

**Vanessa de Fátima
Bernardes**

**Faculdade de Odontologia
UFMG**

2007

VANESSA DE FÁTIMA BERNARDES

***CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE DE
GLÂNDULAS SALIVARES:
CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS
E IMUNOEXPRESSÃO DE C-ERBB-2***

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2007**

VANESSA DE FÁTIMA BERNARDES

**Carcinoma mucoepidermóide de glândulas
salivares: características clinicopatológicas e
imunexpressão de c-erbB-2**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-
graduação da Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia
Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Belo Horizonte/MG
Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Minas Gerais
2007

B522c

2008

T

Bernardes, Vanessa de Fátima

Carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares: características clinicopatológicas e imunoexpressão de c-erbB2 / Vanessa de Fátima Bernardes, 2007

94 fls.:il.

Orientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia

1. Carcinoma mucoepidermóide – Teses. I. Aguiar, Maria Cássia Ferreira de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia. III. Título

BLACK D047

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo, tudo, tudo...

À minha querida mãe, ao meu adorado pai, sem palavras para tanto amor...

Cezar! Preciso mesmo dizer?! Também sem palavras!!!

A Dinha, Carlos, Lara, tia Heloisa, tio Celso, Cláudia, Kiko e Marli, tias e tios “todos”, primas “todas” (Luci e Vi em especial), primos “todos” (Marquinhos!) e sobrinhos queridos (Laís, Lanner e Jader). À amiga Jalile, quem deu a primeira “luz”, à amiga Cláudia, sempre presente... ao “super amigo” Matheus... Nadir, Tião, Aninha, Fael, Uan e equipe “Delícias Vó Jovina”.... Vocês todos são um “tesouro” muito especial!

À minha grande mestra, amiga, companheira, orientadora, professora, Maria Cássia! Mais do que um objetivo, você me ajudou a realizar um sonho! Você é a maior responsável por esta conquista!

Ao querido amigo e professor Sérgio Vitorino, pelos primeiros e infinitos ensinamentos e grande companhia! Impossível descrever minha gratidão!

À professora e amiga Maria Auxiliadora, que muito me ensinou Patologia e, muito mais: lições de vida! E ainda ensinará por muito tempo, com certeza!

Ao professor Ricardo Mesquita, companheiro e sempre por perto! Muito obrigada!

Às minhas grandes amigas, Aline, Anacélia e Eliza! Quanto tempo juntas!!! E que tempo agradável e produtivo!!! Vocês são muito, muito, muito especiais!

À minha grande amiga e companheira de muitas horas, Carol!

Às amigas Linaena, Mariela e Soraya, pouco tempo para conviver, mas muito queridas!

Às amigas Bruna, Giovanna, Juliana e Patrícia! Horas e horas...!

Aos amigos e “vizinhos”, André, Flávio, Jeane e ao “antigo” amigo Flávio Farias

Ao professor Ricardo Gomez e às professoras Tarcília e Leticia, imagens de muita dedicação!

Aos demais professores, muitos são eles! Seria uma lista enorme! Muito obrigada!

Aos colegas e amigos de laboratório, Inês, Heloisa, Márcio e Carolina. Sempre dispostos a fazer o que for possível (às vezes, o impossível também!).

Aos ex-professores, mas sempre “mestres”, Adair, Alessandro, Andréia, Jefferson (*sempre na memória*), Lígia, Márcio, Mônica, Natanael, Patrícia, Viator.

*" Quem teve a idéia de cortar o tempo em fatias, a que se deu o nome de ano, foi um indivíduo genial. Industrializou a esperança, fazendo-a funcionar no limite da exaustão. Doze meses dão para qualquer ser humano se cansar e entregar os pontos. Aí entra o milagre da renovação e tudo começa outra vez, com outro número e outra vontade de acreditar que daqui para diante, vai ser diferente" (e ainda melhor!)
(Carlos Drummond de Andrade)*

PREFÁCIO

Esta dissertação de Mestrado foi elaborada a partir de uma pesquisa desenvolvida no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, num período de 20 meses, coordenada pela Prof^a. Dr^a. Maria Cássia Ferreira de Aguiar. Este trabalho foi editado na forma de uma compilação de dados através de artigos científicos e está dividido nas seguintes partes:

- Resumo e *Abstract*
- Introdução breve e objetiva, abordando os dados mais relevantes descritos na literatura
- Justificativa
- Objetivos (geral e específicos), evidenciando os pontos a serem estudados
- Metodologia, onde são descritos os processos de obtenção de dados e formas de análise destes
- Resultados, incluindo dois artigos, onde são expostos os resultados obtidos e os artigos elaborados a partir destes
- Considerações finais, ressaltando os pontos mais relevantes e interessantes para discussão
- Conclusões feitas a partir dos resultados obtidos
- Referências bibliográficas

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid sodium</i> (ácido etileno diamino tetracético sal dissódico)
µm	Micrometro (ou micrômetro)
bcl-2	Proteína / proto-oncogene
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (soro albumina bovina, albumina sérica bovina)
CA	<i>California</i>
CAC	Carcinoma adenóide cístico
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i> (antígeno carcinoembrionário)
c-erbB-2 (HER-2, HER-2/neu)	Proteína / proto-oncogene
CISH	<i>Chromogenic in situ hybridization</i> (Hibridização cromogênica <i>in situ</i>)
cm	<i>Centimeter</i> (centímetro)
CME	Carcinoma mucoepidermóide
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COEP-UFMG	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

DAB	<i>Diaminobenzidine</i> (diaminobenzidina)
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
EUA	Estados Unidos da América
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Fem	<i>Feminine</i> (feminino)
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (Hibridização <i>in situ</i> fluorescente)
HE	<i>Hematoxylin-eosin</i> (hematoxilina-eosina)
HPF	<i>High-power fields</i> (campos de maior aumento)
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
kDa	Kilodalton
Ki-67	Marcador de proliferação celular
LSAB®+System HRP	<i>Labelled streptavidin biotin + streptavidin</i> (sistema de detecção imunoistoquímica)
Masc	<i>Masculine</i> (masculino)
MEC	<i>Mucoepidermoid carcinoma</i>
mm	<i>Milimeter</i> (milímetro)
NCL-CB11	Anticorpo monoclonal de camundongo
p53	Proteína / gene supressor tumoral
PAS	<i>Periodic acid Schiff</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (Antígeno nuclear de proliferação celular)
SMEC	<i>Sclerosing mucoepidermoid carcinoma</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

TNM	Sistema de estadiamento (tamanho da lesão, envolvimento linfonodal, metástase)
TRIS-HCL	Hidroximetil amino metano - ácido clorídrico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento endotelial vascular)

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1- Sistema de estadiamento para carcinoma de glândula salivar maior proposto por <i>American Joint Committee on Câncer</i>	18
Quadro 2 - Elaboração do estadiamento clínico TNM para carcinoma de glândula salivar maior proposto por <i>American Joint Committee on Câncer</i>	19
Quadro 3 - Características e pontos utilizados no sistema de gradação para carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares proposto por Auclair et al. (1992)	20
Quadro 4 - Características e pontos utilizados no sistema de gradação para carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares proposto por Brandwein et al. (2001)	20
Quadro 5 - Avaliação do padrão de marcação imunoistoquímica da proteína c-erbB-2 segundo recomendações do kit HercepTest™	35
Quadro 6 - Dados clinicopatológicos do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares	39

LISTA DE TABELAS

	Página
Table 1 - Artigo 1 - Clinicopathological features of mucoepidermoid carcinoma of salivary glands	60
Table I - Artigo 2 - Reported cases in previous literature regarding the sclerosing mucoepidermoid carcinoma of salivary glands	72

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figure 1 - Artigo 1	57
Figure 1 - Artigo 2	70

RESUMO

Carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares: características clinicopatológicas e imunexpressão de c-erbB-2

Neoplasias de glândulas salivares são raras e diversificadas morfológicamente, sendo raros os trabalhos voltados para a avaliação de um único tipo histológico. O carcinoma mucoepidermóide representa a neoplasia maligna mais freqüente de glândulas salivares e apresenta diferentes padrões histopatológicos relacionados ao seu comportamento. Expressão da proteína c-erbB-2 já foi observada em alguns tipos de neoplasias de glândula salivar e, apesar de se propor para estas lesões uma possível aplicação do c-erbB-2 como fator prognóstico, sua relação com características clinicopatológicas apresenta resultados controversos. Este estudo retrospectivo propôs-se a avaliar características clinicopatológicas do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares e sua relação com a expressão imunistoquímica da proteína c-erbB-2. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (345/05). Foram identificados 40 casos de carcinoma mucoepidermóide no Arquivo do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram selecionados para o estudo 32 casos. Observou-se prevalência no sexo feminino, correspondendo a 78,1%, idade de maior ocorrência entre 21 e 40 anos (46,9%), e o palato apresentou-se como o local mais acometido (65,6%). O baixo grau histológico de malignidade compreendeu 93,8%. A expressão de c-erbB-2 foi considerada negativa em 68,8% dos casos. Os dados foram submetidos ao teste qui-quadrado, utilizando-se o programa SPSS 12.0, adotando-se o nível de significância $p < 0,05$. Nenhuma associação significativa foi observada entre a expressão de c-erbB-2 e sexo e idade do paciente, localização e grau de malignidade da lesão. Na amostra avaliada, a expressão de c-erbB-2 não foi associada às características clinicopatológicas do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares.

Unitermos: carcinoma mucoepidermóide, proteína c-erbB-2, neoplasia das glândulas salivares

ABSTRACT

Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: clinicopathological features and immunoexpression of c-erbB-2

Salivary glands tumors are rare and morphologically diversified, so, there are few papers about only one histologic type. Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant neoplasm of major and minor salivary glands. The histological appearance of MEC is diversified and is correlated with the biological behavior of the tumor. Oncogene c-erbB-2 presents amplification in various neoplasms. The protein expression is observed in glandular neoplasms although the association with clinicopathological features is controversial. This study evaluated clinicopathological features of intraoral mucoepidermoid carcinoma and the association with immunohistochemical expression of c-erbB-2. The protocol was approved by the Committee of Bioethics in Research (345/05). There were 40 cases of mucoepidermoid carcinoma in Laboratory of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais and 32 cases were selected for the study. It was observed prevalence in female gender (78,1%), and tumors were more frequent in the age between 21 and 40 years (46,9%). The palate was the most common site affected (65,6%). Microscopically, 30 cases (93,8%) were classified as low grade of malignancy. The c-erbB-2 expression was considered negative in 22 (68,8%) cases. Chi-square test was performed using SPSS program. There were no significant differences ($p > 0,05$) among protein expression and gender and age of patient and site and histological grade of the lesion. In the appraised sample, c-erbB-2 expression was not associated with clinicopathological features of mucoepidermoid carcinoma of salivary glands.

Uniterms: mucoepidermoid carcinoma, c-erbB-2 protein, salivary gland neoplasms



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Dissertação intitulada "**Carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares: características clinicopatológicas e imunexpressão de c-erbB-2**", área de concentração em Patologia Bucal, apresentada pela candidata **Vanessa de Fátima Bernardes**, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Orientadora – FO-UFMG

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo
FO-UFMG

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
FO-UFU

Prof. Dr. Saul Martins de Paiva
Coordenador *pro tempore* do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 09 de fevereiro de 2007.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Belo Horizonte - MG - 31.270-901
Tel: (31) 3499 2470 Fax: (31) 3499 2472
Email: posgrad@odonto.ufmg.br



Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Dissertação de Mestrado em Odontologia, área de Patologia Bucal, da candidata **Vanessa de Fátima Bernardes**. Aos 09 (nove) dias do mês de fevereiro de 2007, às 14:00h, na sala de Pós-Graduação (3418) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar (Orientadora) – FO-UFMG, Dra. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo – FO-UFMG e Dr. Sérgio Vitorino Cardoso – FO-UFU. O Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Saul Martins de Paiva abriu os trabalhos, apresentou a Comissão Examinadora e passou a presidência da sessão à orientadora da Dissertação Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar. À candidata foi dado o tempo de até 60 (sessenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho **“Carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares: características clinicopatológicas e imunexpressão de c-erbB-2”**. Encerrada a exposição, foi iniciada a argüição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Sérgio Vitorino Cardoso, Maria Auxiliadora Vieira do Carmo e Maria Cássia Ferreira de Aguiar, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as argüições, a presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado à candidata. A Comissão Examinadora opta pela **APROVAÇÃO** da candidata. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim e pela comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de fevereiro de 2007. Elizabeth Soares Teles Noronha, Secretária do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia. *Elizabeth Soares Teles Noronha*

Vanessa de Fátima Bernardes

Sérgio V. Cardoso

Elizabeth Soares Teles Noronha

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 Carcinoma mucoepidermóide	17
1.2 C-erbB-2 (HER-2, HER-2/neu)	21
1.3 C-erbB-2 em neoplasias de glândulas salivares	23
2 - JUSTIFICATIVA	26
3 - OBJETIVOS	28
4 - METODOLOGIA	30
4.1 Seleção de casos e obtenção da amostra	31
4.2 Realização da técnica imunoistoquímica	32
4.3 Análise da marcação imunoistoquímica	34
4.4 Análise de dados	34
4.5 Aspectos éticos e legais	35
5 - RESULTADOS	36
5.1 ARTIGO 1	39
5.2 ARTIGO 2	59
6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
7 - CONCLUSÕES	83
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma mucoepidermóide

Entre as neoplasias de glândulas salivares, o carcinoma mucoepidermóide (CME) é considerado o tumor maligno mais comum, compreendendo 2,8 a 15,5% do total de neoplasias e entre 12 e 29% das neoplasias malignas (Brandwein et al., 2001).

O CME apresenta distribuição uniforme entre as idades de 20 a 70 anos, com pico de incidência na 5^a década de vida, ocorrendo mais em mulheres e em indivíduos de cor branca (Auclair e Ellis, 1991). É o tumor maligno de glândulas salivares mais comum encontrado em crianças e adolescentes com idade inferior a 20 anos (Brandwein et al., 2001).

