

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

MODALIDADE ARTIGO (S) CIENTÍFICO (S)

EXPRESSÃO DA PROTEINA KI-67 E DA GLICOPROTEINA MUC1 EM
CARCINOMAS MUCOPEPIDERMÓIDE DE GLÂNDULAS SALIVARES MENORES.

Implicação Prognóstica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DEFESA

ALUNA: CINTIA FERREIRA GONÇALVES

ORIENTADOR: PROF. DR. ELISMAURO FRANCISCO DE MENDONÇA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. ALINE CARVALHO BATISTA

GOIÂNIA 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MODALIDADE ARTIGO (S) CIENTÍFICO (S)

EXPRESSÃO DA PROTEINA KI-67 E DA GLICOPROTEINA MUC1 EM
CARCINOMAS MUCOPEPIDERMÓIDE DE GLÂNDULAS SALIVARES MENORES.

Implicação Prognóstica

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Clínica Odontológica da
Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal de Goiás como requisito para obtenção
do título de mestre.

ALUNA: Cintia Ferreira Gonçalves

ORIENTADOR: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Aline Carvalho Batista

Goiânia 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG

G635e	Gonçalves, Cintia Ferreira. Expressão da proteína Ki-67 e da glicoproteína MUC1 em carcinomas mucoepidermóide de glândulas salivares menores. Implicação prognóstica [manuscrito] / Cintia Ferreira Gonçalves. - 2009. xii, 78 f. : il., figs, tabs. Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça; Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Odontologia, 2009. Bibliografia. Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas. Apêndices. 1. Carcinoma Mucoepidermóide 2. Glândula salivar menor I. Título. CDU: 616.316-006.6
-------	--

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ALUNA: CINTIA FERREIRA GONÇALVES

ORIENTADOR: PROF. DR. ELISMAURO FRANCISCO DE MENDONÇA

MEMBROS:

1. PROF. DR. ELISMAURO FRANCISCO DE MENDONÇA
2. PROF. DR. MÁRCIO AJUDARTE LOPES
3. PROF. DR. CLÁUDIO MARANHÃO PEREIRA

SUPLENTE:

PROFA. DRA. MARIA ALVES GARCIA SANTOS SILVA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

DATA: 22/05/2009

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Moacir e Vilma, aos meus irmãos Frederico e Lidianne, aos meus sobrinhos, Caio Fernando e Lara, e aos meus avós, Moisés e Guimar, pela presença e incentivos fundamentais em minha vida.

Agradecimentos

A Deus, meu sustento, minha força, meu amparo, minha rocha. A Ele, toda a gratidão do meu coração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça, por ter despertado em mim, um desejo profundo de conhecimento pelo diagnóstico das doenças da boca. Além disso, fomentou minha dedicação, zelo e respeito pelo paciente que necessita de cuidados relativos às doenças da boca, seja no diagnóstico ou tratamento das mesmas.

À Profa. Dra. Aline Carvalho Batista, minha co-orientadora, agradeço por despertar e gerar em mim, o interesse pela pesquisa laboratorial, mostrando-me uma nova possibilidade de caminho a seguir.

À Dra. Rita de Cássia Gonçalves Alencar que com sua delicadeza, alegria e acolhimento, me mostrou como caminhar em momentos fundamentais do desenvolvimento desse trabalho. Além disso, seu testemunho de vida levou-me a trabalhar e lutar pela minha vida e por este trabalho com mais afinco.

À Dra. Eliane Duarte da Costa que abriu as portas do laboratório de Anátomo-patologia do Hospital Araújo Jorge para a busca dos casos e realização da fase laboratorial desse trabalho.

À amiga, Profa. Ilda Gonçalves Machado Fiúza por fazer parte do meu processo de formação profissional como odontopediatra, além de ter me incentivado a lutar por um espaço na pós-graduação de uma Universidade Federal.

À Profa. Maria Alves por mostrar que existe um lado muito especial da docência, com o qual me identifico bastante, uma docência humanizada, através dos momentos culturais nas aulas de Diagnóstico por Imagem.

Aos colegas do mestrado, Cláudia, Eduardo, Érika Tatiane, Fabiana, Francine, Gláucia, Karlla, Luciano, Paula, Andréia, Angélica, Aleimar, Antônio Hélio, Érica, Evelin, Geovane, Henrique, Karine, Karla, Larissa, Leandro, Lila, Ludmilla e Nádia pelo companheirismo suscitado nos momentos de alegria e também de ansiedade, como nos seminários.

Aos meus amigos, Pe. Xavier, Aninha, Antuniara, Cíntia Borges, Claudinha, Graciela, Janaininha, Josi, Lasten, Lucimar e Sandra, pessoas que independente se perto ou distantes fisicamente, me incentivaram e estiveram presentes, nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Às funcionárias do CGDB, Cláudia e Fabiana, que tão bem me acolheram e ensinaram sobre como receber o paciente de forma objetiva e cuidadosa simultaneamente.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia da FO/UFG, Erildo e Simone, pela paciência, dedicação e doação ao ensinar a rotina de trabalho do mesmo.

