluir as áreas de necrose e esclerose (VERMEULEN et al., 2002). Nenhum dos trabalhos  
2 referidos anteriormente cita explicitamente que utilizaram estas orientações em suas  
3 avaliações. Embora descrevam a utilização da metodologia preconizada por Weidner et al.,  
4 (1991) também considerada referência pelo VERMEULEN et al. (2002), não consideram a  
5 exclusão das áreas de necrose e esclerose.

6 Muito embora tenhamos seguido as orientações do “Consenso”, julgamos que uma  
7 outra avaliação deveria ser considerada. Isto porque, a priori, embora não esteja ainda bem  
8 definida se a permeação vascular seja um processo passivo ou ativo (BOCKHORN et al,  
9 2007), acreditamos que uma maior exposição vascular ao tumor poderia favorecer maior  
10 chance de escape celular pelos vasos sanguíneos. Assim, vale considerar que nas áreas de  
11 necrose, rompimentos vasculares poderiam favorecer maior exposição à drenagem de  
12 células neoplásicas. Além disto, a presença de fatores de crescimento induzíveis por  
13 hipóxia nestas regiões, poderia favorecer o aumento da vascularização pelo aumento de  
14 VEGF que, conseqüentemente, teria o mesmo efeito por aumentar a DMV (RUDDON,  
15 2007).

16 A expressão de VEGF tem sido determinada por métodos semi-quantitativos, mas  
17 a ausência de padronização justifica em parte a variedade de resultados encontrados na  
18 literatura. Alguns estudos obtiveram a expressão de VEGF pela frequência de marcação,  
19 positiva se mais de 10% das células estiverem marcadas (TSUJITANI et al., 2004), ou  
20 mais de 20% (DOI et al., 1999), ou se mais de 80% do tumor apresentar marcação (SHIH  
21 et al., 2000). Outros estudos se basearam na intensidade, classificando subjetivamente a  
22 marcação em fraca, moderada e forte; outros agrupam em duas categorias: moderada e  
23 forte (SAUTER et al., 1999). Soma-se a esses os que classificam a intensidade baseada no  
24 parâmetro de marcação de VEGF no vaso: marcação igual a do vaso era considerada  
25 moderada, abaixo é fraca e acima forte (MORYAMA et al., 1997). Finalmente, outros

1 estudos associam a frequência e a intensidade de marcação, somando-as ou multiplicando-  
2 as e obtendo-se daí, um escore que determinava se a expressão era fraca, moderada ou  
3 forte (LIM et al., 2003; RYU et al., 2003; ZHANG et al., 2005; SHI et al., 2007). Nosso  
4 estudo seguiu aqueles princípios estabelecidos por Lim et al. (2003), Weidner et al.,  
5 (1991), Zhang et al., (2005) e Shi et al., 2007 utilizando escores compostos. Todavia, como  
6 já mencionado, nossos resultados foram diversos, como já discutido acima.

7 Vale ressaltar, que seleção e o tamanho da amostra, a fixação e o processamento  
8 dos tumores, a utilização de anticorpos policlonais para VEGF, CD34 e CD105, diferentes  
9 técnicas de recuperação antigênica, a subjetividade de interpretação dos observadores tem  
10 também influenciado a divergência dos achados para marcação de VEGF, CD34 e CD105  
11 em um mesmo tipo de tumor. Neste sentido, mais estudos devem ser desenvolvidos,  
12 considerando a possibilidade de melhor adequação metodológica, direcionando-a no  
13 sentido de se obter uma padronização que evite as variações comentadas.

14 Ainda outra questão levantada pelos autores que trabalham com estimativa de  
15 angiogênese tumoral diz respeito a utilização de um ou vários fragmentos na sua  
16 mensuração. Neste ponto, as opiniões são contraditórias (DE JONG et al., 1995; PAGE &  
17 JENSEN, 1995; VERMELEUM et al., 1995, MARTIN et al., 1997).

18 Os estudos que descreveram a expressão imuno-histoquímica de PDEGF tem  
19 descrito marcações citoplasmáticas e/ou nucleares (FOX et al., 1995; TAKEBAYASHI et  
20 al., 1996; KOUKOURAKIS et al., 1998; TOKUNAGA et al., 2002; RYU et al., 2003), o  
21 que também foi verificado no presente trabalho. Nossos resultados não puderam identificar  
22 nenhuma associação de sua expressão com a angiogênese, metástases ou prognóstico, dado  
23 pela redução de sobrevida nos pacientes quer seja pela expressão citoplasmática ou nuclear  
24 do PDEGF. Essa compartimentalização da expressão de PDEGF foi discutida por Fox et  
25 al. (1995) sugerindo que no núcleo PDEGF pode indicar a sua atuação como reguladora da

1 replicação celular, e no citoplasma, a regulação e interação com enzimas localizadas nesse  
2 compartimento celular. Todavia, não foram observadas outras investigações que possa  
3 elucidar mais claramente esse assunto.

4 O único estudo realizado em glândulas salivares foi o de Fox et al. (1995) que  
5 encontrou expressão do PDEGF em glândulas salivares normais evidenciada nos ácinos  
6 serosos, epitélio ductal, e endotélio vascular (FOX et al., 1995). No presente estudo, foi  
7 evidenciado esse mesmo padrão de marcação nas glândulas normais.

8 A expressão do PDEGF nos tumores sólido tem sido encontrada mais alta que em  
9 tecidos normais adjacentes (MOGHADDAM et al., 1995; TAKEBAYASHI, 1996;  
10 AKIYAMA et al., 2004). Nossos achados também mostraram esta relação. Acredita-se que  
11 esta expressão tenha uma relação com o papel do PDEGF na resistência à apoptose  
12 induzida pela hipóxia, permitindo um crescimento celular neoplásico *in vivo*, sem aumento  
13 da DMV.

14 Uma correlação positiva entre PDEGF e DMV é reportada em outros tumores  
15 sólidos (TOI et al., 1995; UEDA et al., 1999). Nossos resultados mostraram uma  
16 correlação positiva entre PDEGF e CD34 no grupo de lesões *PNM*; e entre PDEGF e  
17 CD105 nos grupos *PNM* e *PM*, e para o *CME<sub>pm</sub>* e *CME<sub>pnm</sub>*. Estes dados também não nos  
18 permitem uma visão homogênea do papel do PDEGF na angiogênese destas lesões. Talvez,  
19 aqui também, tenhamos evidência de que o processo de angiogênese não seja  
20 significativamente diferente entre as lesões glandulares. Contudo, chama a atenção o fato  
21 de, novamente, o CME apresentar uma marcação diferenciada o que, mais uma vez pode  
22 sugerir que sua progressão esteja mais vinculada com a angiogênese e, desta forma, possa  
23 influenciar nas associações identificadas quando se considerou para a análise todo o grupo  
24 de lesões malignas.

1 A expressão de PDEGF tem sido relacionada com invasão e aparecimento de  
2 metástases de alguns tumores sólidos (MOGHADDAM et al., 1995; TAKEBAYASHI et  
3 al., 1996, GRIFFITHS & STRATFORD 1998; BROWN et al., 2000; JONES et al., 2002).  
4 Além disso, o valor prognóstico de PDEGF é reconhecido no câncer de mama (FOX et al.,  
5 1995) e câncer de útero (RYU et al., 2003), traduzido pela associação entre maior  
6 expressão e menor sobrevida dos pacientes. No presente trabalho a expressão de PDEGF  
7 conseguiu diferenciar o grupo de neoplasias benignas (AP) do grupo de neoplasias  
8 malignas (*Pmalig*) e mostrou uma maior expressão nos CME quando comparados com  
9 CAC e APBG. A priori, não conseguimos obter na literatura nenhuma explicação  
10 convincente para este dado. De forma semelhante ao VEGF, o PDEGF pode também  
11 favorecer a resistência a apoptose (TOI et al., 2005) e com isto favorecer o crescimento dos  
12 tumores que apresentam maior fração de proliferação celular. Uma explicação alternativa,  
13 que careceria de confirmação, é o fato de que subtipos histológicos de tumores de glândula  
14 salivar, como por ex. o CME, podem ter sua progressão menos dependente da angiogênese  
15 do que outros tipos como o CAC e APBG, cuja morfologia é semelhante, mas o  
16 comportamento biológico é completamente distinto. Não foi também possível distinguir as  
17 neoplasias *pnm* das *pm*, analisadas como grupos ou entre os diferentes tipos histológicos  
18 separadamente. Logo, o PDEGF não mostrou ser um bom marcador de potencial  
19 metastático e de prognóstico para os tumores de glândulas salivares. Como foi mencionado  
20 anteriormente, este é o primeiro trabalho estudando o significado da expressão de PDEGF  
21 no comportamento biológico dos tumores de glândulas salivares. Portanto, não há como  
22 discutir os seus resultados para tumores desta topografia. Em carcinomas gástricos e de  
23 mama também tem sido relatado ausência de correlação da expressão de PDEGF e DVM, e  
24 PDEGF e prognóstico. (YAMAMOTO et al., 1998; MORINAGA et al., 2003).