O CME pode ser caracterizado histologicamente pela variedade de tipos celulares e padrões de crescimento que pode apresentar. Células mucosas mostram-se ovóides, cuboidais, colunares, arredondadas ou caliciformes, com citoplasma abundante, pálido, espumoso, freqüentemente delineando espaços císticos. As células intermediárias demonstram transições nos tamanhos, variando de pequenas a volumosas, com citoplasma por vezes indistinto. Células epidermóides exibem formato poligonal, citoplasma eosinofílico abundante e podem estar associadas à produção de ceratina (Auclair e Ellis, 1991).

O CME manifesta variável agressividade biológica correlacionada ao estágio clínico e ao grau histológico de malignidade. Portanto, estes dois critérios têm sido tradicionalmente usados na determinação do tratamento e avaliação do prognóstico da lesão (Nascimento et al., 1986; Brandwein et al., 2001).

O estadiamento clínico do CME de glândulas salivares maiores baseia-se em dados como tamanho da lesão, envolvimento linfonodal e metástase (Ellis e Auclair, 1996). Tais critérios podem ser vistos resumidamente nos quadros 1 e 2. Este

sistema foi criado para a avaliação de neoplasias malignas em glândulas salivares maiores. Para os tumores de glândulas salivares menores, o tamanho da lesão, associado à localização, apresenta-se como o critério de maior aplicabilidade, visto que envolvimento linfonodal e metástase são menos freqüentes (Triantafillidou et al., 2006).

QUADRO 1
Sistema de estadiamento para carcinoma de glândula salivar maior proposto por *American Joint Committee on Cancer**

T – Tumor primário	
T _x	Tumor primário não pode ser avaliado.
T ₀	Sem evidência de tumor primário.
T ₁	Tumor de até 2 cm em seu maior diâmetro.
T ₂	Tumor maior que 2 cm mas menor que 4 cm em seu maior diâmetro.
T ₃	Tumor maior que 4 cm mas menor que 6 cm em seu maior diâmetro.
T ₄	Tumor maior que 6 cm.
N – Doença linfonodal	
N _x	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N ₀	Sem evidência clínica de nódulos linfáticos palpáveis ou suspeitos.
N ₁	Linfonodo único suspeito, palpável, ipsilateral, de até 3 cm em seu maior diâmetro.
N ₂	Linfonodo único suspeito, palpável, ipsilateral, maior que 3 cm e menor que 6 cm; linfonodos ipsilaterais suspeitos múltiplos, nenhum maior que 6 cm; linfonodos múltiplos suspeitos, contralaterais ou bilaterais, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro.
N _{2a}	Linfonodo único suspeito, palpável, ipsilateral, maior que 3 cm e menor que 6 cm em seu maior diâmetro.
N _{2b}	Linfonodos ipsilaterais suspeitos múltiplos, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro.
N _{2c}	Linfonodos múltiplos suspeitos, contralaterais ou bilaterais, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro.
N ₃	Linfonodos suspeitos palpáveis, maiores que 6 cm em seu maior diâmetro.
M – Doença metastática	
M _x	Metástases à distância não podem ser avaliadas.
M ₀	Sem evidência de metástase à distância.
M ₁	Evidência clínica ou radiológica de metástase.

*Dados modificados de Beahrs et al. (1988).

QUADRO 2
Elaboração do estadiamento clínico TNM para carcinoma de glândula salivar maior proposto por
*American Joint Committee on Cancer**

Estágio I	T ₁	N ₀	M ₀
Estágio II	T ₂	N ₀	M ₀
Estágio III	T ₃	N ₀	M ₀
	T ₁	N ₁	M ₀
	T ₂	N ₁	M ₀
Estágio IV	T ₃	N ₁	M ₀
	Qualquer T	N ₂	M ₀
	Qualquer T	N ₃	M ₀
	Qualquer categoria com T ₄ Qualquer categoria com M ₁		

*Dados modificados de Beahrs et al. (1988).

No entanto, são as características histopatológicas as mais consideradas na determinação do comportamento do CME. Tradicionalmente, o CME é classificado em tumor de baixo, intermediário ou alto grau de malignidade, baseando-se na relativa proporção entre os tipos celulares, entre outros achados histopatológicos (Auclair e Ellis, 1991; Brandwein et al., 2001).

A primeira tentativa de gradação do CME levou a uma divisão em dois grupos: lesões relativamente favoráveis ou altamente desfavoráveis (Foote e Frazel, 1953). Os autores deste esquema de gradação, percebendo a natureza arbitrária deste sistema e a ocorrência de metástases em alguns casos, sugeriram então a estratificação em três graus de malignidade (baixo, intermediário, alto). Desde então, surgiram diversos sistemas propostos para a gradação destes tumores, sendo que cada um apresenta sugestões sobre as características que devem ser levadas em consideração para a classificação da neoplasia (Healey et al., 1970; Nascimento et al., 1986; Batsakis e Luna, 1990; Auclair et al., 1992; Brandwein et al., 2001).

Os sistemas mais comumente utilizados para a gradação são aqueles propostos por Auclair et al. (1992) e Brandwein et al. (2001) e podem ser vistos nos

quadros 3 e 4. O método utilizado para a gradação das amostras desta pesquisa está representado no quadro 3.

Os sistemas de Auclair et al. (1992) e Brandwein et al. (2001) têm em comum a consideração de características como componente intracístico, invasão neural, necrose e número de mitoses. Brandwein et al. (2001) consideram ainda invasão linfática, vascular ou óssea, padrão de invasão, além de atipia nuclear, o que pode conferir maior acurácia à gradação. No entanto, tais critérios podem não ser aplicáveis em casos de biópsias incisionais ou que envolvam pequena quantidade de material, e atipia nuclear é uma característica incomum deste tipo de lesão, independentemente do grau de malignidade que possa apresentar (Evans, 1984).

QUADRO 3
Características e pontos utilizados no sistema de gradação para carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares proposto por Auclair et al. (1992)

CARACTERÍSTICAS	PONTOS
Componente intracístico menor que 20%	+2
Invasão neural	+2
Necrose	+3
Mitoses (4 ou mais / 10 HPF*)	+3
Anaplasia	+4
GRAU DE MALIGNIDADE	PONTOS
• Baixo	0-4
• Intermediário	5-6
• Alto	7 ou mais

*HPF – high power fields (campos de maior aumento)

QUADRO 4
Características e pontos utilizados no sistema de gradação para carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares proposto por Brandwein et al. (2001)

CARACTERÍSTICAS	PONTOS
Componente intracístico menor que 25%	2
Padrão de invasão do tumor em pequenos ninhos e ilhas	2
Atipia nuclear pronunciada	2
Invasão linfática e/ou vascular	3
Invasão óssea	3
Acima de 4 mitoses / 10 HPF*	3
Extensão perineural	3
Necrose	3
CLASSIFICAÇÃO	PONTOS
• Grau I	0
• Grau II	2-3
• Grau III	4 ou mais

*HPF – high power fields (campos de maior aumento)

Alguns trabalhos que tentaram estabelecer marcadores prognósticos para o CME relacionaram-nos à gradação histológica dos tumores. Os resultados destes estudos revelaram altos índices de expressão de Ki-67, p53 e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) associados a CMEs de alto grau de malignidade (Nguyen et al., 2003; Pires et al., 2004; Lopes et al., 2006). Inversamente, altos índices de antígeno carcinoembrionário (CEA) e bcl-2 foram relacionados a neoplasias de baixo grau de malignidade (Pires et al., 2004).

1.2 C-erbB-2 (HER-2, HER-2/neu)

O proto-oncogene c-erbB-2, também conhecido como HER-2 ou HER-2/neu, localiza-se na banda q21 do cromossomo 17 e codifica uma proteína transmembrana de 185kD (c-erbB-2), com atividade tirosina-quinase, sendo homólogo aos receptores do fator de crescimento epidérmico (Coussens et al., 1985). A identificação deste oncogene foi feita por Padhy et al. (1982), ao observarem uma versão mutante que atuava como oncogene responsável pela transformação do DNA isolado dos neuroblastomas induzidos por etilnitrosouréia em ratos.

O gene c-erbB-2 é considerado importante na proliferação e diferenciação de células normais, e uma ativação aberrante de suas atividades poderia estar envolvida no desenvolvimento de determinadas neoplasias (Peles et al., 1993). Esta ativação aberrante é representada pela amplificação gênica e superexpressão da proteína. A oncoproteína está envolvida na degradação da matriz, atividade proteolítica, aumento da permeabilidade vascular, crescimento das células endoteliais, proliferação, migração e diferenciação celular (Etges et al., 2003). A superexpressão da proteína resulta na dimerização do receptor, ativação da tirosina-quinase, autofosforilação e subsequente ativação de substratos quinase envolvidos

em mecanismos de transdução de sinais celulares, que eventualmente afetam a transcrição de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, contribuindo para o desenvolvimento de determinadas neoplasias (Supanaranond et al., 1997).

A amplificação do oncogene ou a superexpressão de sua proteína têm sido identificadas em cerca de 10-34% dos carcinomas de mama (Kumamoto et al., 2001). Tais anormalidades têm sido relacionadas a um crescimento mais agressivo, aumento no potencial metastático e pior prognóstico em algumas neoplasias, incluindo tumores de mama, ovários, pulmões, rins, bexiga e glândulas salivares, além de, em alguns tipos de lesões, serem determinantes na susceptibilidade das células neoplásicas a agentes quimioterápicos (Slamon et al., 1987; Slamon et al., 1989; Stancovski et al., 1994; Klapper et al., 2000; Kumamoto et al., 2001).

A maioria dos estudos tem sido realizada em neoplasias de mama. A identificação de alterações do c-erbB-2 faz parte do protocolo de plano de tratamento e é utilizada como fator prognóstico para estas lesões (Nahta e Esteva, 2006). Diversos métodos podem ser utilizados para a verificação do *status* de c-erbB-2, sendo a imunistoquímica e FISH (hibridização *in situ* fluorescente) os mais comumente utilizados (Nahta e Esteva, 2006). Recentemente foi desenvolvida a técnica CISH (hibridização cromogênica *in situ*), utilizada para identificar a amplificação de determinados genes, entre eles o c-erbB-2. A técnica de CISH apresenta-se como um método altamente sensível e específico, requerendo equipamentos e materiais economicamente mais viáveis em laboratórios de rotina quando comparada à técnica FISH. Até o momento, a CISH tem sido utilizada principalmente em neoplasias de mama, sendo poucos os estudos em tumores de outros órgãos (Tanner et al., 2000; Gong et al., 2005).

Nos casos de carcinoma de mama que exibem superexpressão da proteína c-erbB-2, os pacientes são submetidos ao tratamento com Herceptin (Trastuzumab; Genentech, San Francisco, CA, EUA), anticorpo monoclonal contra o domínio extracelular da proteína c-erbB-2, sendo observados, nestes casos, maiores índices de resposta aos agentes quimioterápicos adjuvantes, menores índices de recorrência da neoplasia e aumento no tempo de sobrevida livre de doença (Dori et al., 2002; Nahta e Esteva, 2003).

1.3 C-erbB-2 em neoplasias de glândulas salivares

Um dos primeiros estudos realizados com o objetivo de identificar, através de imunohistoquímica, a expressão de c-erbB-2 em tumores de glândulas salivares encontrou imunopositividade em apenas 5 dos 131 tumores avaliados, sendo 3 adenocarcinomas pobremente diferenciados, um carcinoma mucoepidermóide e um carcinoma adenóide cístico (CAC) (Kernohan et al., 1991).

Posteriormente, superexpressão de c-erbB-2 foi observada em apenas 2 entre 7 casos de adenoma pleomórfico, mas nenhum dos três casos de CME foi positivo (Issing et al., 1993). Em alguns estudos, foi observada baixa frequência de imunopositividade para c-erbB-2 nas neoplasias mais comuns de glândulas salivares, como o CME, CAC e adenocarcinoma, sendo relatados índices entre 4% e 8% (Kernohan et al., 1991; Glisson et al., 2004).

Rosa et al. (1997) analisaram 233 tumores de glândulas salivares que apresentavam diferenciação mioepitelial (adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, carcinoma epitelial-mioepitelial, CAC, adenocarcinoma de células basais, adenoma pleomórfico e mioepitelioma), revelando negatividade para c-erbB-2 em todos os casos.

Quando comparada aos tecidos de glândulas salivares normais, a expressão de c-erbB-2 apresenta-se significativamente maior em casos de CME, carcinoma de células acinares e adenoma pleomórfico (Jordan et al., 1994).

Interessantemente, outros trabalhos demonstram altos índices de expressão, exibindo maior expressividade de c-erbB-2 no carcinoma mucoepidermóide quando comparada à marcação no CAC, além da alta frequência de imunexpressão, correspondendo a 13 dos 16 casos (81,2%) de CME (Gibbons et al., 2001; da Cruz Perez et al., 2004). Imunorreatividade para c-erbB-2 apresentou-se focal e discreta em um caso de carcinoma de ducto salivar, apresentando-se intensa em outros 7 casos analisados (Martinez-Barba et al., 1997).

Pode-se observar que tumores de glândulas salivares apresentam diversidade na imunexpressão da proteína c-erbB-2, sendo observados índices variando de 0% em CAC a 100% em carcinoma do ducto salivar (Locati et al., 2005). Outros trabalhos revelam variações entre amostras do mesmo tipo de neoplasia, como no CAC, em que são descritos índices de 5%, 16%, 17%, 50% e 100% respectivamente (Kernohan et al., 1991; Dori et al., 2002; Cho et al., 1999; Giannoni et al., 1995; Shintani et al., 1995).

A amplificação do gene foi detectada em apenas duas das amostras entre 21 casos de neoplasias de glândulas salivares estudadas por Issing et al. (1993). Birek et al. (1994) encontraram amplificação do gene em apenas 2 casos de adenocarcinoma pobremente diferenciado, 2 adenomas pleomórficos e 1 tumor de Warthin entre 50 neoplasias de glândulas salivares. Nestes estudos, porém, não foi analisada a relação entre amplificação e prognóstico.

Lesões como o adenoma pleomórfico e carcinoma ex-adenoma também foram avaliadas quanto à expressão e amplificação de c-erbB-2. Na amostra de

Müller et al. (1994), entre os 28 tumores analisados, somente 2 carcinomas ex-adenoma exibiram amplificação do gene, não sendo detectada relação entre esta e prognóstico.