Aos funcionários, Eterno, Marilene, Gustavo e Rosana, do Laboratório de Anátomo-patologia do Hospital Araújo Jorge, meus sinceros agradecimentos por executarem etapas fundamentais e distintas desse trabalho científico.

Às Universidades Renovadas (MUR) por ter despertado em mim, o desejo e amor pela docência, através da contribuição na formação de profissionais à luz da Fé e da Razão. Muito obrigada, pois o sonho primeiro da docência nasceu em meu coração através desse sopro do Espírito.

Sumário

	SÍGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	viii
	RESUMO.....	ix
	ABSTRACT.....	x
1.	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	13
2.	JUSTIFICATIVA.....	29
3.	OBJETIVOS.....	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.	PUBLICAÇÃO.....	37
6.	CONCLUSÕES / CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
7.	REFERÊNCIAS.....	67
8.	ANEXOS E APÊNDICE.....	73

Siglas, Símbolos e Abreviaturas

ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
AFIP	<i>The Armed Forces Institute of Pathology / Instituto de Patologia das Forças Armadas</i>
Bcl-2	<i>Oncoproteína envolvida na apoptose</i>
CEA	<i>Carcino-embryonic Antigen / Antígeno Carcino-embriogênico</i>
C-erb2	<i>Oncoproteína relacionada a receptores de crescimento</i>
CGDB	<i>Centro Goiano de Doenças da Boca</i>
CME	<i>Carcinoma Mucoepidermóide</i>
ER	<i>Estrógeno Receptor</i>
FO	<i>Faculdade de Odontologia</i>
GH	<i>Gradação Histológica</i>
HAI	<i>Hospital Araújo Jorge</i>
HE	<i>Hematoxilina Eosina</i>
MEC	<i>Mucoepidermoid Carcinoma / Carcinoma Mucoepidermóide</i>
mm²	<i>Milímetro Quadrado</i>
MUC1	<i>Mucin Cancer Antigen 1 / Antígeno para Mucina 1</i>
NR	<i>Not Related / Não Relatado</i>
PAS	<i>Schiff Periodic Acid / Ácido Periódico Schiff</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen /Antígeno Nuclear de Proliferação Celular</i>
RAD	<i>Radiotherapy/Radioterapia</i>
TGS	<i>Tumor de Glândula Salivar</i>
TNM	<i>Tumor Primário/Metástase Regional/Metástase à Distância</i>
UFG	<i>Universidade Federal de Goiás</i>
WLE	<i>Wide Local Excision / Excisão Local Ampla</i>

Resumo

Objetivos: Investigar a significância prognóstica dos índices de proliferação celular e da atividade mucossecretora no Carcinoma Mucoepidermóide (CME) de glândulas salivares menores de cavidade oral através da imunoexpressão da proteína Ki-67 e da glicoproteína MUC1 em indivíduos jovens e adultos, correlacionando-os aos parâmetros clínico-patológicos.

Material e métodos: De 1987 a 2007, foram diagnosticados 35 casos de CME em glândulas salivares menores. Dados clínicos e demográficos foram obtidos dos prontuários, diagnóstico microscópico revisitado e os espécimes foram reclassificados, quanto à gradação histológica. Análises qualitativas e quantitativas da expressão da proteína Ki-67 e da glicoproteína MUC1, obtidas por imunoistoquímica, foram correlacionadas às variáveis: idade, gênero e gradação histológica, visando suas implicações prognósticas.

Resultados: Os casos de CME (n=35) foram mais freqüentes em indivíduos acima dos 30 anos (60%), com predileção para o gênero feminino (1,7:1). O palato duro foi o sítio de maior ocorrência (54,3%). 42,9% foram de baixo grau; 37,1% intermediário e 20% alto grau. Foi observada uma maior expressão de Ki-67 para os adultos e de MUC1 para os jovens, embora, com resultados estatisticamente não significantes (Ki-67 / $P=0,44$ e MUC1 / $P=0,5$). Além disso, não foi observada relação prognóstica entre o gênero masculino e feminino, apesar da maior expressão de ambos marcadores para o gênero masculino (Ki-67 / $P=0,58$; MUC1 / $P=0,4$). Quanto à gradação histológica os tumores de grau intermediário e alto grau apresentaram maior expressão para ambos marcadores, embora, sem significância estatística (Ki-67 / $P=0,18$; MUC1 / $P=0,6$).

Conclusões: O CME em glândula salivar menor pode apresentar tendência à menor atividade de proliferação celular no paciente jovem do que no adulto; no gênero

feminino do que no gênero masculino, e em tumores de baixo grau histológico do que intermediário e alto grau. Além disso, este tumor pode apresentar tendência a maior atividade mucossecretora no indivíduo jovem que no adulto, no gênero masculino que no feminino e em tumores de intermediário e alto grau que em tumores de baixo grau histológico.