1           Como era de se esperar, o CD105 só foi demonstrado no endotélio de vasos  
2 tumorais (KUMAR et al., 1999). Foi observada uma menor densidade microvascular que a  
3 marcada por CD34. Além disso, vários tumores não apresentaram vasos corados pelo  
4 CD105 como no CAC, onde apenas 5,4% dos casos foram positivos. Nos tecidos normais  
5 não foram observadas marcações no endotélio vascular, e nos AP apenas três casos  
6 apresentaram reduzida quantidade de vasos marcados. Uma alta expressão do CD105 tem  
7 sido relatada na literatura em tumores sólidos, onde este marcador está intensamente  
8 expresso apenas em vasos neoformados, não sendo expresso em vasos pré-existentes e  
9 tecido normal (BODEY et al., 1998; KUMAR et al., 1999; MINHAJAT et al., 2006).

10           Os achados mostraram maior expressão de CD105 nos CME em relação ao AP,  
11 APBG e CAC ( $p < 0,0001$ ). Também não foi possível encontrar valores de expressão que  
12 pudessem discriminar o comportamento biológico dos tumores primários metastatizantes  
13 dos primários metastatizantes. Da mesma forma, não foi possível associá-lo ao pior  
14 prognóstico. Grudzinski et al. (2007) estudando a expressão de CD105 em câncer de  
15 mama, também encontraram 52,8% dos casos negativos. Os autores concluíram que a  
16 expressão de CD105 não apresentou significância estatística como fator prognóstico ( $p =$   
17 0,145).

18           Embora estes resultados possam refletir aspectos ainda não esclarecidos da função  
19 biológica destas proteínas, é importante salientar a influência da metodologia utilizada  
20 nestas avaliações, tanto nos resultados como na sua interpretação. Diferentes fatores têm  
21 sido implicados, em maior ou menor grau, nos resultados finais das reações imuno-  
22 histoquímicas; entre eles, os aspectos do processamento prévio à reação, que podem  
23 interferir na conservação dos antígenos. É possível citar a fixação tecidual (natureza do  
24 fixador empregado, tempo de fixação, tempo transcorrido entre a retirada do material e o

1 início da fixação); o processo de inclusão em parafina (temperatura) e a diafanização das  
2 secções teciduais (LOYOLA, 1996).

3 Vale ressaltar também que a expressão de CD105 parece ser específica para vasos  
4 neoformados. Como considerado anteriormente, o processo de metástases é diretamente  
5 associado a participação vascular, já que o transporte de células para sítios distantes é  
6 preferencialmente realizado a partir de sua entrada nos vasos. Não obstante, não se sabe  
7 ainda se este escape vascular se dá de forma passiva ou ativa. Alguns autores defendem a  
8 idéia de que este fenômeno está desvinculado de qualquer participação ativa das células,  
9 sendo as metástases dependentes apenas da aproximação da célula neoplásica do vaso e  
10 sua entrada facilitada ou por um dano estrutural ou por uma deficiência estrutural,  
11 representada pela imaturidade presente nos vasos neoformados. Já outros, consideram que  
12 há uma migração celular ativa para os vasos e uma penetração nestes facilitada pela ação  
13 de enzimas e, provavelmente de receptores específicos para estas células. Se os dois  
14 mecanismos ocorrem ou um mecanismo prevalece não é possível afirmar com certeza  
15 dentro do que se conhece atualmente (BOCKHORN et al., 2007). A definição desta  
16 situação pode explicar, talvez, estas diferenças de significado da expressão de CD105 e  
17 também de CD34 nos tumores avaliados. Vasos preexistentes e neoformados não teriam  
18 diferenças significativas no processo caso a migração ativa prevalecesse. De outra forma,  
19 vasos neoformados, imaturos, seriam extremamente importantes na definição da  
20 potencialidade metastática se a migração passiva fosse mais importante.

21 Assim, nossos resultados mostram que a angiogênese e os fatores de crescimento  
22 VEGF e PDEGF a ela associada puderam discriminar apenas os grupos tumorais com  
23 naturezas diferentes: lesões malignas e benignas. Contudo, não houve uma homogeneidade  
24 de expressão que pudesse ser característica para cada grupo de neoplasia maligna, seus  
25 correspondentes metastáticos, definindo, pelos resultados, que a expressão destes fatores

1 não deve, a priori, aplicável para predição de potencial metastático e mesmo de  
2 prognóstico. Não obstante, outros estudos devem ser realizados para verificar a influência  
3 das diferentes áreas tumorais no padrão geral de expressão antigênica, a inclusão de áreas  
4 necróticas na avaliação da angiogênese, a avaliação de índices compostos de mensuração  
5 vascular que incluam valores de CD105 e CD34 e a inclusão de casos recidivantes que  
6 também produziram metástases.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

**CONCLUSÃO**



## 1           **8- CONCLUSÃO**

2

3           Dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que:

4

5           1. Não houve diferença na expressão de VEGF, PDEGF, CD34 e CD105 para cada  
6           tipo tumoral individualmente, a partir do parâmetro morfo-histogenético.

7

8           2. As expressões de VEGF, PDEGF, CD34 e CD105, possibilitaram a discriminação  
9           do grupo de tumores benignos dos malignos de glândulas salivares.

10

11           3. As expressões de PDEGF, CD34 e CD105, possibilitaram a discriminação de CME  
12           e APBG, e CME e CAC. Enquanto, as expressões de VEGF não possibilitaram a  
13           discriminação dos tipos histológicos dos tumores malignos entre si.

14

15           4. As expressões de VEGF, PDEGF, CD34 e CD105 não possibilitaram a  
16           discriminação do comportamento biológico das neoplasias malignas de glândulas  
17           salivares em não metastatizantes e metastatizantes.

18

19           5. VEGF, PDEGF, CD34 e CD105 não são bons marcadores de prognóstico e  
20           preditores de metástases para as neoplasias epiteliais de glândulas salivares.

21

22

23

24

25

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

**RESUMO**



## 9- RESUMO

A angiogênese tumoral é um potencial marcador biológico de prognóstico e um fator preditivo de metástases em tumores sólidos humanos. Para avaliar a distribuição e quantificação da angiogênese, tem-se utilizado marcadores de endotélio e fatores de crescimento vascular, dentre esses selecionamos o Fator Vascular de Crescimento Endotelial (VEGF), o fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PDEGF) e os marcadores de endotélio vascular CD34 e CD105. O objetivo deste trabalho foi avaliar, morfo-histogenética, quantitativa e semi-quantitativamente, a expressão imunohistoquímica das proteínas VEGF e PDEGF, e dos marcadores de endotélio vascular CD34 e CD105, e suas associações com a existência (*pm*) ou não de metástases (*pnm*) em tumores epiteliais de glândulas salivares. Para tanto, foram selecionados 139 casos de neoplasias epiteliais de glândulas salivares diagnosticados e tratados no Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde, localizado na cidade do Rio de Janeiro (RJ) (INCA), no período de 1997 a 2003, sendo 30 casos de Adenomas Pleomórfico (AP), 19 Adenocarcinomas Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade (APBG), 50 Carcinomas Adenóide Cístico (CAC) e 40 Carcinomas Mucoepidermóide (CME). Uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) foi encontrada entre: 1) AP e o grupo de lesões primárias malignas (*Pmalig*) para VEGF ( $p < 0,0001$ ), PDEGF ( $p = 0,006$ ), CD34 ( $p = 0,003$ ) e CD105 ( $p = 0,003$ ); 2) APBG, CAC e CME para PDEGF ( $p < 0,01$ ), CD34 ( $p < 0,0001$ ), e CD105 ( $p < 0,0001$ ), onde a diferença ocorreu entre CME e APBG, e CME e CAC. A análise entre *pnm* e *pm* para cada tipo histológico e para o grupo de malignos não foram significativas. Os marcadores VEGF, PDEGF, CD34 e CD105 não refletiram o potencial metastático das neoplasias de glândulas salivares e não foram marcadores independentes de prognóstico.