Com relação à investigação de c-erbB-2 no carcinoma mucoepidermóide, alguns autores relatam uma associação positiva entre a superexpressão da proteína ou amplificação do gene a menores taxas de sobrevida (Press et al., 1994; Weed et al., 2004). Além disso, alguns parâmetros clínicos e histopatológicos foram associados à amplificação detectada por FISH ou à superexpressão de c-erbB-2, indicando que este pode ser um marcador importante no prognóstico e ressaltando a necessidade de novas investigações a respeito desta neoplasia (Weed et al., 2004).

Pode-se acrescentar ainda que a existência de uma fração significativa de tumores de glândulas salivares que exibem amplificação gênica e superexpressão da proteína c-erbB-2 aponta para a possibilidade de se explorar os efeitos do Herceptin no tratamento destas neoplasias (Haddad et al., 2003; Nguyen et al., 2003), sendo o CAC e o CME fortes candidatos às investigações sobre esta terapia (Gibbons et al., 2001; Dori et al., 2002).

Considerando-se o potencial do c-erbB-2 como marcador prognóstico de neoplasias de glândulas salivares, os poucos estudos dedicados a este gene nestes tumores, em especial, envolvendo um tipo histológico específico, o objetivo deste trabalho foi investigar a expressão imunoistoquímica da proteína c-erbB-2 em CME de glândulas salivares e sua associação com características clinicopatológicas, como idade e sexo do paciente, localização e grau de malignidade da lesão.

2 - JUSTIFICATIVA

O gene c-erbB-2 apresenta-se envolvido na patogênese de diversas neoplasias, com implicações bem definidas em carcinomas de mama e especulações a respeito de algumas neoplasias de glândulas salivares. O CME é a neoplasia maligna de glândulas salivares mais comum, com etiopatogenia incompletamente elucidada, sendo diagnóstico, classificação histológica e comportamento clínico alvos de discussão e interesse de estudo, justificando-se a importância do presente trabalho.

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, por método imunohistoquímico, a expressão da proteína c-erbB-2 em carcinoma mucoepidERMÓide de glândulas salivares.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar a técnica imunohistoquímica para a marcação da proteína c-erbB-2 e realizá-la na amostra selecionada, descrevendo o padrão de expressão nos diversos casos.
- Verificar se existe relação entre a expressão da proteína c-erbB-2 e características clinicopatológicas, como sexo e idade do paciente e localização e grau de malignidade da lesão.

4 - METODOLOGIA

Realizou-se um estudo retrospectivo, sendo que a obtenção dos dados foi feita através de pesquisa documental e observacional. Foram utilizados dados referentes às características clínicas da neoplasia descritos nas fichas de biópsia, lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE), blocos de inclusão em parafina e cortes histológicos destes para a realização de imunistoquímica em espécimes de CME biopsiados e contidos no arquivo do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG, registrados no período de 1953 a 2006.

4.1 Seleção de casos e obtenção da amostra

A amostra selecionada compreendeu a totalidade de casos de CME ocorridos em glândulas salivares, obtidos através de biópsias, fixados em formol tamponado a 10%, incluídos em parafina, diagnosticados e arquivados no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Os tecidos foram avaliados por método de coloração em HE para confirmação do diagnóstico citado na ficha clínica de cada caso e verificação da quantidade de tecido representativa da lesão. A avaliação foi realizada por dois observadores, independentemente, sem conhecimento prévio das características clínicas, avaliando-se o maior número de casos a cada análise. Foi utilizado microscópio óptico de luz, marca Zeiss. Quando necessária para a confirmação do diagnóstico, foi realizada a coloração por PAS (*periodic acid Schiff*).

As amostras foram classificadas, quanto ao grau de malignidade, em baixo, intermediário ou alto grau, de acordo com critérios preestabelecidos por Auclair et al. (1992) (quadro 3) e submetidas à técnica imunistoquímica para identificação da proteína c-erbB-2. Os casos divergentes foram classificados após consenso entre os observadores.

Quantidade insuficiente de material para adequada avaliação, fichas de biópsia e blocos de inclusão em parafina ausentes foram critérios para exclusão dos casos.

4.2 Realização da técnica imunoistoquímica

Para a realização da técnica imunoistoquímica, os cortes histológicos apresentaram espessura de 3 μ m e foram montados em lâminas de vidro silanizadas (3-aminopropiltriétoxi-silano, Sigma Chemical Co., St Louis, USA). Segue abaixo, resumidamente, a seqüência do protocolo, de acordo com recomendações dos fabricantes, modificado segundo resultados obtidos no decorrer do estudo de acordo com as condições ideais de trabalho:

1. Desparafinização em três passagens de xilol e hidratação em cadeia descendente de etanol (100%, 90% e 70%);
2. Remoção do pigmento formólico com solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol 95% por 10 minutos. Cinco banhos de água destilada para lavagem;
3. Recuperação dos epitopos antigênicos pesquisados utilizando-se tampão EDTA (*Ethylenediaminetetracetic acid sodium*) 1 M em panela a vapor durante 30 minutos;
4. Após o resfriamento, alcançando equilíbrio térmico com o meio ambiente, lavagem em água corrente por cinco minutos e, em seguida, cinco banhos de água destilada;
5. Bloqueio de enzimas endógenas de acordo com Miller et al. (1999);
6. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
7. Bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 10% (v/v) em dois banhos de 15 minutos;

8. Incubação com o anticorpo primário monoclonal CB11 (Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, UK) em diluição 1:200, contendo soro albumina bovina (BSA), por 18 horas, em ambiente úmido, à temperatura ambiente;
9. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
10. Incubação em anticorpo secundário biotilado para amplificação da reação (Sistema LSAB⁺, DAKO, Carpinteria, EUA), por 30 minutos, à temperatura ambiente, em ambiente úmido;
11. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
12. Incubação em solução de complexo terciário contendo peroxidase (Sistema LSAB⁺, DAKO, Carpinteria, EUA), por 30 minutos, à temperatura ambiente, em ambiente úmido;
13. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
14. Incubação com tetrahydrocloridrato de diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) e, em seguida, 5 banhos de água destilada;
15. Contracoloração com hematoxilina de Mayer por 4 minutos;
16. Rápida passagem em solução aquosa de hidróxido de amônio e, em seguida, 5 banhos de água destilada;
17. Desidratação em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanização em três banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Tissue-Mount™ (Tissue-Clear® based medium).

Controles negativos consistiram na omissão do anticorpo primário. Como controle positivo, foram utilizados cortes de carcinoma intraductal de mama cuja expressão de c-erbB-2 já havia sido observada, e é descrita abaixo.

4.3 Análise da marcação imunoistoquímica

A avaliação da expressão de c-erbB-2 foi realizada por dois observadores, independentemente, sem conhecimento prévio das características clínicas e do grau de malignidade, avaliando-se o maior número de casos a cada análise. Foi utilizado microscópio óptico de luz, marca Zeiss. Inicialmente, foi avaliado o padrão de marcação em toda a extensão da lesão, em aumento de 100x, selecionando-se a área de maior representatividade da neoplasia. Partindo-se para o aumento de 400x, avaliou-se o padrão de imunomarcação da proteína c-erbB-2 na membrana plasmática das células. Foram consideradas as áreas de máxima intensidade, tendo-se como referência cortes histológicos de carcinoma intraductal de mama, graduado como grau 3+, segundo recomendações do kit HercepTest™ (DAKO,1999), conforme o quadro 5. Em casos divergentes, os observadores avaliaram em conjunto, chegando-se a um consenso.

QUADRO 5

Avaliação do padrão de marcação imunoistoquímica da proteína c-erbB-2 segundo recomendações do kit HercepTest™

GRADUAÇÃO	CRITÉRIO
0 (negativo)	Ausência de coloração ou coloração de membrana em menos de 10% das células tumorais
1+ (negativo)	Coloração fraca da membrana em mais de 10% das células tumorais; somente parte das membranas celulares é corada
2+ (fracamente positivo)	Coloração fraca a moderada de toda a extensão da membrana observada em mais de 10% das células tumorais
3+ (fortemente positivo)	Coloração moderada a acentuada da membrana citoplasmática observada em mais de 10% das células tumorais

DAKO, 1999.

4.4 Análise de dados

Os dados foram analisados de acordo com a expressão imunoistoquímica da proteína c-erbB-2, além de terem sido associados às características clinicopatológicas (idade e sexo do paciente, localização e grau de malignidade da

lesão), sendo submetidos ao teste qui-quadrado, utilizando-se o programa SPSS 12.0, adotando-se o nível de significância $p < 0,05$.

4.5 Aspectos éticos e legais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), sob o número 345/05, obedecendo às exigências da legislação brasileira, conforme as resoluções CNS n^o 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

5 - RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são apresentados no artigo 1. O artigo 2 é o relato de um caso de uma variante incomum do CME identificada durante a revisão do arquivo. Antes da apresentação destes artigos, os resultados podem ser resumidos da seguinte forma:

No período de 1953 a 2006, foram encontrados 40 casos de CME, representando aproximadamente 17% do total de neoplasias epiteliais de glândulas salivares e 39% das neoplasias malignas de glândulas salivares, apresentando-se como o tumor maligno mais comum. Destes, 32 foram incluídos neste estudo. Os demais casos não fizeram parte da amostra devido a critérios de exclusão anteriormente mencionados. Os dados clínicos, histológicos e imunoistoquímicos desta amostra podem ser vistos no quadro 6.

Vinte e cinco casos (78,1%) ocorreram no sexo feminino, sendo a terceira e quarta décadas de vida (46,9%) as mais envolvidas. O palato foi o local mais acometido, com 21 casos (65,6%). Outros locais de ocorrência da lesão compreenderam região retromolar, mucosa jugal, assoalho bucal, região intra-óssea e glândula submandibular. A maioria das lesões foi considerada de baixo grau de malignidade, representada por 30 casos (93,8%). Foram obtidas informações sobre o acompanhamento clínico de 12 indivíduos (37,5%) e todos apresentavam-se sem sinais indicativos de recorrência da lesão por um período mínimo de um ano após o tratamento. Um paciente foi a óbito antes do tratamento, porém, não foi obtida informação sobre a causa da morte. Um caso obteve diagnóstico recentemente, não sendo possível a obtenção de dados de acompanhamento. A expressão de c-erbB-2 foi considerada negativa em 22 casos (68,8%). Entre os casos positivos, a maioria foi graduada como 2+. Não foi observada marcação da proteína no tecido glandular normal adjacente. Nenhuma associação significativa foi observada entre a

expressão de c-erbB-2 e sexo e idade do paciente, localização e grau de malignidade da lesão ($p>0,05$).

QUADRO 6

Dados clinicopatológicos do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares

Número de casos	Idade (em anos)	Sexo*	Localização	Grau de malignidade	Expressão de c-erbB-2	Acompanhamento**
1	34	Fem	Região retromolar	Baixo	Negativa	SA
2	23	Fem	Mucosa jugal	Baixo	Negativa	SA
3	65	Fem	Intra-óssea	Baixo	Negativa	SA
4	31	Fem	Assoalho bucal	Baixo	Positiva (2+)	SA
5	30	Masc	Intra-óssea	Baixo	Negativa	SA
6	35	Fem	Palato	Intermediário	Negativa	SA
7	20	Masc	Palato	Baixo	Positiva (2+)	SA
8	35	Fem	Palato	Baixo	Positiva (2+)	SA
9	53	Masc	Palato	Baixo	Positiva (2+)	SA
10	66	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SED
11	26	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SA
12	60	Masc	Palato	Baixo	Positiva (2+)	SED
13	25	Fem	Palato	Intermediário	Positiva (2+)	SA
14	53	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SA
15	14	Masc	Palato	Baixo	Negativa	SA
16	40	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SED
17	55	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SED
18	65	Masc	Região retromolar	Baixo	Negativa	SA
19	41	Fem	Palato	Baixo	Positiva (3+)	SED
20	64	Fem	Assoalho bucal	Baixo	Negativa	SED
21	73	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SA
22	14	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SA
23	43	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SED
24	32	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SED
25	16	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SA
26	21	Fem	Região retromolar	Baixo	Positiva (2+)	SA
27	48	Fem	Região retromolar	Baixo	Negativa	SED
28	55	Masc	Palato	Baixo	Negativa	SED
29	65	Fem	Glândula submandibular	Baixo	Positiva (2+)	OCD
30	23	Fem	Mucosa jugal	Baixo	Positiva (2+)	SED
31	36	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SED
32	28	Fem	Palato	Baixo	Negativa	SA

*Fem: feminino / Masc: masculino

**SA: sem acompanhamento / SED: sem evidência de doença / OCD: óbito por causa desconhecida

5.1 ARTIGO 1

TITLE: Intraoral mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: lack of association among clinicopathological features and immunoexpression of c-erbB-2 in 29 cases

RUNNING TITLE: c-erbB-2 in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands

TÍTULO: El carcinoma mucoepidermoide de glándulas salivales intraoral: factores clínicos y patológicos y immunoexpresión de c-erbB-2 en 29 casos

SUBTÍTULO: c-erbB-2 en el carcinoma del mucoepidermoid de glándulas salivales

Submetido ao periódico International Journal of Morphology

AUTHORS:

Vanessa Fátima Bernardes, MS¹

Maria Letícia Ramos-Jorge, PhD²

Maria Auxiliadora Vieira Carmo, PhD³

Sérgio Vitorino Cardoso, PhD⁴

Ricardo Alves Mesquita, PhD⁵

Maria Cássia Ferreira Aguiar, PhD⁶

Correspondence to:

Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar.

e-mail: cassiafa@ufmg.br

Faculdade de Odontologia da UFMG

Laboratório de Patologia Experimental 1- Sala 3201

Tel.: (55 31) 3499 2476

Fax: (55 31) 3499 2472

Av. Antônio Carlos, 6627

Pampulha – Belo Horizonte, MG

CEP: 31270-901

^{1,2,3,5,6} Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁴ Oral Pathology Laboratory, School of Dentistry, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

RESUMEN

Fueran evaluados veinte nueve casos del carcinoma mucoepidermoid intraorales con respecto a los aspectos clínico-patológicos y también la expresión del oncoprotein c-erbB-2. MEC fuera predominante en género femenino (79.3%) y ocurrirón más frecuentemente en edades entre 21 y 40 años (48.3%). Paladar fuera el sitio más comunmente envolto (72.4%). Microscópicamente, 27 casos (93.1%) fuerón clasificado como calidad baja de malignidad. La expresión del c-erbB-2 fuera considerada positiva en 9 (31%) casos y ninguna asociación significativa ($p>0.05$) fuera observada entre la expresión de la proteína y género ni entre la edad de los pacientes y el sitio o el histological gradúe de la lesión. La expresión del c-erbB-2 en MEC puede mostrar las propiedades biológicas intrisincas de los neoplasmas de las glándulas salivales.