Abstract

Aims: Investigate the prognostic significance of cellular proliferation indexes and mucosecretional activity in Mucoepidermoid Carcinoma (MEC) of oral cavity minor salivary glands using the immunoexpression of the protein Ki-67 and the glycoprotein MUC1 in young people and adults, by correlating these markers to clinical and pathological parameters.

Material and methods: From 1987 to 2007, 35 cases of MEC were diagnosed in minor salivary glands. Demographic clinical data were obtained from clinical records, the microscopic diagnosis was revisited and the specimens were reclassified in terms of histologic grading, according to the system used by Batsakis & Luna (1990). Qualitative and quantitative analyses of the expression of Ki-67 protein and MUC1 glycoprotein, obtained through immunohistochemistry, were correlated to the variables: age, gender and histologic grading.

Results: The cases of MEC (n=35) were more frequently found in people over thirty (60%), with predilection for females (1.7:1) and occurred most frequently in the hard palate (54.3%). Of the cases studied, 42.9% were low grade, 37.1% intermediate and 20% high grade. A greater expression of Ki-67 was found for adults while the greater expression for young people was MUC1, although neither result was statistically significant (Ki-67 / $P=0.44$ e MUC1 / $P=0.5$). In addition no prognostic relation was seen between male and female, despite the greater expression of both markers for males (Ki-67 / $P=0.58$; MUC1 / $P=0.4$). In terms of histologic grading intermediate and high grade tumors presented a greater expression for both markers, but without any statistical significance (Ki-67 / $P=0.18$; MUC1 / $P=0.6$).

Conclusions: MEC in minor salivary glands could present a tendency of lesser aggressiveness in younger patients when compared to adults; in females when compared to males, and in tumors of low histologic grade when compared to those of intermediate or high

grade. Furthermore, this tumor may have a tendency to higher mucossecretory activity in young than in adults, in males than in females and in intermediate and high grade tumors.

1. Caracterização do Problema

1.1 Características Gerais do CME:

O CME foi primeiramente descrito por Stewart et al. em 1945. Estes autores utilizaram o termo “*tumor mucoepidermóide*”, para caracterizar uma entidade distinta entre os tumores de glândulas salivares e os classificaram em tumores “*relativamente favoráveis*” e “*altamente não favoráveis*”. Desde então esta neoplasia tem sido alvo de inúmeras controvérsias na literatura. Oito anos após sua primeira identificação, em 1953, Foote & Frazell observaram metástases em alguns tumores classificados como benignos, fato que indicou a necessidade de se instituir um novo sistema de gradação. A partir desse acontecimento, a nomenclatura desta neoplasia passou de tumor mucoepidermóide para carcinoma mucoepidermóide (Foote & Frazell, 1953; Glassman, 1983).

A etiopatogênese do CME não está bem esclarecida na literatura, no entanto, há trabalhos relacionando-a com alterações genéticas, e outros que afirmam que a exposição à radiação ionizante é um fator de contribuição para seu desenvolvimento, especialmente após tratamento de neoplasias primárias, como o carcinoma de tireóide e a leucemia (Luna, 2006) e após o tratamento de histiocitose (Healey et al. 1970).

De acordo com a histogênese o CME é uma neoplasia epitelial maligna composta por proporções variáveis de células mucosas, epidermóides, intermediárias, colunares e claras e, freqüentemente, demonstra proeminente crescimento cístico (Auclair et al. 1992). Geralmente é classificado em baixo (Anexos-Figura 1), intermediário (Anexos-Figura 2) ou alto grau (Anexos-Figura 3). O CME de baixo grau é caracterizado por múltiplos macrocistos e microcistos bem desenvolvidos e presença predominante de células mucosas quando comparadas às células intermediárias ou epidermóides, além disso, geralmente ocorre acúmulo de mucina no interior da cavidade cística, caracterizando uma alta atividade

mucossecretora. Este extravasamento de mucina pode gerar reação inflamatória no estroma tumoral. Geralmente é observado na sua interface um infiltrado linfocitário com provável arranjo germinal central. De acordo com Handra-Luca et al. (2005), ainda são necessários mais estudos para caracterizar o papel deste infiltrado linfocitário no possível mecanismo de proliferação celular tumoral e na resposta imune do hospedeiro.