Palavras chaves: angiogênese, VEGF, PDEGF, CD34, CD105, neoplasias de glândulas salivares.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

**ABSTRACT**



**1 10- ABSTRACT**

2 Tumoral angiogenesis represents a potential biomolecular marker for prognosis and  
3 predictive factor for metastasis in human solid tumors. Recently, endothelial markers and  
4 growth vascular factors such as the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the  
5 platelet derived endothelial growth factor (PDEGF), as well as the vascular endothelial  
6 markers CD34 and CD105 have been employed to evaluate the distribution and to quantify  
7 of angiogenesis. The objective of this study was to perform morpho-histogenetic,  
8 quantitative and semi-quantitative analysis of the immunohistochemical expression of  
9 VEGF, PDEGF, CD34, and CD105 in primary epithelial salivary gland tumors, as well as  
10 compare this expression with the biological behavior of those neoplasms as determined by  
11 the existence (*pm*) or absence (*pnm*) of metastasis. In this sense, it was selected 139 cases  
12 of epithelial salivary gland tumors diagnosed and treated in the Brazilian National Cancer  
13 Institute (INCA), placed in Rio de Janeiro City (RJ), from 1997 to 2003, consisting in 30  
14 pleomorphic adenomas (PA), 19 polymorphic low grade adenocarcinoma (PLGA), 50  
15 adenoid cystic carcinoma (ACC) and 40 of mucoepidermoid carcinoma (MEC). Statistic  
16 significant difference ( $p < 0.05$ ) was found between: 1) PA and the group of primary  
17 malignant lesions (*Pmalig*) for VEGF ( $p < 0.0001$ ), PDEGF ( $p = 0.006$ ), CD34 ( $p = 0.003$ )  
18 and CD105 ( $p = 0.003$ ); 2) PLGA, ACC and MEC for PDEGF ( $p < 0.0001$ ), CD34 ( $p <$   
19  $0.0001$ ) and CD105 ( $p < 0.0001$ ), where the difference occurred between MEC and PLGA,  
20 and MEC and ACC. The comparison between *pm* and *pnm* for each histological type and  
21 for each malignant group did not reveal significant differences. In conclusion, the present  
22 results suggest that VEGF, PDEGF, CD34 and CD105 do not represent good predictors for  
23 metastasis and prognosis in epithelial salivary gland tumors, albeit they may reflect some  
24 pathogenetic differences among specific groups of these neoplasms.

25

26 Key words: Angiogenesis, VEGF, PDEGF, CD34, CD105, salivary gland tumors.

27

28

29

30

31

32

33

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25 ]  
26  
27

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L. **Bioestat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá / MCT – CNPq / Conservation International. 2005. 334pp.
2. AKIYAMA, S; FURUKAWA, T; SUMIZAWA, T; TAKEBAYASHI, Y; NAKAJIMA, Y; SHIMAOKA, S; HARAGUCHI, M. The role of thymidine phosphorylase, an angiogenic enzyme, in tumor progression. **Cancer Sci** v.95, p.851-857, 2004.
3. ARAUJO, V; SOUSA, S; JAEGER, M; JAEGER, R; LOYOLA, A; CRIVELINI, M; ARAUJO, N. Characterization of the cellular component of polymorphous low-grade adenocarcinoma by immunohistochemistry and electron microscopy. **Oral Oncology**, Oxford, New York, v.35 (2), p. 164-72, 1999.
4. AUCLAIR, PC ; GOODE, PK ; ELLIS, GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands: evaluation and application of grading criteria in 143 cases. **Cancer**, New York, v. 69(8), p. 2021-2030, 1992.
5. AUCLAIR, PL; ELLIS, GL. Surgical Pathology of salivary glands. Major problems in Pathology Series. in: ELLIS, GL; AUCLAIR, PL, GNEPP, DR. **Mucoepidermoid carcinoma**. Philadelphia, WB Saunders Company, 1991, p. 269-298.
6. BARNES, L; EVESON, JW; REICHAERT, P; SIDRANSKY, YD. (Eds): World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. **IARC Press**. Lyon 2005.
7. BATSAKIS, JG. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinomas of major salivary glands: a clinicopathologic and flow cytometric study. **European Journal of Cancer. Part B, Oral Oncology**, Oxford, New York, v. 30B, p. 329-334, 1994.
8. BENJAMIN, LE; GOLIJANIN, D; ITIN, A; et al. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. **Development**. 125:1591-8, 1998.
9. BOCKHORN, M; JAIN, RK; MUNN, LL. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? **Lancet Oncol**, 8: 444-48, 2007.
10. BODEY, B; BODEY, BJR; SIEGEL, SE; KAISER, HE. Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. **Anticancer Res**. 18(4A):2701-10, 1998.

- 1 11. BRADLEY, PJ. Distant metastases from salivary glands cancer. **ORL**. 63: 233-  
2 242; 2001.
- 3
- 4 12. BRANDWEIN, MS; IVANOV, K; WALLACE, DI; HILLE, JJ; WANG, B;  
5 FAHMY, A; BODIAN, C; URKEN, ML; GNEPP, DR; HUVOS, A;  
6 LUMERMAN, H; MILLS, SE. Mucoepidermoid carcinoma: a  
7 clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological  
8 grading. **The American Journal of Surgical Pathology**, New York, v. 25, p.  
9 835-845, 2001.
- 10
- 11 13. BROWN, NS; JONES, A; FUJIYAMA, C; HARRIS, AL; BICKNELL, R.  
12 Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes  
13 secretion of angiogenic factors. **Cancer Res** v.60, p.6298-6302, 2000.
- 14
- 15 14. BURROWS, FJ; DERB, Y; SHIRE, EJ; TAZZARI, PL; AMLOT, P; GAZDAR,  
16 AF; KING, SW; LETARTE, M; VITETTA, ES; THORPE, PE. Up-regulation  
17 of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications  
18 for diagnosis and therapy. **Clin Cancer Res**. 1:1623-34, 1995.
- 19
- 20 15. CAMPOS-FILHO, N; FRANCO, EL. Microcomputer-assisted univariate survival  
21 data analysis using Kaplan-Meier life table estimators. **Comput Methods**  
22 **Programs Biomed**. 27(3):223-228, 1990.
- 23
- 24 16. CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med**,  
25 6:389-395, 2000.
- 26
- 27 17. CHIEN, CY; SU, CY; HWANG, CF; CHUANG, HC; HSIAO, YC; WU, SL;  
28 HUANG, CC. Clinicopathologic significance of CD105 expression in  
29 squamous cell carcinoma of the hypopharynx. **Head Neck**, 28(5): 441-6, 2006.
- 30
- 31 18. CLODE, AL; FONSECA, I; SANTOS, SR; SOARES, J. Mucoepidermoid  
32 carcinoma of the salivary glands: a reappraisal of the influence of tumor  
33 differentiation on prognosis. **Journal Surgery Oncology**. 46: 101-106; 1991.
- 34
- 35 19. CONWAY, EM; COLLEN, D; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood  
36 vessel growth. **Cardiovasc Res**. 49:507-21, 2001.
- 37
- 38 20. COWIE, VJ; POINTON, RCS. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands.  
39 **Clinical Radiology**, Edinburgh, Livingstone, v. 35, p.331-333, 1984.
- 40
- 41 21. DALES, JP; GARCIA, S; CARPENTIER, S; RAMUZ, O; LAVAUT, MN. et al.  
42 Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas:  
43 comparison of Tie-2/Tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression.  
44 **Hum Pathol** 35:176-83, 2004.
- 45
- 46 22. DE JONG, JS; VAN DIEST, PJ; BAAK, JP. Heterogeneity and reproducibility of  
47 microvessel counts in breast cancer. **Lab Invest** 73: 992-996, 1995.
- 48