PALABRAS CLAVE: c-erbB-2, Her-2/neu, inmunohistoquímica, carcinoma mucoepidermoid, neoplasmas de las glándula salivales

ABSTRACT

The association among clinicopathological features and c-erbB-2 oncoprotein expression was evaluated in twenty-nine cases of intra-oral mucoepidermoid carcinoma (MEC). MEC was prevalent in the female gender (79.3%), tumors were more frequent in ages between 21 and 40 years (48.3%), and the palate was the most commonly affected site (72.4%). Microscopically, 27 cases (93.1%) were classified as low grade of malignancy. The c-erbB-2 expression was considered positive in 9 (31%) cases and no significant association ($p>0.05$) was found among protein expression and gender nor between patient age and site or histological grade of the lesion. c-erbB-2 expression in MEC may reflect intrisinc biologic properties of

salivary gland neoplasms and may be linked to histogenesis and cellular differentiation.

KEY WORDS: c-erbB-2, Her-2/neu, immunohistochemistry, mucoepidermoid carcinoma, salivary gland neoplasms

INTRODUCTION

The c-erbB-2 proto-oncogene, also known as Her-2/neu, is located on chromosome 17 and encodes a cell-surface transmembrane glycoprotein known as p185neu. Its intracellular component has a tyrosine kinase activity, whereas the extracellular domain may act as a growth factor receptor because of its considerable homology with epidermal growth factor receptor (Nguyen et al., 2003). The c-erbB-2 oncoprotein is involved in matrix degradation and proteolytic activity as well as in the increase in vessel permeability, endothelial cell growth, proliferation, migration, and differentiation (Verbeek et al., 2003; Sanderson et al., 2006) inducing and maintaining oncogenesis in a great number of human malignancies.

The amplification and/or overexpression of c-erbB-2 in human tumor tissue has been associated with a poor prognosis in ovarian, endometrial and breast carcinoma (Weed et al., 2004). Previous studies of c-erbB-2 expression in salivary gland carcinomas are sparse, comprise heterogeneous subtypes, and show contradictory results (Locati et al., 2005).

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant neoplasm of major and minor salivary glands (Lopes et al., 2006). MEC is reported to manifest variable biologic aggressiveness, basically showing correlation with its histological features and is graded by a 3-tiered system (Auclair et al., 1992).

Conflicting results have been reported with regard to c-erbB-2 overexpression in mucoepidermoid carcinoma, with reported rates ranging from absent to 38% (Sugano et al., 1992; Press et al., 1994; Suzuki et al., 1998). Different conclusions may be attributed to the varying techniques used, criteria applied to determine positive c-erbB-2 expression, the diversity of lesions and the limited number evaluated in some studies.

Few papers evaluating only one type of oral salivary gland tumors are available. Thus, the aim of this study was to analyze a series of intraoral MEC for expression of the c-erbB-2 oncoprotein and its possible association with the clinicopathologic features of the sample.

MATERIAL AND METHODS

The protocol of this study was approved by the Committee of Bioethics in Research at the Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG (COEP-UFMG 345/05).

Patients

From 1953 to 2006 forty cases were diagnosed as MEC from the files of the Oral Pathology Department, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais. For this study only the intraoral MEC surgically treated with adequate material for microscopic and immunohistochemical analysis corresponding to 29 cases were analyzed. Sinonasal and maxillary tumors were not included in the sample. Clinical information about age, gender, and site were obtained from the biopsy records.

Histopathology

Histopathological diagnosis was revised in new hematoxylin-eosin-stained sections and tumors were graded as low, intermediate, or high according to the histologic grading method of Auclair et al. (1992).

Immunohistochemistry (IHC)

IHC was performed with a standard, monoclonal antibody CB11 (Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, UK). Briefly, 4 μm sections were dewaxed in xylene and hydrated with graded ethanol. Blocking of endogenous peroxidase and avidin-biotin activity were performed (Miller et al., 1999). The slides were placed in a 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer, pH 8.0, heated to 96°C in a steamer for 25 minutes, incubated with the primary antibody for 18h at room temperature, and diluted 1:200 in a 1% bovine serum albumin (BSA). After washing in the Tris-HCl buffer, sections were incubated for 30 min at room temperature with biotinylated multi-link swine anti-goat, mouse, and rabbit immunoglobulin (LSAB kit, Dako, Carpinteria, CA, USA). The reactions were revealed by applying 0.01% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.03% H₂O₂. The sections were counterstained with Mayer's haematoxylin and mounted in Permount (Fisher Scientific, NJ, USA). In situ intraductal carcinoma of the breast was used as a c-erbB-2 positive control and negative controls were obtained by the omission of the primary antibody.

Evaluation of the immunohistochemical staining

Tumors were scored on a 0-3+ scale, as follows: 0, staining in <10% of tumor cells or no staining; 1+, faint and partial membrane staining in $\geq 10\%$ of tumor cells; 2+, weak to moderate complete membrane staining in $\geq 10\%$ of tumor cells; or 3+, moderate to strong complete membrane staining in $\geq 10\%$ of tumor cells. Scores of either 2+ or 3+ were defined as c-erbB-2 overexpression. The slides were

independently evaluated by two observers (VFB, MCFA) with neither prior discussion nor knowledge about the clinical features and malignancy grade. Discrepancies were solved by consensus.

Statistical analysis

Significance was evaluated by the Chi-square test using the SPSS program with a $p < 0.05$ significance level (SPSS 2003).

RESULTS

From 22688 oral biopsies submitted during period between 1953 and 2006, 40 (0.18%) MEC were diagnosed being 29 located in minor salivary glands. Tumors were more common in the third and fourth decades of life (48.3%), with predilection for females (79.3%). The palate was the most commonly affected site, with 21 cases (72.4%). Other intraoral sites included the retromolar area (4), the buccal mucosa (2), and the floor of the mouth (2). The majority of MECs (27 cases) were classified as low grade of malignancy (Figure 1A).

c-erbB-2 positive staining of cell surface membranes (2+ or 3+) was identified in 9 cases (31%) of our series. All positive cases also expressed cytoplasmic staining. Both patterns (cell surface membrane/cytoplasmic staining) were observed in mucous, intermediate and epidermoid cells (Figure 1B). Neither staining was observed in adjacent normal salivary gland nor in the stroma. No significant association ($p>0.05$) was found among protein expression and gender nor between patient age and site or histological grade of the lesion.

DISCUSSION

MEC is the most common malignancy of salivary glands and presents a diverse age distribution (Auclair et al.; Lopes et al.). However, there are few articles with a significative number of cases (Lopes et al.). In our series, patients demonstrated an earlier average age of occurrence, with a peak of incidence in the third and fourth decades of life, whereas previous studies described a prevalence in fifth and sixth decades of life (Auclair et al.; Lopes et al.). However, as the MEC is the most common malignant tumor of salivary glands in young people this observation is in accordance with the literature as also the the female predilection (Auclair et al.; Triantafillidou et al., 2006).

Most of the studies show that the palate is the most common site of occurrence (Lopes et al; Kokemueller et al., 2005). In our series the results were similar with 21 (72.4%) cases affecting the hard palate. Sinonasal and maxillary tumors were not included in this study as intraoral salivary gland tumors since that in these locations mucoepidermoid carcinoma presents different origin rather than glandular (Ellis et al., 1991).

Microscopically, most intraoral MEC were classified as low grade of malignancy (27cases - 93.1%), followed by intermediate (2 - 6,9%) and no case of high-grade as expected. Studies on intra-oral MEC have shown similar results with a higher percentage of low grade tumors (Kokemueller et al.; Lopes et al). Low grade tumors seem to arise more often in minor salivary glands, which according to some authors are detected at earlier stages, probably due to the less aggressive growth in addition to a better visible tumor site. High grade tumors, on the other hand, seem to arise more often in major salivary glands (Kokemueller et al.).

Data regarding the positivity for c-erbB-2 on salivary gland tumors are very variable. Kärjä et al. (1994) described positivity in 44% of cases, including malignant and benign tumors. However, other studies reported a rare expression of c-erbB-2 on these tumors (Kernohan et al., 1991; Shrestha et al., 1992).

Concerning MEC, there had been only individual case descriptions of c-erbB-2 expression (Kernohan et al.; Shrestha et al.) before a study of Press et al. These authors observed the gene amplification and protein overexpression of c-erbB-2 in 21% and 38% of MEC respectively. Cho et al. (1997) showed a similar prevalence. However, some authors described a far greater rate, with almost 80% of the MEC positive for c-erbB-2 in their series, although the criteria for analysis of positivity was not presented (da Cruz Perez et al., 2004; Lopes et al.). We observed c-erbB-2 membranous expression in 9 (31%) of cases in our series which is in accordance with previous report (Press et al.).

We suppose that reasons for this contradictory results are associated with the immunohistochemistry technique, in special with the primary antibody employed and with the subjective interpretation and semiquantitative nature of the results. There is no consensus about the best antibody for the evaluation of c-erbB-2 immunoexpression (Hanna et al., 2001). The CB11 antibody used here has shown the best concordance with FISH (fluorescent in situ hybridization) technique (Gouvea et al., 2006). This antibody although less sensitive than the polyclonal antibody used in other reports (Lopes et al.; Gouvea et al.) is considered more specific (Kernohan et al., Handra-Luca et al., 2003; Kamio et al., 1996).

Besides, in the present study a standardized method was employed for evaluation of positivity. The high percentage of previously observed positive cases

(21 cases, 77.7%) (Lopes et al.) as compared to our series (9 cases, 31%) may be due to differences in methods of interpretation.

Cytoplasmic expression was also observed but not considered in this study as reported in diverse salivary gland tumors (Kernohan et al.). Although the significance of this cytoplasmic staining remains unknown, Cheng et al suggested that this pattern reflects degenerated c-erbB-2 fragments with less functional ability (Cheng et al., 2005). Further studies in order to clarify this point are warranted.

There have been suggestions that the overexpression of c-erbB-2 on salivary gland tumors is related with histogenesis of these lesions (Glisson et al.; Rivière et al., 1991; Gibbons et al., 2001, Rosa et al., 1997). MEC is composed of varying proportions of mucous, epidermoid, columnar, intermediate and clear cells (Auclair et al.) and is thought to arise from the salivary excretory duct (Ellis et al.). Glisson et al. suggested that c-erbB-2 has a higher frequency of overexpression in tumors derived from excretory duct (e.g. MEC) than that from intercalated duct. For Rivière et al. the expression of c-erbB-2 on salivary gland tumors may reflect accident of genomic reconstitucional events occurring within the differential pathway of mioepithelial/epithelial cells which justify the overexpression of this oncogene in tumors of intercalated duct origin.

However, many studies found that benign and malignant salivary gland neoplasms with evidence of myoepithelial lineage do not overexpress c-erbB-2 protein which support the view that this growth receptor is not involved in their pathogenesis (Rosa et al., Shrestha et al.; Kamio et al.). In contrast, the c-erbB-2 is expressed by high grade carcinomas as salivary duct carcinoma, high grade carcinoma, and exclusively by the malignant component of carcinoma ex pleomorphic adenoma (Johnson et al., 2008; Nabili et al., 2007; Matsubayashi & Yoshihara,

2007). Although the latter may present myoepithelial derivation, carcinoma ex pleomorphic adenoma probably acquired a particular biological behavior in the longstanding process of malignant transformation. Moreover, Gibbons et al. demonstrated a clear difference in the molecular phenotypes of MEC and adenoid cystic carcinoma with only MEC overexpressing c-erbB-2. This provides further support to the existence of distinct molecular mechanisms in salivary gland carcinogenesis associated with the overexpression of c-erbB-2.

Despite the small sample studied our results demonstrated no association among c-erbB-2 expression and demographic or histological grades of MEC. Press et al. reported that male gender was significantly associated with neu oncogene amplification and overexpression in MEC. Cho et al. and Nguyen et al. reported that c-erbB-2 expression was more frequent in high grade tumors than in low grade.

The majority of MEC in minor salivary glands are histologically classified as low grade of malignancy and an association with the c-erbB-2 immunopositivity could be not demonstrated. However, in the study of Lopes et al. c-erbB-2 positivity was predominantly observed in low-grade MEC and differently of other studies, negativity for c-erbB-2 correlated with lowest survival rates. Suzuki et al. also demonstrated that the overexpression of c-erbB-2 on MEC of parotid gland was associated to a poor prognosis independently of the histological grade.

Thus, our findings may suggest the lack of association among clinicopathological features and the immunoexpression of c-erbB-2. Moreover, the significance of c-erbB-2 expression in MEC may reflect intrinsic biologic properties of salivary gland neoplasms (Nguyen et al.). A greater number of studies involving large series with specific histologic subtypes are necessary to highlight the role of c-erbB-2 in the pathogenesis of salivary gland neoplasms.

CONCLUSION

Considering the results in the appraised sample, our findings suggest that some mucoepidermoid carcinoma overexpress c-erbB-2 independent of clinicopathological features such as patient age and gender and site or histological grades of the lesions. This overexpression may be due to the process involving histogenesis and cellular differentiation. Our data suggest that further investigation is indeed warranted to better assess the role of c-erbB-2 immunoeexpression in pathogenesis of mucoepidermoid carcinomas of salivary glands.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding was provided by The Research Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) supported this work. Aguiar, MCF; Carmo, MAV; and Mesquita, RA are research fellows of the CNPq.

We thank Mrs. Ignez Candelori, Universidade Federal de Uberlândia, from her technical support.