Já no CME de grau intermediário há redução do número de espaços císticos quando comparados ao CME de baixo grau. Há predominância das células intermediárias e formação de ilhas sólidas, com moderado pleomorfismo e raras mitoses, entretanto, o nucléolo é mais proeminente que no CME de baixo grau. Sua distinção básica do CME de baixo grau é baseada na proporção relativa de áreas celulares sólidas e císticas, além da predominância de células intermediárias (Auclair et al. 1992; Goode et al. 1998). A variante de alto grau é caracterizada predominantemente por proliferações celulares sólidas epidermóides e intermediárias, com alto grau de atipia, anaplasia, múltiplas mitoses e necrose. Este tipo de tumor é infiltrativo e invasões perineurais e linfovasculares são facilmente encontradas (Auclair et al. 1992; Goode et al. 1998), além disso, há uma produção escassa de mucina, caracterizando, portanto, uma baixa atividade mucossecretora, sendo necessário método especial para identificá-la (Luna 2006), como por exemplo a coloração de Periodic Acid Schiff (PAS), mucicarmin, Alcian Blue, as quais tem como finalidade identificar áreas mucóides.

O CME é o tumor maligno mais freqüente que se origina de glândula salivar menor e maior e representa um terço de todos os tumores malignos de glândulas salivares (Auclair et al. 1992; Jones et al. 2008). Em torno de 60% dos CMEs ocorrem em glândulas salivares maiores e 35% em glândulas salivares menores. A glândula parótida é o sítio predominante, representando 48% dos casos, com 11% nas glândulas submandibulares e 1% na glândula sublingual. Embora este tumor seja bem descrito na literatura com relação a sua freqüência,

poucos estudos abordam seu comportamento biológico, sendo que a maioria destes engloba glândulas salivares maiores e menores (Cardoso et al. 2000; Hicks & Flaitz, 2000; Guzzo et al. 2002; Mannweiler et al. 2003; da Cruz Perez et al. 2004; Alos et al. 2005; Handra-Luca et al. 2005; Rapidis et al. 2007), portanto, há poucos estudos investigativos restritos a glândulas salivares menores (Yin et al. 2000; Okabe et al. 2001; Triantafillidou et al. 2006). Estas lesões em glândulas salivares menores geralmente estão localizadas na cavidade oral sendo importante que o cirurgião dentista esteja apto a reconhecer e promover o diagnóstico e encaminhamento para o tratamento oncológico (Epstein et al. 2004).

O palato e a mucosa jugal são os sítios mais freqüentes para o CME de glândulas salivares menores, seguidos pela área retromolar, língua, gengiva, soalho da boca e fossa nasal (Nascimento et al. 1986; Auclair et al. 1992, Vargas et al. 2002; Ito et al. 2005, Jaber 2006). Em condições normais as glândulas salivares menores apresentam variação na atividade mucossecretora de acordo com a sua localização anatômica. As glândulas salivares menores, por exemplo, localizadas no palato, região glossofaríngea, nariz e bordas da língua são principalmente mucosas e as do lábio, sublingual e jugal são predominantemente seromucosas (Cawson et al. 1994). Talvez daí a explicação para que o palato seja o sítio mais acometido, pois nesta localização a atividade mucossecretora é predominantemente mucosa.

O CME apresenta comportamento insidioso sendo que apenas 13% dos pacientes relatam sintomatologia dolorosa associada ao tumor. Pacientes que apresentam CME em glândulas salivares menores têm diversas apresentações clínicas e que podem estar relacionadas ao grau histológico (Auclair et al. 1992; Goode et al. 1998; Brandwein et al. 2001). O CME em glândulas salivares menores, geralmente mimetiza neoplasias benignas e condições inflamatórias (Anexos-Figura 4). Em geral as lesões localizadas no palato são flutuantes, de coloração azulada, superfície lisa e edemaciada lembrando fenômenos de retenção de muco como mucocelos (Stewart et al. 1945; Auclair et al. 1992).

1.2 Idade:

Uma característica importante no CME é a sua maior prevalência em pacientes adultos, sendo mais freqüentes entre a terceira e quinta décadas de vida (Stewart et al. 1945; Conley & Tinsley, 1985; Lopes et al. 2006). Quando comparado a outros tumores malignos de glândulas salivares menores o CME é o de maior ocorrência entre indivíduos jovens (Dahlqvist & Östberg 1982; Seifert et al. 1986; Bradley et al. 2007), entretanto, na literatura há poucos trabalhos que apontem com clareza a relação da idade e o desenvolvimento do CME (Lopes et al. 2006).

Na literatura pesquisada alguns autores relataram em suas casuísticas que a maioria dos casos de CMEs em crianças e adolescentes, foi graduada quanto à microscopia como tumores de baixo grau de malignidade. Estes autores ressaltaram que tumores de baixo grau em indivíduos jovens apresentaram um melhor prognóstico tendo em vista que a possibilidade de óbito é praticamente nula (Kroll et al. 1973; Seifert et al. 1986).

De maneira semelhante Conley & Tinsley (1985) encontraram em seus resultados que 72% dos casos de CME em pacientes até 16 anos de idade foram classificados como baixo grau de malignidade e de acordo com estes autores o prognóstico do CME em indivíduos jovens foi consideravelmente melhor do que no indivíduo adulto. Entretanto, os autores se basearam para esta assertiva no fato que da série por eles investigada, nenhum paciente jovem foi a óbito pela doença.