- 1 23. DICKINSON, AJ; FOX, SB; PERSAD, RA; HOLLYER, J; SIBLEY, GN;  
2 HARRIS, AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of  
3 prognosis in bladder carcinomas. **Br J Urol.**, 74(6):762-6, 1994.  
4
- 5 24. DOI, R; KURATATE, I.; OKAMOTO, E; RYOKE, K; ITO, K. Expression of p53  
6 oncoprotein increases intratumoral microvessel formation in human salivary  
7 gland carcinomas. **Journal Oral pathology Medicine**, v.28, p. 259-63, 1999.  
8
- 9 25. DUFF, SE; LI, C; GARLAND, JM; KUMAR,S. CD105 is important for  
10 angiogenesis: evidence and potential applications. . **The FASEB Journal**. 17:  
11 984-992; 2003.  
12
- 13 26. DUFF, SE; SAUNDERS, M; McKREDIE, V; KUMAR, S; O'DWYER, ST;  
14 JASON, GC. Pre-operative plasma levels of vascular endothelial growth factor  
15 C and D in patients with colorectal cancer. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**.  
16 17(5):367-71, 2005.  
17
- 18 27. DVORAK, HF; BROWN, LF; DETMAR, M; DVORAK, AM. Vascular  
19 permeability factor/ vascular endothelial growth factor, microvascular  
20 hypermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol**, 146: 1029-1039, 1995.  
21
- 22 28. ELLIS, GL; AUCLAIR, PL; GNEPP, D.R. **Surgical Pathology of the Salivary**  
23 **Glands**. Philadelphia, WB Saunders, 1991.  
24
- 25 29. ELLIS, GL; AUCLAIR, P. Tumors of Salivary Glands, in Armed Forces Institute  
26 of Pathology, **Atlas of Tumor Pathology**, 3<sup>rd</sup> Series, Fascicle 17. Washington,  
27 p. 155-175,1996.  
28
- 29 30. ELLIS, LM; FIDLER, IJ. Angiogenesis and metastasis. **Eur J Cancer**.  
30 32A(14):2451-60, 1996.  
31
- 32 31. ELPEK, GO; GELEN, T; AKSOY, NH; ERDOGAN, A; DERTSIZ, L;  
33 DENIRCAN, A; KELES, N. The prognostic relevance of angiogenesis and  
34 mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. **J Clin Pathol** 54:  
35 940-944, 2001.  
36
- 37 32. EVANS, HL & BATSAKIS, JG. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of  
38 minor salivary glands: A study of 14 cases of a distinctive neoplasm. **Cancer**,  
39 New York, v. 53, p. 935-942, 1984.  
40
- 41 33. EVANS, HL, LUNA, MA. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: a study of  
42 40 cases with long-term follow up and an evaluation of the importance of  
43 papillary areas. **Am J Surg Pathol**. 24(10): 1319-1328, 2000.  
44
- 45 34. EVESON, JW; CAWSON, RA. Tumours of the minor (oropharyngeal) salivary  
46 glands: a demographic study of 336 cases. **J Oral Pathol**. 14(6):500-9, 1985.  
47
- 48 35. FERNANDEZ-RUIZ, E; ST-JACQUES, S; LETARTE, M; BERNABEN, C.  
49 Assignment of the human gene (END) to 9q34-qter. **Cytogenet Cell Genet**.  
50 64:204-7, 1993.

- 1  
2 36. FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial Growth  
3 factor. **J Mol Med.** 77(7):527-43, 1999.  
4  
5 37. FERRARA, N; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth  
6 factor. **Endocr Rev.** 18(1):4-25, 1997.  
7  
8 38. FERRARA, N; GERBER, HP; LECOURTER J. The biology of VEGF and its  
9 receptors. **Nat Med** 9:969-976, 2003.  
10  
11 39. FERRARA, N; HENZEL, WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-  
12 binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem Biophys**  
13 **Res Commun** 161:851-858, 1989.  
14  
15 40. FERRARA, N; HOUCK, K; JAKEMAN, L; LEUNG, DW. Molecular and  
16 biological properties of the vascular endothelial growth factor family of  
17 proteins. **Endocr. Ver**, v.13, p. 18-32, 1992.  
18  
19 41. FIGUEIREDO, CRLV. **Estudo Imuno-Histoquímico do Carcinoma Adenóide**  
20 **Cístico.** 1995. Tese (Doutorado em Patologia Bucal). Universidade de São  
21 Paulo, São Paulo, 1995.  
22  
23 42. FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. In: J. Mendelsohn, p. Howley, A. Israel, and  
24 L.A. Liotta (eds), *The Molecular Basis of Cancer*, p. 206-224, Philadelphia:  
25 W.B. Saunders Company, 1995.  
26  
27 43. FOLKMAN, J; MERLER, E; ABERNATHY, C; WILLIAMS, G. Isolation of a  
28 tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, 133 (2) 275-88, 1971.  
29  
30 44. FOLKMAN, J; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chem**, 5 267:10931-4, 1992.  
31  
32 45. FOLKMAN, J; WATSON, K; INGBER, D; HANAHAN, D. Induction of  
33 angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**, 4,  
34 339 (6219):58-61, 1989.  
35  
36 46. FONSATTI, E; JEKUNE, AP; KAIREMO, KJ; CORAL, S; SNELLMAN, M;  
37 NICOTRA,MR; NATALI, PG; ALTOMONTE,M; MAIO, M. Endoglin is a  
38 suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a  
39 canine mammary carcinoma model. **Clin Cancer Res.** 6(5):2037-43, 2000.  
40  
41 47. FONSATTI, E; DEL-VECCHHIO, L; ALTOMONTE, M, et al. Endoglin: an  
42 accessory component of TGF- $\beta$ -binding receptor-complex with diagnostic,  
43 prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies.  
44 **Journal of cellular physiology.** 188: 1-7, 2001.  
45  
46 48. FONTANINI, G; BOLDRINI, L; VIGNATI, S; CHINE, S; BASOLO, F;  
47 SILVESTRI, V; LUCCHI, M; MUSSI, A; ANGELETTI, CA; BEVILACQUA,  
48 G. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated  
49 angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. **Eur J Cancer.** 34(5):718-23,  
50 1998.

- 1  
2 49. FOX, SB; GATTER, KC; HARRIS, A. Tumor angiogenesis. **J. Pathol.**, 179:232–  
3 237, 1996.  
4  
5 50. FOX, SB; MOGHADDAM, A; WESTWOOD, M; TURLEY, H; BICKNELL, R;  
6 GATTER, KC; HARRIS, AL. Platelet-derived endothelial cell growth  
7 factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: an  
8 immunohistochemical study. **J Pathol** v.176, p.183-190, 1995.  
9  
10 51. FOX, SB; HARRIS, AL. Markers of tumor angiogenesis: clinical applications in  
11 prognosis and anti-angiogenic therapy. **Investigational New Drugs**, 15:15-28,  
12 1997.  
13  
14 52. FOX, SB; HARRIS, AL.. Histological quantitation of tumour angiogenesis.  
15 **APMIS**. 112(7-8):413-30, 2004.  
16  
17 53. FRITZ, A; PERCY, C; JACK, A; SHANMUGARATNAM, K; SOBIN, LH;  
18 PARKIN, DM; WHELAN, S. International Classification of Diseases for  
19 Oncology. 3<sup>rd</sup> ed. **World Health Organization**: Geneva, 2000.  
20  
21 54. FUJIWAKI, E; HATA, K; LIDA K; et al. Vascular growth factor expression in  
22 progression of cervical cancer: correlation with thymidine phosphorylase  
23 expression, angiogenesis, tumor cell proliferation, and apoptosis. **Anticancer**  
24 **Res**; 20: 1317-1322, 2000.  
25  
26 55. FUJIMOTO, K; HOSOTANI, R; WADA, M; LEE, MU; KOSHIBA, T;  
27 MIYAMOTO, Y; TSUJI, S; NAKAJIMA, S; DOI, R; IMAMURA, M.  
28 Expression of two angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and  
29 platelet-derived endothelial cell growth factor in human pancreatic cancer, and  
30 its relationship to angiogenesis. **Eur J Cancer** v.34, p.1439-1447, 1998.  
31  
32 56. GERBER, HP; et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice.  
33 **Development**, 1149-1159, 1999.  
34  
35 57. GERBER, HP; McMURTREY, A; KOWALSKI, J; YAN, M; KEYT, BA; DIXIT,  
36 V; FERRARA, N. VEGF regulates endothelial cell survival by the PI3-  
37 kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR  
38 activation. **J Biol Chem**, 273: 30366-30343, 1998.  
39  
40 58. GLEICH, LL, BIDDINGER, PW; FRANK, DD; GLUCKMAN, JL. Tumor  
41 angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell  
42 carcinoma: a clinical-pathologic correlation. **HEAD & NECK**, 19: 276-280,  
43 1997.  
44  
45 59. GOUGOS, A; LETARTE M. Identification of a human endothelial cell antigen  
46 with monoclonal antibody 44g4 produced against a pre-B leukemic cell line. **J**  
47 **Immuno** 141: 1925-33, 1988.  
48  
49 60. GRIFFITHS, L; STRATFORD, IJ. The influence of elevated levels of platelet-  
50 derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase on