REFERENCES

1. Auclair, P.L.; Goode, R.K.; Ellis, G.L. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer*, 69(8): 2021-30, 1992.
2. Cheng, C.M.; Tsuneyama, K.; Matsui, K.; Takahashi, H.; Ishizawa, S.; Takano, Y. Cytoplasmic expression of c-erbB2 in non-small cell lung cancers. *Virchows Arch.*, 446(6): 596-603, 2005.
3. Cho, K.J.; Kim, J.Y.; Lee, S.S.; Oh, K.K. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary gland--a clinico-pathologic and immunohistochemical study for c-erbB-2 oncoprotein. *J. Korean Med. Sci.*, 12(6): 499-504, 1997.
4. da Cruz Perez, D.E.; Pires, F.R.; Alves, F.A.; Almeida, O.P.; Kowalski, L.P. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. *Int J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 68(7): 895-902, 2004.
5. Ellis, G.L.; Auclair, P.L.; Gnepp, D.R. *Surgical Pathology of the salivary glands*. v.25. Philadelphia-PA, W.B. Saunders, 1991.
6. Gibbons, M.D.; Manne, U.; Carroll, W.R.; Peters, G.E.; Weiss, H.L.; Grizzle, W.E. Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope*, 111(8): 1373-8, 2001.
7. Glisson, B.; Colevas, A.D.; Haddad, R.; Krane, J.; El-Naggar, A.; Kies, M.; Costello, R.; Summey, C.; Arquette, M.; Langer, C.; Amrein, P.C.; Posner, M. HER2 expression in salivary gland carcinomas: dependence on histological subtype. *Clin. Cancer Res.*, 10(3):944-6, 2004.

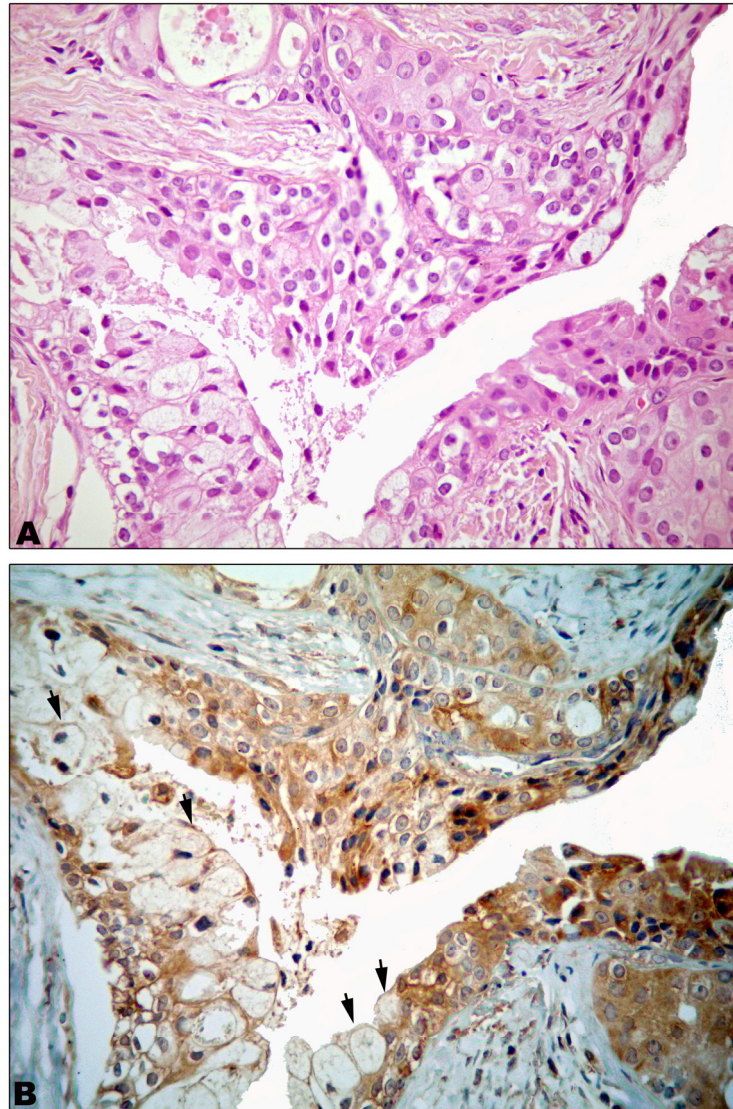
8. Gouvea, A.P.; Milanezi, F.; Olson, S.J.; Leitaó, D.; Schmitt, F.C.; Gobbi, H. Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 14(1): 103-8, 2006.
9. Handra-Luca, A.; Bilal, H.; Bertrand, J.C.; Fouret, P. Extra-celular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Am. J. Pathol.* 163(3): 957-67, 2003.
10. Hanna, W.M.; Kahn, H.J.; Pienkowska, M.; Blondal, J.; Seth, A.; Marks, A. Defining a test for HER-2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. *Mod. Pathol.* 14(7): 677-85, 2001.
11. Johnson, C.J.; Barry, M.B.; Vasef, M.A.; Deyoung, BR. Her-2/neu expression in salivary duct carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 16(1): 54-8, 2008.
12. Kamio, N. Coexpression of p53 and c-erbB-2 proteins is associated with histological type, tumour stage, and cell proliferation in malignant salivary gland tumours. *Virchows Arch.*, 428(2): 75-83, 1996.
13. Kärjä, V.; Syrjänen, S.; Kataja, V.; Syrjänen, K. c-erbB-2 oncogene expression in salivary gland tumours. *ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, 56(4): 206-12, 1994.
14. Kernohan, N.M.; Blessing, K.; King, G.; Corbett, I.P.; Miller, I.D. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in salivary gland tumours: an immunohistochemical study. *J Pathol.* 163(1): 77-80, 1991.

15. Kokemueller, H.; Brueggemann, N.; Swennen, G.; Eckardt, A. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands – clinical review of 42 cases. *Oral Oncology*, 41(1): 3-10, 2005
16. Locati, L.D.; Rinaldi, G.; Bossi, P.; Dagrada, G.P.; Quattrone, P.; Cantu, G.; Licitra, L. Herceptin plus chemotherapy in relapsed and/or metastatic salivary gland cancer. *Oral Oncol.*, 41(1): 97-8, 2005.
17. Lopes, M.A.; da Cruz Perez, D.E.; de Abreu Alves, F.; de Almeida, O.P.; Kowalski, L.P. Clinicopathologic and immunohistochemical study of intraoral mucoepidermoid carcinoma. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 134(4), 622-6, 2006.
18. Matsubayashi, S.; Yoshihara, T. Carcinoma ex pleomorphic adenoma of the salivary gland: an immunohistochemical study. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 264(7): 789-95, 2007.
19. Miller, R.T.; Kubier, P.; Reynolds, B.; Henry, T.; Turnbow, H. Blocking of endogenous avidin-biotin activity in immunohistochemistry. The use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. *Appl. Imm. Mol. Morphol.*, 7(1): 63–65, 1999.
20. Nabili, V.; Tan, J.W.; Bhuta, S.; Sercarz, J.A.; Head, C.S. Salivary duct carcinoma: a clinical and histologic review with implications for trastuzumab therapy. *Head Neck.*, 29(10): 907-12, 2007.
21. Nguyen, L.H.P.; Black, M.J.; Hier, M.; Chauvin, P.; Rochon, L. Her2/neu and Ki-67 as prognostic indicators in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *J. Otolaryngol.*, 32(5): 328-31, 2003.
22. Press, M.F.; Pike, M.C.; Hung, G.; Zhou, J.Y.; Ma, Y.; George, J.; Dietz-Band, J.; James, W.; Slamon, D.J.; Batsakis, J.G.; El-Naggar, A.K. Amplification and

- overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res.*, 54(21): 5675-82, 1994.
23. Rivière, A.; Becker, J.; Löning, T. Comparative investigation of c-erbB2/neu expression in head and neck tumors and mammary cancer. *Cancer*, 67(8):2142-9, 1991.
24. Rosa, J.C.; Felix, A.; Fonseca, I.; Soares, J. Immunoexpression of c-erbB-2 and p53 in benign and malignant salivary neoplasms with myoepithelial differentiation. *J. Clin. Pathol.*, 50(8): 661-3, 1997.
25. Sanderson, M.P.; Dempsey, P.J.; Dunbar, A.J. Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors. *Growth Factors*, 24(2):121-36, 2006.
26. Shrestha, P.; Huang, J.W.; Tsuji, T.; Shinozak, F.; Maeda, K.; Sasaki, K.; Ueno, K.; Yamada, K.; Mori, M. Rare expression of the c-erbB-2 oncoprotein in salivary gland tumors: an immunohistochemical study. *J. Oral Pathol. Med.*, 21(10): 477-80, 1992.
27. SPSS Incorporation SPSS for Windows (2003) Statistical Package for the Social Sciences Version 12.0 Chicago: SPSS Inc
28. Sugano, S.; Mukai, K.; Tsuda, H.; Hirohashi, S.; Furuya, S.; Shimosato, Y.; Ebihara, S.; Takeyama, I. Immunohistochemical study of c-erbB-2 oncoprotein overexpression in human major salivary gland carcinoma: an indicator of aggressiveness. *Laryngoscope*, 102(8): 923-27, 1992.
29. Suzuki, M.; Ichimya, I.; Matsushita, F.; Mogi, G. Histological features and prognosis of patients with mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland. *J. Laryngol. Otol.*, 112(10), 944-77, 1998.

30. Triantafyllidou, K.; Dimitrakopoulos, J.; Iordanidis, F.; Koufogiannis, D. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. *Oral Dis.* 12(4): 364-70, 2006.
31. Verbeek, B.S.; Adriaansen-Slot, S.S.; Vroom, T.M.; Beckers, T.; Rijksen, G. Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.*, 425(1):145-50, 1998.
32. Weed, D.T.; Gomez-Fernandez, C.; Pacheco, J.; Ruiz, J.; Hamilton-Nelson, K.; Arnold, D.J.; Civantos, F.J.; Zhang, J.; Yasin, M.; Goodwin, J.; Carraway, K.L. Muc4 and erbb2 expression in major and minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Head Neck* 26(4), 353-64, 2004.

Figure 1



1A – Histological features of low grade MEC (HE100x)

1B – Membranous (arrows) and cytoplasmic (arrowheads) immunorexpression of c-erbB-2 in MEC of mucous, intermediate and epidermoid cells (100x)

Table 1 - Clinicopathological features of mucoepidermoid carcinoma of salivary glands

Case	Age (years)	Gender ^a	Site	Malignancy grade	HER-2/neu expression
1	34	F	Retromolar area	Low	Negative
2	23	F	Buccal mucosa	Low	Negative
3	31	F	Floor of the mouth	Low	Positive (2+)
4	35	F	Palate	Intermediate	Negative
5	20	M	Palate	Low	Positive (2+)
6	35	F	Palate	Low	Positive (2+)
7	53	M	Palate	Low	Positive (2+)
8	66	F	Palate	Low	Negative
9	26	F	Palate	Low	Negative
10	60	M	Palate	Low	Positive (2+)
11	25	F	Palate	Intermediate	Positive (2+)
12	53	F	Palate	Low	Negative
13	14	M	Palate	Low	Negative
14	40	F	Palate	Low	Negative
15	55	F	Palate	Low	Negative
16	65	M	Retromolar area	Low	Negative
17	41	F	Palate	Low	Positive (3+)
18	64	F	Floor of the mouth	Low	Negative
19	73	F	Palate	Low	Negative
20	14	F	Palate	Low	Negative
21	43	F	Palate	Low	Negative
22	32	F	Palate	Low	Negative
23	16	F	Palate	Low	Negative
24	21	F	Retromolar area	Low	Positive (2+)
25	48	F	Retromolar area	Low	Negative
26	55	M	Palate	Low	Negative
27	23	F	Buccal mucosa	Low	Positive (2+)
28	36	F	Palate	Low	Negative
29	28	F	Palate	Low	Negative

^aF: feminine / M: masculine

5.2 ARTIGO 2

Dear DR.. AGUIAR MARIA CASSIA FERREIRA,

I am pleased to inform you that your paper entitled:

**A RARE CASE OF SCLEROSING MUCOEPIDERMOID CARCINOMA
ARISING IN MINOR SALIVARY GLANDS WITH
IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION**

submitted to MINERVA STOMATOLOGICA and registered with the number 3006, has been accepted as CASE REPORT by the Editorial Committee following the positive opinion of the referees.

After acceptance the paper was submitted to editorial revision and is currently being set. The proofs will be sent to you at the earliest.

I congratulate you and your co-authors and send you my very best regards.

Managing Editor
Prof. Alberto Oliaro

TITLE: A rare case of sclerosing mucoepidermoid carcinoma arising in minor salivary glands with immunohistochemical evaluation.

Authors:

1. Maria Cássia Ferreira AGUIAR^{a*}, PhD, DDS.
2. Vanessa de Fátima BERNARDES^a, MS, DDS.
3. Sérgio Vitorino CARDOSO^b, PhD, DDS.
4. Alvimar Afonso BARBOSA^c, PhD, DDS.
5. Ricardo Alves MESQUITA^a, PhD, DDS.
6. Maria Auxiliadora Vieira do CARMO^a, PhD, DDS.

Institutional affiliations:

^aDepartment of Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology. School of Dentistry. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

^bDepartment of Oral and General Pathology. School of Dentistry. Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

^cDepartment of Surgery. School of Medicine. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

***Correspondence to:**

Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar.
Faculdade de Odontologia da UFMG
Laboratório de Patologia Experimental 1- Sala 3201
Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha – Belo Horizonte, MG
31270-901 - Brasil
Tel.: (55 31) 3409 2476 - Fax: (55 31) 3409 2472
e-mail: cassiafa@ufmg.br

Acknowledgments: The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Foundation of Support to Research of Minas Gerais

(FAPEMIG) for assistance and financial support. Aguiar MCF, Carmo MAV, and Mesquita RA are research fellows of the CNPq.