Fonseca et al. (1991) investigaram em um período de 30 anos tumores de glândulas salivares de origem epitelial em crianças e adolescentes no sul de Portugal. De um total de 759 casos de tumores de glândulas salivares, apenas 24 casos foram diagnosticados em indivíduos abaixo de 18 anos de idade. Sete tumores foram diagnosticados como malignos, sendo 05 CME e desses, apenas um estava localizado no palato. Com referência a gradação

histológica os casos de CME foram classificados como tumores de baixo grau e apresentaram prognóstico mais favorável neste grupo de indivíduos, que o grupo de indivíduos adultos. Embora os autores também tenham relacionado o fator idade a tumor bem diferenciado quanto à gradação histológica não há dados que expliquem esta relação.

Outro estudo importante a respeito de tumores de glândulas salivares (TGS) em crianças e adolescentes foi desenvolvido por Cruz Perez et al. em 2004. Este estudo investigou 53 casos de TGS e correlacionou variáveis clínicas (ênfase para sobrevida) e patológicas (imunoexpressão para p53, PCNA, Ki-67, bcl-2, c-erbB-2 e CEA), utilizando método imunoistoquímico. Do total de tumores investigados 39,6% foram diagnosticados como CME tanto em glândula salivar maior quanto menor. Uma informação relevante em seus resultados foi que 87,5% dos casos de CME em indivíduos abaixo de 18 anos de idade foram classificados como tumores de baixo grau, o que favoreceu o prognóstico dos mesmos, entretanto os autores também não estabeleceram uma explicação para a relação idade, baixo grau de malignidade e prognóstico.

Lopes et al. (2006), através de um estudo retrospectivo com dados dos prontuários e com base na proliferação celular investigando o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e relacionado-o à sobrevida com fins de avaliar prognóstico, verificaram que indivíduos com idade abaixo de 40 anos apresentaram uma melhor sobrevida em 10 anos quando comparados aos indivíduos com faixa etária acima de 40 anos. Estes resultados lhes permitiram afirmar que, de acordo com a idade, pacientes abaixo de 40 anos de idade apresentaram melhor prognóstico que pacientes acima de 40 anos.

Já o estudo de Guzzo et al. (2006) que investigou 108 casos de CME em glândulas salivares maiores e menores, divididos em alto e baixo grau de acordo com os critérios de Auclair & Goode (1992), teve como objetivo correlacionar características clínicas e

patológicas com a média de sobrevida dos indivíduos. Uma observação importante deste estudo foi que quando analisados separadamente os casos de CMEs de glândulas salivares maiores e menores, o sistema de gradação utilizado implicou no prognóstico. Além disso, os autores observaram que o sistema de gradação quando relacionado à idade indicou um melhor prognóstico em pacientes abaixo de 40 anos. Entretanto, esta investigação não explicitou qual critério foi utilizado para definir a relação da idade com o melhor prognóstico. Há referência dos autores que em glândula salivar maior há, proporcionalmente, menor prevalência de tumores de baixo grau quando comparados às glândulas salivares menores.

Como pode ser observado pela literatura acima descrita há uma relação do fator idade e a gradação histológica de tumores bem diferenciados ou de baixo grau com o prognóstico, entretanto, há poucos estudos investigando esta relação. Este fato levou-nos a questionar se a idade apresentaria alguma influência no prognóstico do CME em indivíduos jovens e adultos. Diante disto algumas perguntas ainda precisam de respostas, tais como: o CME em indivíduos jovens realmente tem um melhor prognóstico do que em indivíduos adultos? O índice de proliferação celular e a atividade mucossecretora são diferentes no indivíduo jovem quando comparado ao adulto?

1.3 Gênero:

Outro aspecto que desperta atenção no CME é a sua predileção para o gênero feminino, com proporção de 2:1 (Stewart et al. 1945; Conley & Tinsley 1985; Mannweiler et al. 2003; Pires et al. 2006; Buchner et al. 2007; Jones et al. 2008), entretanto, não existem trabalhos que expliquem tal predileção, ou mesmo trabalhos sobre a influência do gênero no prognóstico. É interessante ressaltar que existem dois trabalhos na literatura cujos resultados foram contrários a estes, ou seja, houve uma maior predileção do CME para o gênero masculino, os quais encontraram uma proporção de 1:1.4 (Guzzo et al. 2006) e 1:1.6 (Rapidis et al. 2007). Como

pode ser observado, portanto, na dependência da grande maioria das séries investigadas, existe um maior acometimento do CME para o gênero feminino. Este fato em especial levou-nos a questionar qual a razão do gênero feminino ser mais acometido e se esta predileção teria alguma relação com o prognóstico deste tumor em glândulas salivares menores e em indivíduos jovens e adultos.