- 1 tumourigenicity, tumour growth, and oxygenation. **Int J Radiat Oncol Biol**  
2 **Phys** v.42, p.877-883, 1998.  
3
- 4 61. GRUDZINSKI, M; CAMBRUZZI, E; LAHUDE, E; FRANCALACCI-SAVARIS,  
5 R; PEDRINI, JL; ZETTLER, CG. Expressão da Cox-2 e CD105 no câncer de  
6 mama e sobrevida livre de doença. **Revista da Associação Médica Brasileira**  
7 52(4):275-280, 2006.  
8
- 9 62. GUZZO, M; ANDREOLLA, S; SIRIZZOTTI, G; CANTU, G. Mucoepidermoid  
10 carcinoma of the salivary glands: clinicopathologic review of 108 patients  
11 treated at the National Cancer Institute of Milan. **Ann Surg Oncol**. 9(7):688-95,  
12 2002.  
13
- 14 63. HAMPER, K, SCHIMITZ-WÄTJEN, W; MAUSCH, H-E; CASELITZ, J;  
15 SEIFERT, G. Multiple expression of tissue markes in mucoepidermoid  
16 carcinomas and acinic cell carcinomas of the salivary glands. **Virchows Archiv**  
17 **A Pathological Anatomy and Histopathology**, Berlin, New York, v. 144 (5),  
18 p. 407-413, 1989.  
19
- 20 64. HARAGUCHI, M; MIYADERA, K; UEMURA, K, et al. Angiogenic factor.  
21 Nature, 368: 198, 1994.  
22
- 23 65. HASAN, J; BYERS, R; JATSON, GC. Intra-tumoral microvessel density in human  
24 solid tumors. **British Journal of Cancer**, 86:1566-1577, 2002.  
25
- 26 66. HAUNG, MX; MA, DQ; SUN, KH; YU, GY; GUO, CB; GAO, F. Factors  
27 influencing survival rate in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands.  
28 **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgeons**, Copenhagen, v.  
29 26, p. 435-439, 1997.  
30
- 31 67. HICKMAN, RE; CAWSON, RA; DUFFY, SW. The prognosis of specific types of  
32 salivary gland tumours. **Cancer** 54: 1620-1624; 1984.  
33
- 34 68. HICKS, JM; EL-NAGGAR, AK; BYERS, RM; FLAITZ, CM; LUNA, MA;  
35 BATSAKIS, JG. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinomas of mayor  
36 salivary glands: a clinicopathologic and flow citometric study. **European**  
37 **Journal of Cancer. Part B, Oral Oncology**, Oxford, New York, v. 30B, p.  
38 329-334, 1994.  
39
- 40 69. HSU, SM; RAINE, L; FANGER, H.– The use of avidin-biotin-peroxidase complex  
41 (ABC) in imonoperoxidase techniques: a comparison between ABC and  
42 unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal Histochemical Cytochemical**  
43 29: 577-580,1981.  
44
- 45 70. INOKI, I; SHIOMI, T; HASHIMOTO, G; ENAMOTO, H; NAKAMURA, H;  
46 MAKINO, K; IKEDA, E; TAKATA, S; KOBAYASHI, K; OKADA, Y.  
47 Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor  
48 (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. **FASEB J** 16:219-221, 2002.  
49

- 1 71. ISHIKAWA, F; MIYAZONO, K; HELLMAN, U; DREXLER, H; et al.  
2 Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-  
3 derived endothelial cell growth factor. **Nature**, 338: 557-562, 1989.
- 4 72. ITO, FA; ITO, K; VARGAS, PA; DE ALMEIDA, OP; LOPES, MA. Salivary  
5 gland tumors in a Brazilian population: a retrospective of 496 cases. **Int J Oral**  
6 **Maxillofac Surg** 34(5): 533-536, 2005.  
7
- 8 73. JOHNSTONE, S; LOGAN, RM. Expression of vascular endothelial growth factor  
9 (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell  
10 Carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 36(3):263-6, 2007.  
11
- 12 74. JONES, A; FUJIYAMA, C; TURNER, K; CRANSTON, D; WILLIAMS, K;  
13 STRATFORD, I; BICKNELL, R; HARRIS, AL. Role of thymidine  
14 phosphorylase in an *in vitro* model of human bladder cancer invasion. **J Urol**  
15 v.167, p.1482-1486, 2002.  
16
- 17 75. KALLUF, GH. **Neoplasias epiteliais de glândulas salivares: Estudo**  
18 **retrospectivo de 732 casos diagnosticados no Instituto Nacional do Câncer**  
19 **(INCA-MS). 2006. Tese (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal de**  
20 **Uberlândia, Uberlândia, 2006.**  
21
- 22 76. KECK, PJ; HAUSER, SD; KRIVI, G; SANZO, K; WARREN, T; FEDER, J;  
23 CONNOLLY, DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen  
24 related to PDGF. **Science**. 246:1309-12, 1989.  
25
- 26 77. KELSCH, RD; BHUIYA, T; FUCHS, A; GENTILI, P; KAHN, MA; FANTASIA,  
27 J.E. Polymorphous low-grade adenocarcinoma. Flow cytometric, p53, and  
28 PCNA analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral**  
29 **Radiology and Oral Endodontics**, St. Louis, v. 84, p. 391-399, 1997.  
30
- 31 78. KIM, KH & SUNG, MW. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck.  
32 **Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery**, New York, v. 120, p.  
33 721-726, 1994.  
34
- 35 79. KIM, KJ; WINER, J; ARMANINI, M; GILLET, N; PHILLIPS, HS; FERRARA,  
36 N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis  
37 suppresses tumour growth *in vivo*. **Nature**. 29;362(6423):841-4, 1993.  
38
- 39 80. KITAZONO, M; TAKEBAYASHI, Y; ISHITSUKA, K; et al., Prevention of  
40 Hypoxia-Induced Apoptosis by the Angiogenic Factor Thymidine  
41 Phosphorylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**  
42 253, 797-803, 1998.  
43
- 44 81. KONNO, S; TAKEBAYASHI, Y; HIGASHIMOTO, M, et al. Thymidine  
45 Phosphorylase expression in gastric carcinoma as a marker for metastasis.  
46 **Anticancer Research**, 23: 5011-5014, 2003.  
47
- 48 82. KOUKOURAKIS, MI; GIATROMANOLAKI, A; KAKPLYRIS,S; et al. Different  
49 pattern of stromal and cancer cell thymidine phosphorylase reactivity in non

- 1 small cell lung cancer. Impact on tumor neoangiogenesis and survival. **Br J**  
2 **Cancer**, 77: 1696-1703, 1998.  
3
- 4 83. KUMAR, S; GHELLAL, A; LI, C; BYRNE, G; HABOUBI, N; WANG, JM;  
5 BUNDRED. Breast carcinoma: Vascular density determined using CD105  
6 antibody correlates with tumor prognosis. **Cancer Res**, 59(4):856-61, 1999.  
7
- 8 84. KUZU, I; BICKNELL, R; HARRIS, AL; JONES, M; GATTER, MC; MASON,  
9 DY. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of  
10 vascular tumours. **J Clinic Pathol**, 45(2):143-8, 1992.  
11
- 12 85. LEUNG, DW; CACHIANES, G; KUANG, WJ; GOEDDEL, DV; FERRARA, N.  
13 Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**.  
14 8; 246:1306-9, 1989.  
15
- 16 86. LI, C; HAMPSON, LN; HAMPSON, L; KUMAR, P; BERNABÉU, C; KUMAR,  
17 S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor  $\beta$ 1  
18 on the human vascular endothelial cells. **FASEB**. 14:55-64, 2000.  
19
- 20 87. LI, CG; GUO, B; BERNABEU, C; KUMAR, S. Angiogenesis in breast cancer: the  
21 tole of transforming growth factor h and CD105. **Microsc Res Tech**, 52:437-  
22 449, 2001.  
23
- 24 88. LI, Z; TANG, P; XU, Z. Clinico-pathological significance of microvessel density  
25 and vascular endothelial growth factor expression in adenoid cystic carcinoma  
26 of salivary glands. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**. 36(3):212-214,  
27 2001.  
28
- 29 89. LIM, JJ; KANG, S; LEE, MR; PAI, KH; YOON, HJ; LEE, JI; HONG, SP; LIM,  
30 CY. Expression of vascular endothelial growth factor is salivary gland  
31 carcinomas and its relation to p53, ki67 and prognosis. **J Oral Pathol Med**,  
32 32(9):552-561, 2003.  
33
- 34 90. LINDENMAYER, AE; MIETTINEN, M. Immunophenotypic features of uterine  
35 stromal cells. CD34 expression in endocervical stroma. **Virchows Arch**,  
36 426(5):457-60, 1995.  
37
- 38 91. LINDERHOLM, B; TAVELIN, B; GRANKVIST, K; HENRIKSSON, R. Vascular  
39 endothelial growth factor is of high prognostic value in node negative breast  
40 carcinoma. **J Clin Oncol**, 16(9):3121-8, 1998.  
41
- 42 92. LIOTTA, LA; STEEG, PS; STETLER-STEVENSON, WG. Cancer metastasis and  
43 angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v.64, p.  
44 327-336, 1991.  
45
- 46 93. LOYOLA, A. M. **Carcinoma Mucoepidermóide de glândulas salivares**  
47 **menores: Estudo clínico, histológico e imuno-histoquímico**. 1996. p.99.  
48 Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo,  
49 1996.  
50