Abstract: Mucoepidermoid carcinomas (MECs) are the most common malignancy of the salivary glands demonstrating a wide range of histologic variants and behavior. However, the sclerosing mucoepidermoid carcinoma (SMEC), a morphologic variant of this tumor is extremely rare and has been described almost exclusively in the major glands. The prominent sclerosis observed may obscure its typical morphological feature resulting in a diagnostic challenge. We describe herein a case of SMEC in a 43-year-old-woman occurring in the minor salivary glands of palate. To our knowledge only thirteen cases have been reported until this moment, being only two in minor salivary glands. We also performed the immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 and Ki-67, searching for an association with the histopathological findings and behavior.

Key words: Sclerosing, mucoepidermoid carcinoma, minor salivary gland tumors, Ki-67, c-erbB-2.

Introduction

Mucoepidermoid carcinomas (MECs) represent 29% to 34% of all carcinomas developing in the major and minor salivary glands. The histological diagnosis of the classical type of mucoepidermoid carcinoma is relatively straightforward. However, variations in its histopathological pattern may be encountered, causing difficulties in establishing the final diagnosis and doubts about the prognosis.^{1, 2} Thus, cases showing extensive sclerosis may obscure the typical morphological features of MEC, representing a challenge for diagnosis.^{3,4,5}

We describe a sclerosing mucoepidermoid carcinoma (SMEC) arising from minor salivary glands in the palate, and discuss the histopathological aspects of the lesion and the difficulty in establishing the degree of malignancy for this different type of neoplasm. We also explore the possible association between the immunohistochemical findings and behavior.

Case report

A 43-year-old woman presented with a complaint of a 2-year painful swelling over the right palatal area. Intraoral examination revealed an extra-osseous, non-ulcerated, firm, 40 x 40 mm tumor on the right maxilar tuber. No lymphadenopathy not other alteration were detected. With the main diagnostic hypothesis of glandular neoplasm an incisional biopsy was carried out and the specimen was sent for histopathological evaluation.

The specimen was a well demarcated, firm and roughly spherical tissue measuring 15x15x4 mm. Using routine techniques, tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and periodic acid Schiff's (PAS) reagent.

Microscopically, a densely hyalinized stroma could be observed interspersing nests of carcinomatous cells (Figures 1A and 1B). An admixture of mucous, epidermoid and intermediate cells was evident in tumor islands (Figure 1C). Scanty and irregular neoplastic ducts filled with mucinous material were visualized (Figure 1A). In addition, bundles of clear cells could be seen (Figure 1E). Moreover, numerous carcinomatous cells were filled with

intensely eosinophilic, intracytoplasmatic hyaline PAS positive granules suggesting a degenerative process (Figure 1F). The rupture of the duct-like structures and spillage of mucin into the stroma was readily observed. The stroma showed dense areas of sclerosis presenting few fibroblasts. Several foci of calcification were also present (Figures 1C and 1D). Based on these histologic features a diagnosis of sclerosing mucoepidermoid carcinoma was made. The tumor was considered as of low malignancy according to the histologic grading method of Auclair *et al.*⁶

In addition, immunohistochemical staining by the labeled streptavidin-biotin (LSAB) technique was also performed using Ki-67 (Clone K-3, Cell Marque Corp., 1:200 dilution) and c-erbB-2 (CB11, Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, UK, 1:200 dilution).

Positive immunolabelling for Ki-67 comprised less than 5% of the neoplastic cells and staining for c-erbB-2 was negative.

The patient was referred to a surgeon and the tumor was removed. Nineteen months after the surgery she has shown no side effects or complications nor evidence of metastases.

Discussion

The sclerosing morphologic variant of MEC (SMEC) is extremely rare and only two cases have been reported in the minor salivary glands.^{7,8} The cases described to date in the literature are summarized in table 1.^{3-5,7-11}

A case of low-grade mucoepidermoid carcinoma reported by Gray *et al.*¹² is presumably the first description of SMEC in salivary glands. However, Chan and Saw⁹ were the first to point out an extensive sclerosis in a mucoepidermoid carcinoma from parotid gland.

The following features are considered for the histologic diagnosis: a well-defined sclerotic lesion with limited but notable foci of low to high grade MEC; broad front; predominantly solid but few small cystic structures; striking fibrous scarring around the mucous pool; constant association and close intermingling with lymphoid proliferation; and repletion of eosinophils in some but not all lesions.^{1,5,8} Although lymphoid proliferation and the presence of eosinophils could not be demonstrated in the present case, clear cells and areas of calcification were visualized. Sinha *et al.*⁷ also described spotty calcification in their SMEC of minor salivary glands. The real significance of this finding in this lesion requires further investigation.

Carcinomatous cells filled with intensely eosinophilic, intracytoplasmic hyaline granules were also observed. It has been suggested that it may be a cellular degenerative process responsible for the presence of intense sclerosis.⁸ For some authors the pronounced sclerosis may be interpreted as an exaggerated inflammatory response to the extravasation of mucin, which results in the fibrous scarring and the destruction of the tumor islands.^{9,12} However, inflammatory areas could not be observed in the present case.

The general consensus is that salivary SMEC probably behaves in an indolent manner with prolonged survival.^{8,9} The present case showed the features of a low grade carcinoma with a prominent cystic pattern and predominance of mucous and intermediate

cells. However, in addition to histological grade, some immunohistochemical markers may be useful in assessing prognosis.^{13,14}

The c-erbB-2 oncoprotein is involved in inducing and maintaining oncogenesis in a number of human malignancies, including salivary gland neoplasms.¹⁵ Regarding mucoepidermoid carcinomas, some authors have reported that c-erbB-2 expression was more frequent in high grade tumors than in low grade ones.^{16,17}

Clinical significance of Ki-67 as a proliferative cell and a prognostic marker has been investigated in many types of human tumors including those of salivary gland origin. The prognostic value of Ki-67 expression was reported in mucoepidermoid cases including both major and minor salivary gland origin.¹³

Pires *et al.*¹⁸ evaluated a large series of patients with mucoepidermoid carcinoma and showed that Ki-67 expression correlated with a poor prognosis. For Okabe *et al.*¹⁹ Ki-67 was correlated with increased histologic grade in MEC. Nguyen *et al.*¹⁷ found positive c-erbB-2 staining and strong Ki-67 staining in patients with high grade MEC and suggested that both oncoproteins may serve as prognostic markers for poor outcome in salivary glands tumors.

To the best of our knowledge only two authors had studied Ki-67 index in SMEC^{3,5} and only one the immunoexpression of c-erbB-2.³ The present case was negative for c-erbB-2 and showed a low index for Ki-67. Moreover, after 19 months of follow-up, the patient is free of the disease. These findings are compatible with a low grade of malignancy but data are still limited. In some cases the marked sclerosis associated with proliferation of squamous epithelium-like cells can induce to a misdiagnosis of a high-grade malignant tumor.⁵ Thus, a clear distinction is important for select the adequate therapy. The use of Ki-67 and c-erbB-2 evaluation in a large number of cases may be helpful in the definition of the prognosis for SMEC.

Conclusion

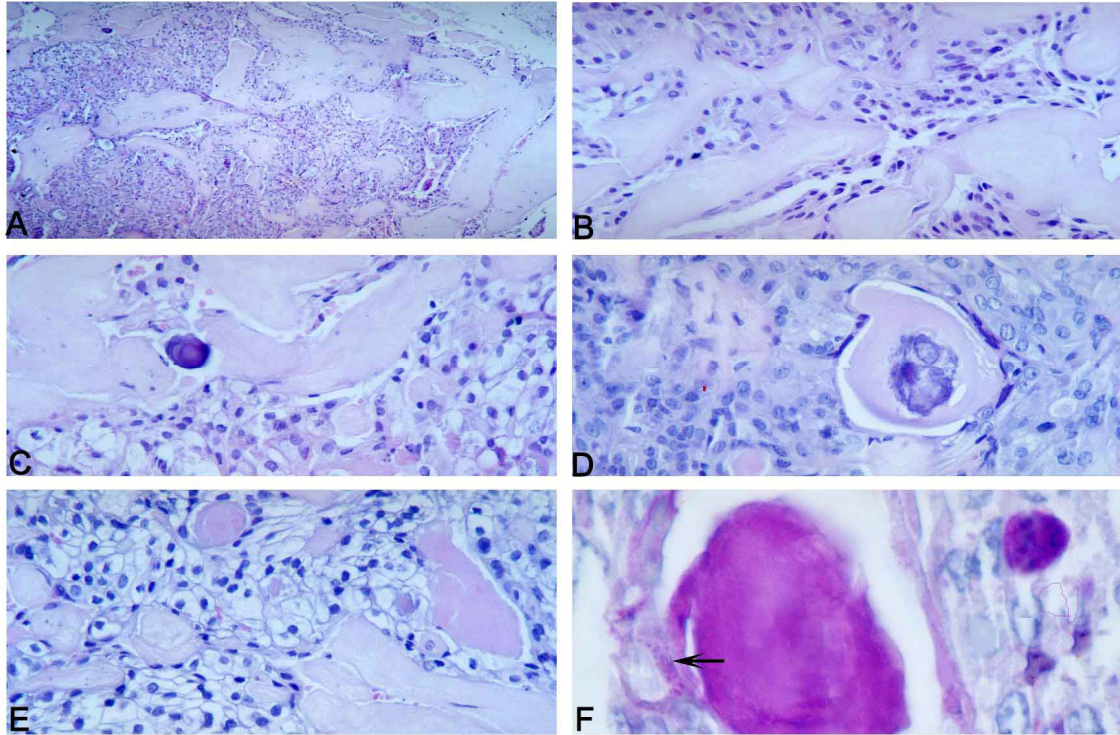
The sclerosing variant of MEC (SMEC) is an extremely rare neoplasm of salivary glands. This tumor apparently behaves like a low-grade malignant neoplasm but data are limited. The Ki-67 and c-erbB-2 immunostaining may be a reliable supplementary tool in assessing the behavior of this tumor.

References

1. Cheuk W, Chan JKC. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology* 2007;51:1-20.
2. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Beverly W, Fahmy A *et al.* Mucoepidermoid carcinoma - a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol* 2001;25:835-45.
3. Veras EFT, Sturgis E, Luna MA. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Ann Diagn Pathol* 2007;11:407-12.
4. Heavner SB, Shah RB, Moyer JS. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006;263:955-9.
5. Urano M, Masato A, Yoshimune H, Kuroda M, Mizoguchi Y, Sakurai K *et al.* Sclerosing mucoepidermoid carcinoma with eosinophilia of the salivary glands. *Pathol Res Pract* 2002;198:305-310.
6. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer* 1992;69:2021-30
7. Sinha S, Keogh IJ, Russell JD, Keane JCO. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a case report. *Histopathology* 1999;35:283-4.
8. Ide F, Obara K, Enatsu K, Mishima K, Saito I. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2005;34:187-9.
9. Chan JKC, Saw D. Sclerosing mucoepidermoid tumour of the parotid gland: report of a case. *Histopathology* 1987;11:203-7.
10. Muller S, Barnes L, Goodurn WJ Jr. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the parotid. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83:685-90.
11. Fadare O, Hileeto D, Gruddin YL, Mariappan R. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:1046-9.

12. Gray JM, Hendrix RC, French J. Mucoepidermoid tumors of salivary glands. *Cancer* 1963;16:183-194.
13. Skalova A, Lehtonen H, von Boguslawsky K, Leivo I. Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB 1 antibody in paraffin sections. *Hum Pathol* 1994;25:929-35.
14. Batsakis JG. Staging of salivary gland neoplasms: role of histopathologic and molecular factors. *Am J Surg* 1994;168:386-90.
15. Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J *et al.* Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 1994;54:5675-82
16. Cho KJ, Kim JY, Lee SS, Oh KK. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary gland--a clinico-pathologic and immunohistochemical study for c-erbB-2 oncoprotein. *J Korean Med Sci.* 1997;12:499-504.
17. Nguyen LHP, Black MJ, Hier M, Chauvin P, Rochon L. Her2/neu and Ki-67 as prognostic indicators in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *J Otolaryngol* 2003;32:328-31.
18. Pires FR, Almeida OP, Araújo VC, Kowalsky LP. Prognostic factors in head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:174-80.
19. Okabe M, Inagaki H, Murase T, Inoue M, Nagai N, Eimoto T. Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. *Mod Pathol* 2001;14:1008-14.

Figure 1



- A. Histological features of SMEC showing a dense hyalinized stroma segregated nests of neoplastic cells. Scanty irregularly shaped and sized neoplastic ducts filled with mucinous material (H&E 40x).
- B. High-power view showing sclerosis areas and epidermoid cells (H&E 400x).
- C. An admixture of mucous, epidermoid and intermediate cells. Fibrosis areas besides a calcification foci can be seen (H&E 400x).
- D. Foci of calcification inside a sclerosis nest (H&E 400x).
- E. Bundles of clear cells (H&E 400x).
- F. Eosinophilic granules (arrow) in carcinoma cells surrounding the spilled mucin (PAS 1000x).