É importante destacar que um dos poucos trabalhos que investigou a influência do gênero relacionado à sobrevida é o trabalho de Lopes et al. (2006), que encontrou ao longo de 10 anos de acompanhamento pós-tratamento de 27 casos de CME, uma sobrevida de 100% para o gênero feminino e de 67% para o gênero masculino. Entretanto, os autores não explicam o porquê deste resultado. Há apenas um comentário dos mesmos que o CME apresentou uma maior sobrevida nos indivíduos do gênero feminino que no gênero masculino.

De forma semelhante Guzzo et al. (2006) encontraram uma melhor sobrevida, após cinco anos, para o gênero feminino (83,8%) que para o gênero masculino (52,2%). É importante ressaltar que no estudo de Monoo et al. (2003), eles observaram que o CME nos indivíduos do gênero feminino estava associado a tumores de baixo grau de malignidade, enquanto os indivíduos do gênero masculino estava associado a tumores de alto grau. Diante, portanto, destes dados questionamos se o gênero realmente poderia influenciar no comportamento biológico e conseqüente prognóstico do CME.

1.4 Gradação Histológica:

Atualmente o prognóstico do CME tem sido estabelecido principalmente através da combinação da gradação histológica, da adequada excisão do tumor e do seu estágio clínico. Esta premissa vem desde o trabalho de Stewart et al. (1945), seguido por diversas publicações

que indicaram a importância da gradação histológica de malignidade do CME (Spiro et al. 1978; Auclair et al. 1992; Brandwein et al. 2001).

Dos sistemas vigentes podemos destacar os quatro mais citados na literatura (Anexo 1) - Batsakis & Luna (1990), Seifert et al. (1990), Auclair, Goode e Ellis (1992) e Brandwein et al. (2001) - embora não exista um consenso sobre qual critério de gradação histológica é o mais fiel para representar o comportamento biológico desta neoplasia e estabelecer seu prognóstico (Luna 2006), apesar de quase meio século de tentativas. Em nosso estudo optamos por revisitar nossas amostras e classificá-las de acordo com o sistema proposto por Batsakis & Luna (1990). Estes autores realizaram adaptação do sistema proposto por Healey et al. (1970) acrescentando aspectos como a arquitetura do tumor, o padrão de invasão, tipo de célula predominante, pleomorfismo celular, proeminência do nucléolo, frequência de figuras mitóticas, presença de fibrose e infiltrado inflamatório. A razão, portanto, da escolha deste critério foi porque este sistema é bastante completo, reproduzível e por apresentar significância prognóstica (Luna 2006).

O estudo do comportamento biológico e dos mecanismos moleculares do CME vem ganhando significativo avanço nos últimos tempos através da identificação de determinadas proteínas, utilizando a técnica de imunoistoquímica (Handra-Luca et al. 2005). Uma das proteínas que apresenta comportamento alterado durante o ciclo celular é a proteína Ki-67 (Gerdes et al. 1983; Gerdes et al. 1984). Além desta proteína, estudos recentes demonstraram que a célula tumoral mucossecretora promove uma alteração na produção de mucina, o que pode ser conferido através da sua imunoexpressão (Gendler & Spicer 1995). Grande parte desses estudos avaliou o comportamento biológico tumoral e a significância prognóstica através da comparação e/ou associação entre expressão de determinadas proteínas e a gradação histológica (Hicks & Flaitz 2000; Yin et al. 2000; Okabe et al. 2001; Mannweiler et

al. 2003; da Cruz Perez et al. 2004; Alos et al. 2005; Handra-Luca et al. 2006; Triantafillidou et al. 2006).

Em nosso estudo investigamos a proteína Ki-67 e a glicoproteína MUC1. Segue abaixo algumas informações pertinentes a ambas, descritas na literatura.

1.4.1 Proteína Ki-67:

A proteína Ki-67 está presente em todas as fases do ciclo celular com exceção da fase G0. A imunexpressão do antígeno nuclear Ki-67 detectada por imunistoquímica é um método confiável de avaliar a fração de crescimento normal e neoplásico de populações de células humanas e quando positiva, portanto, apresenta marcação nuclear (Gerdes et al. 1983; Gerdes et al. 1984; Yin et al. 2000; Okabe et al. 2001).

Yin et al. (2000) avaliaram a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax, p53 e Ki-67 em 71 CMEs de glândulas salivares menores e relacionaram esta imunexpressão à gradação histológica bem como à sobrevida. De acordo com a gradação histológica 26 casos foram classificados como grau I, 25 casos como grau II e 20 casos como grau III de malignidade. Dentre os resultados encontrados foi observado que os tumores de grau II e III apresentaram mais alta frequência de expressão positiva da proteína Ki-67 que os tumores de grau I e uma significante melhor média de sobrevida em indivíduos Ki-67 negativos. De acordo com estes autores a imunexpressão da proteína Ki-67 no CME tem valor prognóstico principalmente quando considerada a variável sobrevida.