- 1 94. LOYOLA, AM; ARAUJO, VC; SOUZA, S.º; ARAUJO, NS. Minor salivary gland  
2 tumours. A restropective study of 164 cases in a Brazilian population. **Eur**  
3 **Journal Cancer B Oral Oncology**. 31B: 197-201, 1995.  
4
- 5 95. LUCARINI, JW; SCIUBBA, JJ; KHETTRY, U, NASSER, I. Terminal duct  
6 carcinoma: recognition of a low grade adenocarcinoma of minor salivary  
7 glands. **Archives Otolaryngol Head and Neck Surgery**, Chicago, v. 120, p.  
8 1010-1015, 1994.  
9
- 10 96. MACIEJEWSKI, A; SZYMCZYK, C; WIERZGÓN. Outcome of surgery for  
11 adenoid cystic carcinoma of head and neck region. **Journal of Cranio-**  
12 **Maxillofacial Surgery**, Stuttgart ; New York, v. 30, p. 59-61, 2002.  
13
- 14 97. MAEDA, K; CHUNG, Y-S; TAKATSUKA, S, et al. Tumor angiogenesis and  
15 tumor cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **Br J**  
16 **Cancer**, 72:319-23, 1995.  
17
- 18 98. MAEDA, K; CHUNG, YS; OGAWA, Y; TAKATSUKA, S; KANG, SM;  
19 OGAWA, M; SAWADA, T; SOWA, M. Prognostic value of vascular  
20 endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. **Cancer**. 77(5):858-  
21 63, 1996.  
22
- 23 99. MAEDA, T; MATSUMURA, S; HIRANUMA, H; JIKKO A, FURUKAWA S,  
24 ISHIDA T, FUCHIHATA H. Expression of vascular endothelial growth factor  
25 in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour  
26 progression and p53 gene status. **J Clin Pathol**. 51:771-5, 1998.  
27
- 28 100. MAEDA, K; KANG, SM; OGAWA, M; ONODA, N; KATO, Y; SAWADA, T;  
29 CHUNG, KH. Vascular endothelial growth factor expression in preoperative  
30 biopsy specimens correlates with disease recurrence in patients with early  
31 gastric carcinoma. **Cancer**. 15;86(4):566-71, 1999.  
32
- 33 101. MAHARAJ, ASR; SAINT-GENIEZ, M; MALDONADO,AE; D'AMORE, PA.  
34 Vascular Endothelial Growth Factor localization in the adult. **American**  
35 **Journal of Pathology**, 168 (2), 639-648,2006.MARTIN, L; GREEN, B;  
36 RENSHAW, C; LOWE, D; RUDLAND, P; LEINSTER, SJ. sessment in  
37 invasive breast cancer. **Br. J. Cancer**, 76: 1046–1054, 1997.  
38
- 39 102. MASSAGUÉ, J. Identification of receptors for type  $\beta$  transforming growth factor.  
40 **Methods Enzymol** 146:174-95, 1987.  
41
- 42 103. MERCANTE, G, MAKEIEFF, M; GUERRIER, B. Recurrent benign tumors of  
43 parotid gland: the role of the surgery. **Acta Otorhino-laryngologica Italica**,  
44 Pisa, v. 22(2), p. 80-85, 2002.  
45
- 46 104. MILLER, DW; GRAULICH, W; KARGES, B; STAHL, S; ERNST, M;  
47 RAMASWAMY, A; SEDLACEK, HH; MULLER, R; ADAMKIEWICZ, J.  
48 Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor  
49 complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. **Int J Cancer**.  
50 81:568-72, 1999.

- 1  
2 105. INEO, TC; AMBROGI, V; BALDI, A; et al. Prognostic impact of VEGF, CD31,  
3 CD34, and CD105 expression and tumor vessel invasion after radical surgery  
4 for IB-IIa non-small cell lung cancer. **J Clin Pathol**, 57: 591-597, 2004.  
5  
6 106. MINHAJAT, R; MORI, D; YAMASAKI, F; SUGITA, Y; SATOH, T;  
7 TOKUNAGA, O. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the  
8 angiogenesis of human cancers. **Pathol Int**. 56(12):717-23, 2006.  
9  
10 107. MIYAZONO, K; OKABE, T; URABE, A, et al. Purification and properties of an  
11 endothelial cell growth factor from human platelets. **J Biol Chem**, 262, p.4098-  
12 103, 1987.  
13  
14 108. MIYAZONO, K; TAKAKU, F. Platelet-derived endothelial cell growth factor:  
15 structure and function. **Jpn Circ J** v.55, p.1022-1026, 1991.  
16  
17 109. MOGHADDAM, A; ZHANG, HT; FAN, TP; HU, DE; LEES, VC;URLEY, H;  
18 FOX, SB; GATTER, KC; HARRIS, AL; BICKNELL, R. Thymidine  
19 phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. **Proc Natl Acad Sci**  
20 **U S A** v.92, p.998-1002, 1995.  
21  
22 110. MORIYAMA, M; KUMAGAI, S; KAWASHIRI, KOJIMA, K; KAKIHARA, K;  
23 YAMAMOTO, E. Immunohistochemical study of tumor angiogenesis in Oral  
24 Squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, 33(5), 369-374, 1997.  
25  
26 111. NAKAYAMA, H; NARUSE, K; MIYAZAKI, E; HIROI, M; KIYOKU, H;  
27 KURODA, N; ENZAN, H. The specific distribution of dendritic interstitial  
28 cells at tumor border of major salivary gland pleomorphic adenomas. **Modern**  
29 **Pathology**, 445-449, 1999.  
30  
31 112. NARDONE, M; FERRARA, G; NAPPI, O; DI MARIA, D; VILLARI, G.  
32 Pleomorphic adenoma in unusual anatomic sites: case reports and review of  
33 literature. **Acta Otorhino-laryngologica Italica**, Pisa, v. 22(3), p. 158-63,  
34 2002.  
35  
36 113. NASCIMENTO, AG; AMARAL, LP; PARADO, LA; KLIGERMAN, J;  
37 SILVEIRA, TR. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: a  
38 clinicopathologic study of 46 cases. **Head Neck Surgery**. 8: 409-417; 1986a.  
39  
40 114. NASCIMENTO AG, AMARAL ALP, PRADO LAF, KLIGERMAN J, SILVEIRA  
41 TRP. Adenoid cystic carcinoma of salivary glands: a study of 61 cases with  
42 clinicopathologic correlation. **Cancer**. 57:312-9, 1986b.  
43  
44 115. NIKITEAS, NI; TZANAKIS, N; THEODOROPOULOS, G et al. Vascular  
45 endothelial growth factor and endoglin (CD105) in gastric cancer. **Gastric**  
46 **Cancer** 10: 12-17, 2007.  
47  
48 116. NIKOLLOF, BJ. The human progenitor cell antigen ( CD34 ) is localized on  
49 endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-

- 1 fixed normal skin and on proliferation endothelial cells and stromal spindle  
2 cells in Kaposi's sarcoma. **Arch Dermatol**, v.127, p. 523-9, 1991.  
3
- 4 117. NISHIDA, M; ITINO, A; MORI, K; et al. Preparation of anti-tumor thymidine  
5 phosphorylase monoclonal antibody useful for detecting the enzymes levels in  
6 tumor tissues. **Biol Pharm Bull**, 19:1407-1411, 1996.  
7
- 8 118. OBEMAIR, A; WASICKY, R; KAIDER, A; PREYER, O; LOSCH, A;  
9 LEODOLTER, S; KOLBL, H. Prognostic significance of tumor angiogenesis in  
10 epithelial ovarian cancer. **Cancer Lett**. 138:175-82, 1999.  
11
- 12 119. OKABE, M; INAGAKI, H; MURASE, T; INOUE, M; NAGAI, N; EIMOTO, T.  
13 Prognostic significance of p27 and ki-67 expression in mucoepidermoid  
14 carcinoma of the intraoral minor salivary gland. **Modern Pathology: an**  
15 **Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc,**  
16 **Baltimore**, v. 14, p. 1008-1014, 2001.  
17
- 18 120. PAGE, D, and JENSEN, R. Angiogenesis in human breast carcinoma; what is the  
19 question? **Hum. Pathol.**, 26: 1173–1174, 1995.  
20
- 21 121. PIRES, FR. **Estudo Imuno-Histoquímico e Análise multivariada de fatores**  
22 **prognósticos de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares.**  
23 2002. 99 f. Tese (Doutorado em Estomatopatologia). Universidade Estadual de  
24 Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2002.  
25
- 26 122. POGODZINSKI, MS; SABRI, AN; LEWIS, JE; OLSEN, KD. Retrospective study  
27 and review of polymorphous low-grade adenocarcinoma. **Laryngoscope**.  
28 116(12):2145-9, 2006.  
29
- 30 123. RITLAND, F; LUBENSKY, I; LIVOLSI, V. Polymorphous low-grade  
31 adenocarcinoma of the parotid salivary gland. **Archives of pathology and**  
32 **laboratory medicine**, Chicago, v. 17, p. 1261-63, 1993.  
33
- 34 124. ROBERTS, AB; SPORN, MB; ASSOIAN, RK; SMITH, JM; ROCHE, NS;  
35 WAKEFIELD, LM, et al. Transforming growth factor type  $\beta$ : rapid induction  
36 of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in*  
37 *vitro*. **Proc Natl Acad Sci USA** 83: 4167-71, 1986.  
38
- 39 125. ROMANI, AA; BORGHETTI, AF; DEL; RIO, P; SIANESI, M; SOLIANI, P. The  
40 risk of developing metastatic disease in colorectal cancer is related to CD105-  
41 positive vessel count. **J Surg Oncol**. 1;93(6):446-55, 2006.  
42
- 43 126. RUDDON, RW. **Cancer Biology**, 4<sup>o</sup> ed. University of Michigan, 2007.  
44
- 45 127. RYU, SY; OKA, K; TSUJII, H; SUZUKI, Y; NAKANO, T. Platelet-derived  
46 endothelial cell growth factor as a prognostic factor for radiotherapy outcome in  
47 patients with adenocarcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol**. 89: 414-9,  
48 2003.  
49