Table I – Reported cases in previous literature regarding the sclerosing mucoepidermoid carcinoma of salivary glands

<i>Source</i>	<i>Age (years)/ Sex*</i>	<i>Primary</i>	<i>Size (cm)</i>	<i>Treatment</i>	<i>Follow-up (years)</i>
Chan and Saw, 1987	36 / F	Parotid gland	2,2x1,7	Partial parotidectomy	NA
Muller et al., 1997	17 / F	Parotid gland	2	Total parotidectomy	NA
Muller et al., 1997	60 / F	Parotid gland	2,5	Resection and RxT	NA
Sinha et al., 1999	65 / M	Minor salivary glands (parapharyngeal space)	5x4	Resection and RxT	NA
Urano et al., 2002	57 / F	Parotid gland	2,5x2	Partial parotidectomy	Metastasis / 36
Urano et al., 2002	43 / M	Submandibular gland	4,5x2,5	Total excision of submandibular gland	DOD / 84
Fadare et al., 2004	44 / F	Parotid gland	1,5	Total parotidectomy and RxT	NED / 84
Ide et al., 2005	28 / M	Minor salivary glands (retromolar pad)	2x2	Total excision	NA
Heavner et al., 2006	23 / F	Parotid gland	2x1	Total parotidectomy	NED / 12
Veras et al., 2007	70 / F	Parotid gland	4x3	Superficial parotidectomy	NED / 132
Veras et al., 2007	37 / M	Parotid gland	2,2x1x1	Superficial parotidectomy	NED / 204
Veras et al., 2007	49 / F	Parotid gland	1,6X1,7	Superficial parotidectomy	NED / 4
Veras et al., 2007	16 / F	Parotid gland	2	Superficial parotidectomy	NED / 10
Current report	43 / F	Minor salivary glands (palate)	4x4	Partial maxilectomy including tuber and pterigomaxilar area	NED / 19

*M: male, F: feminine, RxT: radiotherapy, NA: not available, NED: no evidence of disease, DOD: dead of disease

6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CME manifesta variável agressividade biológica, que se correlaciona ao estágio clínico e ao grau histológico de malignidade (Brandwein et al., 2001). A lesão apresenta ampla distribuição em relação à idade acometida, podendo apresentar um curso clínico indolente ou agressivo, dependente de diversos fatores a serem discutidos (Auclair et al., 1992; Brandwein et al., 2001). O tumor apresenta diversos padrões histológicos, variando de lesões relativamente circunscritas a tumores altamente invasivos (Evans, 1984; Nascimento et al., 1986). Padrões histopatológicos distintos, pouco freqüentes, como um dos casos da amostra desta pesquisa (artigo 2), também podem ser encontrados. Nesta situação, a diversidade no padrão histopatológico pode gerar dúvidas quanto à gradação, mas, em geral, esta variante é considerada de baixo grau de malignidade (Urano et al., 2002; Ide et al., 2005), assim como no caso descrito no artigo 2.

As características clinicopatológicas da amostra de CME neste estudo não fugiram aos relatos da literatura (Auclair et al., 1992; Lopes et al., 2006), embora tenha sido observado um maior acometimento de indivíduos na 3^a. e 4^a. décadas de vida. A ocorrência do CME praticamente em todas as faixas etárias não nos permite inferir que a sua predominância em indivíduos mais jovens seja uma característica da nossa amostra, mas talvez aponte uma tendência que deva ser melhor avaliada.

A grande maioria das lesões nesta amostra foi graduada como de baixo grau, o que guarda uma relação com a localização predominante das neoplasias em glândulas salivares menores, contemplada também por outros autores (Goode et al., 1998; Kokemueller et al., 2005). Nesta localização, em geral, o CME apresenta-se como lesão de baixo grau de malignidade, ao contrário do que ocorre em outras localizações, como, por exemplo, na glândula submandibular (Nagler et al., 2003; Weed et al., 2004). Infelizmente, foram poucos os casos em que foram obtidos

dados de acompanhamento, não sendo possível esta associação com as características clínicas ou gradação histológica das lesões.

Diversas características clínicas e histológicas têm sido consideradas no prognóstico do carcinoma mucoepidermóide, mas as mais consistentes são o estágio clínico e o grau de malignidade do tumor (Pires et al., 2004). Índices de sobrevida aos 5 anos variam de 92 a 100% em tumores de baixo grau, 62% a 92% em lesões de grau intermediário e de 0% a 43% em neoplasias de alto grau (Nascimento et al., 1986; Auclair et al., 1992; Brandwein et al., 2001). Tumores de graus intermediário e alto mostram maior tendência a infiltração, recorrência e metástase, com índices de cura relatados em 49%, 42% e 33% aos 5, 10 e 15 anos respectivamente (Krolls et al., 1972).

A influência do grau histológico no prognóstico da lesão é reforçada pela associação dos tumores de alto grau com o envolvimento nodal e com os maiores índices de recorrência (Guzzo et al., 2002).

Numerosos métodos de gradação têm sido propostos. Estes métodos baseiam-se principalmente na prevalência dos tipos celulares, componente intracístico e em fatores histológicos de progressão, como invasão linfática ou vascular, pleomorfismo celular, número de mitoses e padrão de crescimento (Brandwein et al., 2001).

Por estarmos lidando com amostras pequenas, a maioria proveniente de biópsias incisionais, o método escolhido para a gradação histológica dos tumores foi o de Auclair et al. (1992). Este sistema mostrou-se mais simples e de maior reprodutibilidade entre os observadores (resultados não mostrados). Ainda assim, Brandwein et al. (2001) apontam falhas neste sistema, como uma tendência à gradação do CME em lesão de baixo grau de malignidade. No sistema de

Brandwein et al. (2001), a inclusão de critérios como padrão de infiltração tumoral (em pequenas ilhas ou em ninhos sólidos), invasão linfática, vascular ou óssea, prováveis indicadores da evolução da lesão, pode levar a uma classificação mais real, fugindo da simples observação dos tipos celulares e formações císticas. No entanto, ao nosso ver, a identificação precisa destes componentes é mais confiável se feita com o auxílio de marcadores imunohistoquímicos (CD31, CD34, VEGF - fator de crescimento endotelial vascular, entre outros), demonstrados em alguns estudos (Al-Rawi et al., 2004; Zhang et al., 2005; Yuanming et al., 2007).

A investigação de outros marcadores prognósticos em neoplasias de glândulas salivares desperta interesse. No entanto, são poucos os estudos voltados para a investigação destes marcadores e, algumas vezes, tais pesquisas apresentam dados divergentes ou pequeno número de casos, gerando dificuldades no estabelecimento de marcadores confiáveis (Lopes et al., 2006).

Altos índices de PCNA foram associados a um curso mais agressivo em casos de CAC (Cho et al., 1999). Coexpressão de Ki-67 e c-erbB-2 associada a um curso clínico mais agressivo foi relatada em casos de neoplasias como adenocarcinoma, carcinoma ex-adenoma e carcinoma do ducto salivar (Kamio, 1996). Lim et al. (2003), em uma amostra de 45 neoplasias de glândulas salivares, entre elas, CAC, CME, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, carcinoma ex-adenoma e carcinoma de ducto salivar, identificaram fatores indicativos de pior prognóstico, como metástases linfonodais, superexpressão de p53, Ki-67 e VEGF. Superexpressão de Ki-67 foi associada a casos de carcinoma mucoepidermóide de alto grau, sendo que os tumores com baixo grau de malignidade apresentaram-se fracamente positivos, sugerindo-se que este marcador poderia refletir propriedades biológicas intrínsecas das neoplasias glandulares,

permitindo melhor entendimento do seu comportamento clínico (Nguyen et al., 2003).

Dados controversos foram observados por Felix et al. (1996). Estes autores não encontraram nenhuma associação dos índices de p53, PCNA e aneuploidia do DNA ao prognóstico em 30 casos de carcinoma do ducto salivar. No caso do CME, marcadores como Ki-67, PCNA e p53 têm sua expressão aumentada associada a lesões de comportamento mais agressivo (Nguyen et al., 2003; Pires et al., 2004; Lopes et al., 2006).

Por apresentarem similaridade histogenética, neoplasias de mama e de glândulas salivares podem apresentar, na sua patogênese, o envolvimento de alguns genes em comum, justificando-se a existência de investigações de genes relacionados ao carcinoma de mama, como o c-erbB-2, em outras neoplasias glandulares (Giannoni et al., 1995).

A superexpressão de c-erbB-2 tem sido descrita em neoplasias de glândulas salivares de alto grau de malignidade, tais como adenocarcinoma, carcinoma ex-adenoma e carcinoma do ducto salivar, mostrando-se como um fator prognóstico também em casos de lesões menos agressivas, como o carcinoma mucoepidermóide (Sugano et al., 1992; Felix et al., 1996; Press et al., 1994).

Com relação ao carcinoma mucoepidermóide, alguns estudos observaram associação positiva entre a superexpressão da proteína c-erbB-2, amplificação do gene e pior prognóstico (Nguyen et al., 2003).

É difícil estabelecer uma relação entre a expressão do c-erbB-2 e o prognóstico do CME, sendo o pequeno número de casos e a ausência de dados de acompanhamento, observados neste trabalho e citados por alguns autores, causas

relacionadas a esta dificuldade (Rosa et al., 1997; Cho et al., 1999; Gibbons et al., 2001).

Expressão variável da proteína c-erbB-2 no carcinoma mucoepidermóide é apresentada em alguns estudos, que exibem, em geral, índices de 0% a 24% dos tumores positivos (Kamio, 1996). Altas porcentagens de expressividade de c-erbB-2 foram relatadas neste tumor, correspondendo a 80% e 77,7% (Pires et al., 2004; Lopes et al., 2006) respectivamente. Os altos índices de imunexpressão encontrados por estes autores contrastam com nossos dados e com a maioria dos estudos voltados para esta lesão (Kernohan et al., 1991; Rosa et al., 1997; Gibbons et al., 2001). Esta variabilidade pode estar relacionada ao método de interpretação da marcação, já que, na maioria das vezes, não são detalhadas as formas de avaliação da imunexpressão, que é descrita apenas como positiva ou negativa (Rosa et al., 1997; Weed et al., 2004). A análise da imunexpressão em neoplasias de mama é feita de forma criteriosa, empregando-se os critérios recomendados pela DAKO (DAKO HercepTestTM, 1999). Apenas casos graduados como 3+ são considerados indiscutivelmente positivos, sendo direcionados para a imunoterapia. Casos 2+ devem ter a alteração do c-erbB-2 confirmada através de FISH (Skalova et al., 2003; Madrid e Lo, 2004; Vera-Roman e Rubio-Martinez, 2004). Ainda que não tenhamos a comprovação de que esta forma de análise deva ser também aplicada às neoplasias de glândulas salivares, este trabalho empregou o mesmo critério na avaliação dos resultados. Apenas um caso foi classificado como grau 3+ em nossa amostra.

A imunistoquímica é uma técnica amplamente utilizada na avaliação do *status* de c-erbB-2, visto que é um procedimento relativamente de baixo custo, fácil execução e que apresenta resultados confiáveis (Skalova et al., 2003; Gouvea et al.,

2006). A análise de vários estudos revelou, no entanto, discrepâncias no anticorpo utilizado para identificar a proteína c-erbB-2, procedimentos laboratoriais e critérios de avaliação da expressão (Dori et al., 2002). Questiona-se a viabilidade desta proteína após os processos de fixação e inclusão em parafina, visto que a maioria delas apresenta perda de reatividade após tais procedimentos. O grau de perda desta reatividade também é alterado com o decorrer do tempo de inclusão (Kernohan et al., 1991; Rosa et al., 1997; Dori et al., 2002).

A utilização de anticorpos monoclonais é um fator a ser considerado, pois permite maior confiabilidade nos resultados obtidos, minimizando a possibilidade de falso-positivos (Dori et al., 2002; Gouvea et al., 2006). O anticorpo monoclonal utilizado neste estudo (NCL-CB11, Novocastra) apresenta alta sensibilidade e especificidade, com altos níveis de concordância com a técnica FISH (Gouvea et al., 2006).

Algumas desvantagens na avaliação da expressão da proteína c-erbB-2 através da técnica imunohistoquímica puderam ser observadas neste estudo, como a interpretação subjetiva da intensidade de marcação, a natureza semiquantitativa dos resultados e a possibilidade de alterações entre os procedimentos imunohistoquímicos. As tentativas de minimização destas situações foram feitas através da utilização de controles positivos, do processamento imunohistoquímico do maior número possível de casos e da análise conjunta dos casos processados em uma mesma bateria (Dori et al., 2002; Nahta e Esteva, 2006).

A marcação citoplasmática da proteína observada neste estudo e relatada por alguns autores pode ser considerada um artefato devido ao processamento do tecido ou devido ao processo de internalização da membrana, sugerindo uma marcação inespecífica e de origem ainda não esclarecida (Kernohan et al., 1991;

Press et al., 1994; Etges et al., 2003). A expressão de c-erbB-2 em 100% dos casos de CAC, na amostragem de Shintani et al. (1995), pode estar relacionada ao fato de os autores considerarem a marcação citoplasmática na avaliação da positividade, discordante da forma de análise deste e de outros estudos (Kamio, 1996; Cho et al., 1999; Dori et al., 2002; Gouvea et al., 2006).

Outra dificuldade que pode estar associada à técnica imunoistoquímica consiste naqueles casos, em especial carcinomas de mama, que se apresentam negativos para a imunoexpressão da proteína, apesar de ser demonstrada a amplificação gênica (Sapino et al., 2003). O contrário também ocorre, envolvendo inclusive neoplasias de glândulas salivares, onde, apesar de identificada a superexpressão da proteína, não ocorre amplificação gênica (Skalova et al., 2003, Locati et al., 2005). Especula-se que a recuperação antigênica possa aumentar a sensibilidade dos testes imunoistoquímicos e, conseqüentemente, casos não amplificados podem ser interpretados como falso-positivos na análise imunoistoquímica. Além disso, supõe-se que a superexpressão da proteína não seja controlada somente pelo grau de amplificação do gene, mas também pela transcrição deste e degradação da proteína (Skalova et al., 2003). Dificuldades semelhantes de interpretação têm sido observadas em carcinomas de mama (Sapino et al., 2003; Skalova et al., 2003; Locati et al., 2005).

Assim, alguns autores sugerem a investigação da amplificação gênica de c-erbB-2 em neoplasias onde observa-se expressão imunoistoquímica da proteína categorizada como 2+ a fim de se estabelecer um planejamento adequado ao tratamento da lesão (Skalova et al., 2003; Madrid e Lo, 2004; Vera-Roman e Rubio-Martinez, 2004).

A raridade de expressão da proteína c-erbB-2 e a variabilidade no padrão de marcação constituem características observadas em algumas neoplasias de glândulas salivares, o que foi constatado neste trabalho e anteriormente verificado por alguns autores (Kernohan et al., 1991; Glisson et al., 2004; Locati et al., 2005).

Características clínicas do carcinoma mucoepidermóide associadas a comportamento biológico desfavorável referem-se a idade avançada do paciente, maior extensão do tumor e presença de sintomas, como dor ou parestesia (Goode et al., 1998). Maiores índices de sobrevida são observados em pacientes jovens, enquanto pacientes acima de 60 anos apresentam tendência a pior prognóstico (Brandwein et al., 2001). Na amostra desta pesquisa, não foi possível a análise entre características clinicopatológicas e tempo de sobrevida devido ao pequeno número de casos.