Hicks & Flaitz em 2000 realizaram um estudo clinicopatológico em 26 crianças e adolescentes com média de idade de 11 anos, distribuídos na proporção de 2,7:1 para o gênero feminino, portadores de CME em glândulas salivares maiores e menores, no qual foi investigado a relação dos marcadores de proliferação celular PCNA e Ki-67. Os casos foram classificados quanto à gradação histológica de malignidade de acordo com Batsakis e Luna

(1990). A média percentual específica para o Ki-67 de acordo com o grau foi: tumores de baixo grau (7%); grau intermediário (12%) e alto grau (26%). De acordo com estes resultados os autores concluíram que o índice de proliferação celular detectado pela presença de células Ki-67 positivas pode estar associado ao grau histológico de malignidade e pode fornecer informação referente ao comportamento biológico do CME em glândulas salivares em crianças e adolescentes.

Além disso, Hicks & Flaitz (2000) verificaram que a atividade proliferativa estava também associada à sobrevida, independente do grau histológico. Aproximadamente 75% dos pacientes com CME que apresentaram frações maiores que 8% morreram da doença com uma sobrevida média menor que 4 anos. Já quando comparado com os casos que apresentaram fração proliferativa maior que 10%, aproximadamente 90% dos indivíduos morreram da doença com uma média de sobrevida de 1,6 anos. Diante disto, os autores inferiram que a proporção de células tumorais em fase proliferativa influencia a mortalidade e reduz consideravelmente a média de sobrevida do paciente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Cardoso et al. (2000), entretanto, estes autores avaliaram a relação entre o grau histológico de malignidade do CME de glândulas salivares menores e maiores e a expressão de PCNA, um marcador de proliferação celular. Neste estudo, 11 casos foram investigados e os autores observaram uma correlação entre o grau histológico do tumor e o aumento de marcação para PCNA, ou seja, tumores de alto grau apresentaram maior imunoexpressão que os tumores de grau baixo e intermediário. Os autores sugeriram que a avaliação da expressão de PCNA em CMEs de glândulas salivares pode ser usada como um procedimento complementar para a classificação apropriada desse tumor.

Okabe et al. (2001) realizaram um estudo com o objetivo de investigar a expressão da proteína p27 uma inibidora da proliferação celular e da proteína Ki-67 reconhecida como

estimuladora da proliferação celular, através de imunoistoquímica em 31 casos de CME de glândulas salivares menores. A expressão de p27 foi inversamente proporcional à gradação histológica dos tumores, ou seja, sua menor expressividade foi relacionada a tumores de alto grau de malignidade, portanto, a um pior prognóstico. Ao passo que a imunoexpressão de Ki-67 foi diretamente proporcional à gradação histológica, isto é, quanto menor sua expressividade, menor o grau histológico de malignidade e melhor o prognóstico do tumor. Neste estudo não foi observada correlação entre a expressão de p27 e Ki-67. Os autores concluíram que a expressão de p27 pode ser um importante fator de risco para avaliação de sobrevida livre de doença e sobrevida total em pacientes portadores de CME de glândula salivar menor. Neste estudo não foi possível estabelecer um valor prognóstico para a expressão de Ki-67, embora tenham sido encontradas células positivas para esta proteína.

Por outro lado, Cruz Perez et al. em 2004, realizaram um estudo onde avaliaram clínica e histopatologicamente 53 tumores de glândulas salivares menores e maiores em indivíduos abaixo de 18 anos. Do total, 26 casos foram diagnosticados como malignos (39,6%), os quais foram avaliados por técnica de imunoistoquímica para identificação das proteínas p53, PCNA, Ki-67, c-erbB-2, CEA e bcl-2, enquanto os tumores benignos foram investigados quanto à expressividade para as proteínas p53, Ki-67 e bcl-2. Dos tumores malignos o CME foi a neoplasia mais freqüente, representado por 21 casos (80,7%) e a maioria classificados como tumor de baixo grau (85,7%) com prognóstico favorável, embora recorrência e morte pelo tumor tenham sido observadas. Os casos de CME apresentaram imunoexpressão variável para Ki-67 e PCNA, desde negativa a positiva. Além disso, neste estudo não foi observada correlação da imunoexpressão de p53, PCNA, Ki-67, c-erbB-2, CEA, bcl-2 com o prognóstico dos tumores de glândula salivar investigados.

Triantafillidou et al., em 2006, investigaram a imunoexpressão da proteína Ki-67, em 16 casos de CMEs de glândulas salivares menores classificados quando ao grau histológico de

malignidade com base nos critérios da OMS propostos por Seifert et al. (1990). Neste estudo a imunexpressão da proteína Ki-67 foi somente de 1% para os tumores de baixo grau, 3 a 4% para os tumores de grau intermediário e 10% para os tumores de alto grau, percentual obtido da contagem de pelo ou menos 1000 células com aumento de 400x. Os resultados indicaram que o aumento do percentual de positividade da proteína Ki-67 foi proporcional ao aumento da gradação histológica e que estes achados podem contribuir com informações adicionais sobre o prognóstico desse tumor.