- 1 128. SAAD, RS; JASNOSZ, KM; TUNG; MT; SILVERMAN, JF. Endoglin (CD105)  
2 expression in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Pathol.** 22:248-253, 2003.  
3
- 4 129. SALEH, M; STACKER, SA; WILKS, AF. Inhibition of growth of C6 glioma cells  
5 *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence.  
6 **Cancer Res**, 15, 56(2): 393-401, 1996  
7
- 8 130. SANCHEZ-ELSNER, T; BOTELLA, LM; VELASCO, B; LANGA, C;  
9 BERNABEU, C. Endoglin expression is regulated by transcriptional  
10 cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta  
11 pathways. **J Biol Chem.** 15;277(46):43799-808, 2002.  
12
- 13 131. SAUTER, ER; NESBIT, M; WATSON, JC; KLEIN-SZANTO, A; LITWIN, S;  
14 HERLYN, M. .Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor  
15 invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck.  
16 **Clin Cancer Res.** 5:775-82, 1999.  
17
- 18 132. SCHIMMING, R; MARMÉ, D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell  
19 carcinoma of the oral cavity. **Head Neck.** 24: 151-156, 2002.  
20
- 21 133. SEIFERT, G; SOBIN, LH. Histological typing of salivary gland tumors. 2 ed.  
22 Berlin: Springer-Verlag, Geneva : **World Health Organization**, 1991. 112 p.  
23 (International Histological Classification of tumours ).  
24
- 25 134. SENGER, DR; PERRUZZI, CA; FEDER, J; DVORAK, HF. A highly conserved  
26 vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor  
27 cell lines. **Cancer Res.** 46:5629-32, 1986.  
28
- 29 135. SENGUPTA, S; SELLERS, LA; MATHESON, HB; FAN, TP. Thymidine  
30 phosphorylase induces angiogenesis *in vivo* and *in vitro*: an evaluation of  
31 possible mechanisms. **Br J Pharmacol** v.139, p.219-231, 2003.  
32
- 33 136. SHARMA, C; SHARMA, MC; SARKAR, C. Morphology of angiogenesis in human  
34 cancer: a conceptual overview, histoprognotic perspective and significance of  
35 neoangiogenesis. **Histopathology**,46,481-489, 2005.  
36
- 37 137. SHI, L; CHEN, XM; WANG, L; ZHANG, L; CHEN, Z. Expression of caveolin-1  
38 in mucoepideroid carcinoma of the salivary glands: Correlation with vascular  
39 endothelial growth factor, microvessel density, and clinical outcome. **Cancer**,  
40 109(8): 1523-1531, 2007.  
41
- 42 138. SHIH, CH; OZAWA, S; ANDO, N; UEDA, M; KITAJIMA, M. Vascular  
43 endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node  
44 metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Clin Cancer Res.**  
45 6:1161-8, 2000.  
46
- 47 139. SIEGEL, S. **Estatística não - paramétrica, para as ciências do comportamento.**  
48 Ed. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo, 1975, 350 p.  
49

- 1 140. SOMA, L; LIVOLSI, VA; BALOCH, ZW. Dendritic Interstitial and  
2 Myofibroblastic Cells at the border of salivary gland tumors. **Archives**  
3 **of Pathology & Laboratory Medicine**, 125: 232-236, 2001.  
4
- 5 141. SOINI, Y. et al. Low p53 protein expression in salivary gland tumors compared  
6 with lung carcinomas. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 421, n.  
7 5, p. 415-20, 1992.  
8
- 9 142. SOUZA, KCN; FARIA, PR; CARDOSO, SV; LAURIA-DIB, L; CANDEROLI, I;  
10 LOYOLA, A. Expressão imuno-histoquímica de p53 na discriminação do  
11 comportamento biológico dos tumores de glândulas salivares. **J Bras Patol**  
12 **Med Lab**, 41: 189-195, 2005.  
13
- 14 143. SOUZA, KCN; FARIA, PR; AGUIAR, MC; CARDOSO, SV; CHENG, J;  
15 LAURIA-DIB, L; LOYOLA, A. Immunohistochemical localization of the  
16 NM23 protein in salivary gland neoplasms with distinct biological behavior.  
17 **Virchows Arch**, v. 449, p.660-666, 2006.  
18
- 19 144. SPEIGHT, PM; BARRETT, AW. Salivary gland tumours. **Oral Dis**. 8(2) 229-240,  
20 2002.  
21
- 22 145. SPIRO, RH & HUVOS, AG. Stage means more than grade in adenoid cystic  
23 carcinoma. **American Journal Surgery**, New York, v. 164, p. 623-628, 1992.  
24
- 25 146. SPIRO, RH; HUVOS, AG; STRONG, EW. Mucoepidermoid carcinoma of salivary  
26 gland origin: a clinicopathologic study of 367 cases. **American Journal**  
27 **Surgery**, New York, v. 136, p. 461-468, 1978.  
28
- 29 147. SRIVASTAVA, A; LAIDLER, P; DAVIES, R; HORGAN, K; HUGHES, LE. The  
30 prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76 –  
31 4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histological study. **Am. J.**  
32 **Pathol.**, 133: 419 – 423, 1988.  
33
- 34 148. SUMIZAWA, T; FURUKAWA, T; HARAGUCHI, M; YOSHIMURA, A;  
35 TAKEYASU, A; ISHIZAWA, M; YAMADA, Y; AKIYAMA, S. Thymidine  
36 phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth  
37 factor. **J Biochem** v.114, p.9-14, 1993.  
38
- 39 149. SUZUKI, M; ICHIMIYA, I; MATSUSHITA, F; MOGI, G. Histological features  
40 and prognosis of patients with mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland.  
41 **Journal Laryngol Otol**: 112: 944-947; 1998.  
42
- 43 150. SWELAN, W; IDA-YONEMOCHI; MARUYAMA, S; OHSHIRO, K; CHENG, J;  
44 SAKU, T. Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic  
45 adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. **Virchows**  
46 **Arch** 446: 653-662, 2005.  
47
- 48 151. TAE, K; EL-NAGGAR, A; YOO, E; et al. Expression of vascular endothelial  
49 growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. **Clinical**  
50 **Cancer Research**, 6: 2821-2828, 2000.