Sugano et al. (1992) observaram comportamento clínico mais agressivo, caracterizado por maior extensão, margens cirúrgicas positivas e metástases linfonodais, em casos de adenocarcinoma em glândulas salivares positivos para c-erbB-2 em relação aos tumores que se apresentaram negativos, porém, não houve correlação entre a positividade e o grau de diferenciação histológica do tumor. Na amostra utilizada nesta pesquisa, não foi possível analisar características como margens cirúrgicas ou presença de metástases, uma vez que se trata de material de arquivo, além de consistirem em espécimes pequenos, obtidos de biópsias incisionais. Referindo-se à associação entre grau histológico de malignidade e expressão da proteína c-erbB-2, a classificação do maior número de casos como lesão de baixo grau de malignidade apresentou-se como uma limitação para a análise estatística. A baixa expressão de c-erbB-2 na amostra pode também ser

uma conseqüência do grande número de casos classificados em baixo grau de malignidade.

No estudo de Sugano et al. (1992), superexpressão da proteína foi associada à maior agressividade apenas nos casos de adenocarcinomas. Entre 29 casos de carcinoma de ducto salivar analisados para a expressão de c-erbB-2, 9 apresentaram-se fracamente positivos e 12 exibiram marcação moderada a intensa, sendo observada associação positiva entre a superexpressão da proteína e menor tempo de sobrevida. Foram destacados como fatores prognósticos características como tamanho da lesão, metástases distantes e amplificação de c-erbB-2 (Felix et al., 1996). Em uma amostra de 30 casos de CAC, foi verificada associação positiva entre a superexpressão de c-erbB-2 e menor tempo de sobrevida livre da doença (Cho et al., 1999).

Outros estudos identificaram imunopositividade para c-erbB-2 em CME, com índice de 38% de lesões positivas, com variáveis graus de intensidade, além de maior tendência à marcação positiva em lesões de maior extensão. Houve associação positiva entre a expressão de c-erbB-2 e recidiva da lesão, e entre a expressão da proteína e menor tempo de sobrevida (Press et al., 1994).

Apesar de serem difíceis as comparações entre estudos devido à quantidade de amostras, técnicas realizadas e métodos de interpretação, sugere-se a associação positiva entre a superexpressão de c-erbB-2 em CME e menor tempo de sobrevida livre da doença (Weed et al., 2004).

No presente trabalho, a inexistência de relação entre a imunexpressão do c-erbB-2 e as características clinicopatológicas do CME não exclui a participação deste oncogene na patogenia desta lesão. No entanto, a preconização deste marcador como indicador prognóstico deve ser melhor analisada. As interferências

da técnica, o estabelecimento de uma forma de análise e a pesquisa das alterações do gene devem ser considerados antes de se apontar ou excluir o c-erbB-2 como possível fator prognóstico para o carcinoma mucoepidermóide.

7 - CONCLUSÕES

Diante dos resultados, referindo-se à amostra avaliada, podem ser elaboradas as seguintes conclusões:

- O carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares acomete principalmente indivíduos do sexo feminino, sendo a terceira e quarta décadas de vida as mais afetadas.
- A variante esclerosante do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares é rara, apresentando baixo grau de agressividade e bom prognóstico para o indivíduo acometido.
- O carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares apresenta baixo índice de imunexpressão de c-erbB-2.
- A expressão de c-erbB-2 em carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares não foi associada às características clinicopatológicas, como idade e sexo do paciente, localização e grau de malignidade da lesão.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31(2):117-21.
2. Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, editors. *Surgical pathology of the salivary glands*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1991. p.269-98.
3. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer*. 1992;69(8):2021-2030.
4. Batsakis JG, Luna MA. Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: I. Mucoepidermoid carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1990;99(10Pt1):835-8.
5. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Myers MH. Manual for staging of cancer, 3rd ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1988. p.52. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, editors. *Surgical pathology of the salivary glands*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1991. p.51-56.
6. Birek C, Lui E, Jordan RCK, Dardick I. Analysis of c-erbB-2 amplification in salivary gland tumours by differential polymerase chain reaction. *Oral Oncol, Eur J Cancer*. 1994;30B(1):47-50.
7. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Beverly W, Fahmy A et al. Mucoepidermoid carcinoma - a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *The Am J Surg Pathol*. 2001;25(7):835-45.
8. Cho KJ, Lee SS, Lee YS. Proliferating cell nuclear antigen and c-erbB-2 oncoprotein expression in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. *Head Neck*. 1999;21(5):414-9.
9. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, Chen E, Gray A, McGrath J et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985;230(4730):1132-9.
10. da Cruz Perez DE, Pires FR, Alves FA, Almeida OP, Kowalski LP. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2004;68(7):895-902.
11. Dako. Dako HercepTestTM. A manual for interpretation, 1999.
12. Dori S, Vered M, David R, Buchner A. HER2/neu expression in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 2002;31(8):463-7.

13. Ellis GR, Auclair PL. Atlas of tumor pathology – tumors of the salivary glands. fasc. 17. 3.ed., Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1996.
14. Etges A, Pinto DS, Kowalski LP, Soares FA, Araújo VC. Salivary duct carcinoma: immunohistochemical profile of an aggressive salivary gland tumor. *J Clin Pathol.* 2003;56(12):914-18.
15. Evans HL. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a study of 69 cases with special attention to histologic grading. *Am J Clin Pathol.* 1984;81(6):696-701.
16. Felix A, El-Naggar AK, Press MF, Ordonez NG, Fonseca I, Tucker SL et al. Prognostic significance of biomarkers (c-erbB-2, p53, proliferating cell nuclear antigen, and DNA content) in salivary duct carcinoma. *Human Pathol.* 1996;27(6):561-6.
17. Foote FW Jr, Frazell EL. Tumors of the major salivary glands. *Cancer,* 1953;6(6):1065-133.
18. Giannoni C, El-Naggar AK, Ordoñez NG, Tu ZN, Austin J, Luna MA et al. C-erbB-2/neu oncogene and Ki-67 analysis in the assessment of palatal salivary gland neoplasms. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;112(3):391-8.
19. Gibbons MD, Manne U, Carroll WR, Peters GE, Weiss HL, Grizzle WE. Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope.* 2001;111(8):1373-8.
20. Glisson B, Colevas AD, Haddad R, Krane J, El-Naggar A, Kies et al. HER2 expression in salivary gland carcinomas: dependence on histological subtype. *Clin Cancer Res.* 2004;10(1):944-6.
21. Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod Pathol.* 2005;18(8):1015-21.
22. Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands. Clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer.* 1998;82(7):1217-24.
23. Gouvea AP, Milanezi F, Olson SJ, Leitao D, Schmitt FC, Gobbi H. Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006 14(1):103-8.

24. Guzzo M, Andreola S, Sirizzotti G, Cantu G. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: clinicopathologic review of 108 patients treated at the National Cancer Institute of Milan. *Annals of Surgical Oncology*. 2002;9(7):688-95.
25. Haddad R, Colevas AD, Krane JF, Cooper D, Glisson B, Amrein PC et al. Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study. *Oral Oncol*. 2003;39(7):724-7.
26. Healey WV, Perzin KH, Smith L. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. Classification, clinical-pathologic correlation, and results of treatment. *Cancer*. 1970;26(2):368-88.
27. Ide F, Obara K, Enatsu K, Mishima K, Saito I. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(3):187-9.
28. Issing WJ, Dreps A, Heppt WJ, Wustrow TP, Riederer A, Zagury JF. erbB-2/Her-2 gene amplification and overexpression in parotid gland tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1993;250(3):150-3.
29. Jordan R, Dardick I, Lui E, Birek C. Demonstration of c-erbB-2 oncogene overexpression in salivary gland neoplasms by in situ hybridization. *J Oral Pathol Med*. 1994;23(5):226-31.
30. Kamio N. Coexpression of p53 and c-erbB-2 proteins is associated with histological type, tumour stage, and cell proliferation in malignant salivary gland tumours. *Virchows Arch*. 1996;428(2):75-83.
31. Kernohan NM, Blessing K, King G, Corbett IP, Miller ID. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in salivary gland tumours: an immunohistochemical study. *J Pathol*. 1991;163(1):77-80.
32. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of the growth factor receptors. *Adv Cancer Res*. 2000;77:25-79.
33. Kokemueller H, Brueggemann N, Swennen G, Eckardt A. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands – clinical review of 42 cases. *Oral Oncology*. 2005;41(1):3-10.
34. Krolls SO, Trodahl JN, Boyers RC. Salivary gland lesions in children. A survey of 430 cases. *Cancer*. 1972;30(2):459-69.
35. Kumamoto H, Sasano H, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasama R. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in breast

- carcinoma: application in screening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy. *Pathol Int.* 2001;51(8):579-84.
36. Lim JJ, Kang S, Lee MR, Pai HK, Yoon HJ, Lee JI et al. Expression of vascular endothelial growth factor in salivary gland carcinomas and its relation to p53, Ki-67 and prognosis. *J Oral Pathol Med.* 2003;32(9):552-61.
37. Locati, LD, Rinaldi G, Bossi P, Licitra L. Herceptin® plus chemotherapy in relapsed and/or metastatic salivary gland cancer (Correspondence). *Oral Oncol.* 2005;41(1):97-8.
38. Lopes MA, da Cruz Perez DE, de Abreu Alves F, de Almeida OP, Kowalski LP. Clinicopathologic and immunohistochemical study of intraoral mucoepidermoid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;134(4):622-6.
39. Madrid MA, Lo RW. Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. *Breast Cancer Res.* 2004;6(5):R593-600. Epub 2004 Jul 29.
40. Martinez-Barba E, Cortes-Guardiola JA, Minguela-Puras A, Torroba-Caron A, Mendez-Trujillo S, Bermejo-Lopez J. Salivary duct carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical studies. *J Craniomaxillofac Surg.* 1997;25(6):328-34.
41. Miller RT, Kubier P, Reynolds B, Henry T, Turnbow H. Blocking of endogenous avidin-biotin activity in immunohistochemistry. The use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. *Appl Imm Mol Morphol.* 1999;7(1):63-5.
42. Müller S, Vigneswaran N, Gansler T, Gramlich T, DeRose PB, Cohen C. C-erbB-2 oncoprotein expression and amplification in pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma: relationship to prognosis. *Mod Pathol.* 1994;7(6):628-32.
43. Nagler RM, Kerner H, Ben-Eliezer S, Minkov I, Ben-Itzhak O. Prognostic role of apoptotic, Bcl-2, c-erbB-2 and p53 tumor markers in salivary gland malignancies. *Oncology.* 2003;64(4):389-98.
44. Nahta R, Esteva FJ. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin Cancer Res.* 2003;9(14):5078-84.
45. Nahta R, Esteva FJ. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett.* 2006;232(2):123-38.

46. Nascimento AG, Amaral LP, Prado LA, Kligerman J, Silveira TR. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a clinicopathologic study of 46 cases. *Head Neck Surg.* 1986;8(6):409-17.
47. Nguyen LHP, Black MJ, Hier M, Chauvin P, Rochon L. Her2/neu and Ki-67 as prognostic indicators in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *J Otolaryngol.* 2003;32(5):328-31.
48. Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastoma. *Cell.* 1982;28(4):865-71.
49. Peles E, Yarden Y. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays.* 1993;15(12):815-24.
50. Pires FR, Almeida OP, Araújo VC, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(2):174-80.
51. Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res.* 1994;54(21):5675-82.
52. Rosa JC, Felix A, Fonseca I, Soares J. Immunoexpression of c-erbB-2 and p53 in benign and malignant salivary neoplasms with myoepithelial differentiation. *J Clin Pathol.* 1997;50(8):661-3.
53. Sapino A, Coccorullo Z, Cassoni P, Ghisolfi G, Gugliotta P, Bongiovanni M, et al. Which breast carcinomas need HER-2/neu gene study after immunohistochemical analysis? Results of combined use of antibodies against different c-erbB2 protein domains. *Histopathology.* 2003;43(4):354-62.
54. Shintani S, Funayama T, Yoshihama Y, Alcalde RE, Ootsuki K, Terakado N et al. Expression of c-erbB family gene products in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: an immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 1995;15(6B):2623-6.
55. Skalova A, Starek I, Vanecek T, Kucerova V, Plank L, Szepe P, et al. Expression of HER-2/neu gene and protein in salivary duct carcinomas of parotid gland as revealed by fluorescence in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology.* 2003; 42(4):348-56.

56. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
57. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-12.
58. SPSS Incorporation. SPSS for Windows. Statistical Package for the Social Sciences. Versão 12.0, 2003. Chicago: SPSS Inc.
59. Stancovski I, Sela M, Yarden Y. Molecular and clinical aspects of the Neu/ErbB-2 receptor tyrosine kinase. *Cancer Treat Res*. 1994;71:161-91.
60. Sugano S, Mukai K, Tsuda, Hirohashi S, Furuya S, Shimosato Y et al. Immunohistochemical study of c-erbB-2 oncoprotein overexpression in human major salivary gland carcinoma: an indicator of aggressiveness. *Laryngoscope*. 1992;102(8):923-7.
61. Supanaranond K, Sukarayodhin S, Tanyakaset M, Balachandra K, Jullaksorn D, Rienkijkarn M et al. The significance of HER-2/neu/c-erbB-2 gene amplification in benign and malignant breast disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997;28(3):631-40.
62. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1467-72.
63. Triantafillidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, Koufogiannis D. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. *Oral Dis*. 2006;12(4):364-70.
64. Urano M, Abe M, Horibe Y, Kuroda M, Mizoguchi Y, Sakurai K, Naito K. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma with eosinophilia of the salivary glands. *Pathol Res Pract*. 2002;198(4):305-10.
65. Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA. Comparative assays for the HER-2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(6):627-33.
66. Weed DT, Gomez-Fernandez C, Pacheco J, Ruiz J, Hamilton-Nelson K, Arnold DJ. MUC4 and ERBB2 expression in major and minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Head Neck*. 2004;26(4):353-64.

67. Yuanming L, Feng G, Lei T, Ying W. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers in human gastroenteric tumor. *Arch Med Res.* 2007;38(1):106-12.
68. Zhang J, Peng B, Chen X. Expressions of nuclear factor kappaB, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7334-43.