- 1  
2 152. TAKAHASHI, M; OGURA, K; MAEDA, S; MORI, K; MAFUNE, K;  
3 MIKAMI, Y; TERANO, A.; OMATA, M. Promoters of epithelialization induce  
4 expression of vascular endothelial growth factor in human gastric epithelial  
5 cells in primary culture. **FEBS Lett.** 24;418(1-2):115-8, 1997.  
6
- 7 153. TAKEBAYASHI, Y; YAMADA, K; MIYADERA, K; SUMIZAWA, T;  
8 FURUKAWA, T; KINOSHITA, F; AOKI, D; OKUMURA, H; YAMADA, Y;  
9 AKIYAMA, S; AIKOU, T. The activity and expression of thymidine  
10 phosphorylase in human solid tumours. **Eur J Cancer** v.32A, p.1227-2132,  
11 1996.  
12
- 13 154. TANIGAWA, N; AMAYA, H; MATSUMURA, M, et al. Association of tumour  
14 vasculature with tumor progression and overall survival of patients with non-  
15 early gastric carcinomas. **Br J Cancer.** 75: 566-571, 1997.  
16
- 17 155. TANIGAWA, N; AMAYA, H; MATSUMURA, M, et al. Extent of tumor  
18 vascularization correlates with prognosis and hematogeneous metastasis in  
19 gastric carcinomas. **Cancer Res**, 56: 2671-6, 1996.  
20
- 21 156. TOI, M ; ATIQR RAHMAN, M ; BANDO, H ; CHOW, LW. Thymidine  
22 phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer  
23 biology and treatment. **Lancet Oncol.** 6(3):158-66, 2005.  
24
- 25 157. TOKUNAGA, Y; HOSOGI, H; HOPPOU, T; NAKAGAMI, M; TOKUKA, A;  
26 OHSUMI, K. Prognostic value of thymidine phosphorylase/platelet-derived  
27 endothelial cell growth factor in advanced colorectal cancer after surgery:  
28 evaluation with a new monoclonal antibody. **Surgery.** 131(5):541-7, 2002.  
29
- 30 158. TSUJITANI, S; SAITO, H; MAETA, Y; et al. Neoangiogenesis in Patients with  
31 gastric carcinoma in relation to the expression of vascular endothelial growth  
32 factor and Thymidine phosphorylase. **Anticancer Research** 24: 1853-1859,  
33 2004.  
34
- 35 159. UEDA, M; TERAJ, Y; KUMAGAI, K; UEKI, K; OKAMOTO, Y; UEKI, M.  
36 Correlation between tumor angiogenesis and expression of thymidine  
37 phosphorylase, and patient outcome in uterine cervical carcinoma. **Hum**  
38 **Pathol.** , 30(11):1389-94, 1999.  
39
- 40 160. USUKI, K; SARAS, J; WALTENBERGER, J; MIYAZONO, K; PIERCE, G;  
41 THOMASON, A; HELDIN, C.H. Platelet-derived endothelial cell growth  
42 factor has thymidine phosphorylase activity. **Biochem Biophys Res Commun**  
43 v.184, p.1311-1316, 1992.  
44
- 45 161. UZZAN, B; NICOLAS, P; CUCHERAT, M; PERRET, G-Y. Microvessel density  
46 as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the  
47 literature and meta-analyses. **Cancer research** 64, 2941-2955, 2004.  
48
- 49 162. VAN DE RIJN, M; ROUSE, RV. CD34, a review. **Appl Immunohistochem.**, 2:71-  
50 84, 1994.

- 1  
2 163. VERMEULEN PB, GASPARINI G, FOX, SB, COLPAERT LP, MARSON LP,  
3 GION M, BELIEN JAM, WAAL RM, VAN MARCK E, MAGNANI E,  
4 WEIDNER N, HARRIS AL, DIRIX. Second international consensus on the  
5 methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid  
6 human tumors. *European Journal of Cancer* 38: 1564-1579, 2002.  
7  
8 164. WEIDNER, N; HARRIS, AL; DIRIX. Second international consensus on the  
9 methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid  
10 human tumors. **European Journal of Cancer** 38: 1564-1579, 2002.  
11  
12 165. VINCENT, SD; HAMMOND, HL; FINKELSTAIN, MW. Clinical and therapeutic  
13 features of polymorphous low-grade adenocarcinoma. **Oral Surgery, Oral**  
14 **Medicine, Oral Pathology**, St. Louis, v. 77, p. 41-47, 1994.  
15  
16 166. VORAVUD, N; CHARURUK, N. Tumor angiogenesis. **J Med Assoc Thai** v. 82,  
17 p.394-404, 1999.  
18  
19 167. WEIDNER, N; SEMPLE, JP; WELCH, WR; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis  
20 and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Med**,  
21 324:1-8, 1991.  
22  
23 168. WEIDNER N, FOLKMAN J, POZZA F, BEVILACQUA P, ALLRED EN,  
24 MOORE DH, MELI S, GASPARINI G. Tumor angiogenesis: a new significant  
25 and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. **J Natl**  
26 **Cancer Inst.** 84:1875-87, 1992.  
27  
28 169. WEISS, S; NICKOLOFF, B. CD34 is expressed by a distinctive cell population in  
29 peripheral nerve sheath tumors, and related lesions. **Am J Surg Pathol**, v.17, p.  
30 1039-45, 1993.  
31  
32 170. WITTEN, J; HYBERT, F; HANSEN, HS. Treatment of malignant tumours of  
33 parotid glands. **Cancer**, New York, v. 65, p. 2515-2520, 1990.  
34  
35 171. XU, H; SHIMIZU, Y; NIKI, T; NAGASAKA, H; KAWAMURA, H; OOYA, K.  
36 Pleomorphic adenoma of the submandibular salivary glands ith marked  
37 ossificatio. **J Oral Pathol Med** 32:499-501, 2003.  
38  
39 172. YAMAMOTO, A; DHAR, KD; EL-ASSAL, ON, et al. Thymidine phosphorylase  
40 (platelet-derived endothelial cell growth factor), microvessel density, and  
41 clinical outcome in hepatocelular carcinoma. **Journal of Hepatology**. 29: 290-  
42 299, 1998.  
43  
44 173. YANCOPOULOS, GD. Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267:10931-10934, 1992.  
45  
46 174. YU, F; JIANG, XZ; CHEN, WT; ZHAO, YF; ZHOU, XJ. Microvessel density and  
47 expression of vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of  
48 salivary gland. **Shangai Kou Qiang Yi Xue**, 12(6):443-446, 2003. Artigo em  
49 chinês.  
50

- 1 175. YUAN, F; et al. Time dependent vascular regression and permeability changes in  
2 established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial  
3 growth factor/vascular permeability factor antibody. **Proc Natl Acad Sci, USA**,  
4 93: 14765-14770, 1996.  
5
- 6 176. ZHANG, J; PENG, B; CHEN, X. Expressions of Nuclear Factor  $\kappa$ B, Inductible  
7 Nitric Oxide Synthase, and Vascular Endothelial Growth Factor in Adenoid  
8 Cystic Carcinoma of Salivary Glands: Correlations with the Angiogenesis and  
9 Clinical Outcome. **Clinical Cancer Res** 11(20): 7334-7343, 2005.  
10

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

## **ANEXOS**



# 1 ANEXO 1

2

3 **Tabela 1 - Distribuição dos casos excluídos do presente estudo, segundo os tipos histológicos e os**  
4 **diferentes motivos alegados para sua exclusão.**

FATORES DE EXCLUSÃO	CASOS EXCLUÍDOS (N) <sup>1</sup>		
	CME	CAC	APBGM
Casos recidivantes	24	25	3
Ausência de dados no prontuário	1	1	-
Ausência de tumor no bloco	2	-	2
Revisão de lâmina	4	4	3
Casos tratados fora do INCA	-	1	3
Ausência de blocos	4	6	-
Casos anteriores a 1998	13	13	2
Alteração no diagnóstico histopatológico	8 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
Tratamento radioterápico exclusivo	2	5	-
Recusou tratamento no INCA	1	2	-
Material autolisado	-	1	1
<b>Total de casos excluídos (N)<sup>1</sup></b>	<b>59</b>	<b>68</b>	<b>24</b>

5

1 – Número de casos;

6

2- Mudança de diagnóstico para: Adenocarcinoma (3 casos), Carcinoma de ductos salivares (2 casos), Carcinoma Ex-Adenoma Pleomórfico (2 casos), e Carcinoma epidermóide (1 caso);

7

8

3- Mudança de diagnóstico para: Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (5 casos), Carcinoma de ductos salivares (3 casos), Adenocarcinoma de células basais (1 caso), Carcinoma Ex –Adenoma pleomórfico (1 caso);

9

10

4- Mudança de diagnóstico para: 4 Carcinoma adenóide cístico, 4 Adenocarcinoma, 2 Carcinoma de Ductos salivares

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

## ANEXO 2

**TABELA 2 - Distribuição de todos casos de neoplasias de glândulas salivares classificadas segundo o tipo histológico e a presença ou não de metástases pelo Instituto Nacional do Câncer encontrados no período de 1998 a 2003.**

Neoplasia	Primários não metastatizantes	Primários metastatizantes <sup>1</sup>	Total de casos <sup>2</sup>
AP	308	–	308
APBG	30	5	35
CME	89	10	99
CAC	83	29	112
<b>TOTAL</b>	509	44	554

<sup>1</sup> - Consideram-se metastatizantes primários as lesões das quais as metástases se originaram.

<sup>2</sup> - O número total de casos compreende as lesões primárias e metastatizantes.

AP – adenoma pleomórfico; APBG – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CME – carcinoma mucoepidermóide; CAC – carcinoma adenóide cístico

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

### **ANEXO 3**

1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro/RJ.