1.4.2 Glicoproteína MUC1:

As mucinas (MUCs) são glicoproteínas de alto peso molecular secretadas por glândulas salivares e células epiteliais do aparelho digestivo, respiratório e reprodutivo, as quais têm a função de proteção e regulação (Gendler & Spicer 1995). As secreções das glândulas salivares da mucosa bucal são altamente especializadas pois fornecem fluidos lubrificantes, evitam danos mecânicos, protegem de forma eficaz contra infecções virais e bacterianas e promovem a depuração de poluentes externos. Esse muco protetor contém grandes glicoproteínas denominadas mucinas que contribuem efetivamente para a natureza viscoelástica da saliva e afetam a sua complexa atividade fisiológica. A proteína das mucinas consiste de seqüências repetitivas, ricas em serina e treonina O-glicosiladas, as quais contêm muitos resíduos de prolina quebra-hélice. Esses recursos são responsáveis pela extensão e estrutura rígida da molécula, por um elevado volume hidrodinâmico, elevada densidade flutuante e alta viscosidade (Wu et al. 1994).

As MUCs são classificadas em dois grandes grupos: MUCs expressas ou associadas à membrana (MUC1, MUC3, MUC4, MUC11 e MUC12) e MUCs secretadas (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7). A glicoproteína MUC1 foi identificada nos ductos de glândulas salivares menores, sem alterações patológicas, por Sengupta et al. (2001), os quais

demonstraram que quando presente no glicocálix bucal normal, a única fonte de MUC1 é a membrana celular dessas glândulas. Com base nisso, estes autores sugeriram novos estudos em glândulas salivares menores afetadas por doença. Por outro lado, em carcinomas e lesões metastáticas, a expressão de MUC1 é significativamente aumentada e a glicosilação é alterada. Além disso, esta glicoproteína apresenta marcação da membrana celular e citoplasmática (Gendler & Spicer 1995).

Em glândulas salivares normais a MUC1 é expressa somente no lado apical (luminal) das células. Entretanto, na maioria das células tumorais, esta polarização é perdida, havendo uma super expressão de MUC1 em toda superfície celular, o que pode justificar a desestabilização da adesão entre as células e a migração de células tumorais para dentro do estroma, linfa e vasos sanguíneos, favorecendo a metástase (Hiraga et al. 1998; Irimuna et al. 1999).

No CME todos os tipos celulares (células mucosas, epidermóides, intermediárias, claras e colunares) apresentam marcação citoplasmática e de membrana para MUC1 (Alos et al. 2005). Este fato indica que durante o desenvolvimento do processo tumoral há uma grande alteração na produção da glicoproteína MUC1, o que foi comprovado anteriormente em carcinomas de mama (Brockhausen et al. 1995).

Mannweiler et al. (2003) avaliaram a expressão de MUC1 e MUC2 em 91 tumores de glândulas salivares menores e maiores e 10 amostras de tecido glandular não-neoplásico por imunoistoquímica. O intuito deste estudo foi verificar se havia diferenças no padrão de expressão destas glicoproteínas em tecidos neoplásicos e não neoplásicos e se estas diferenças contribuiriam na classificação das neoplasias. Do total de tumores, nove foram classificados como CME e apresentaram marcação positiva para MUC1, com percentual de 50-90% independente do tipo celular, com marcação fortemente positiva nas células mucosas e intermediárias. Já para o MUC2 a positividade foi de 2-25% para as células tumorais. Quando

correlacionado com a gradação histológica de acordo com os critérios da OMS (1990), independente de ser alto e baixo grau, o padrão de expressão foi similar para ambos marcadores. Quando analisadas as glândulas salivares normais, os autores observaram um padrão heterogêneo de positividade para MUC1 e MUC2 nos ductos excretores. A MUC1 marcou principalmente células que estavam localizadas diretamente acima da membrana basal. Em síntese os autores concluíram que a expressão tanto de MUC1 quanto de MUC2 nos diferentes tipos de neoplasias e em especial no CME através da técnica de imunoistoquímica pode ser útil para classificar tumores de glândulas salivares, além disso, a presença de MUC1 pode oferecer novas estratégias terapêuticas nos casos de doença progressiva, uma vez que as mucinas podem proteger as células tumorais dos mecanismos de defesa do organismo, além de gerar nestas epítomos imunogênicos, os quais podem estar envolvidos no reconhecimento e eliminação imunológicos.

Alos et al., em 2005 investigaram o padrão de expressão de mucinas de membrana (MUC1 e MUC4) e mucinas secretadas (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 e MUC7) em 40 casos de CME de glândulas salivares menores e maiores e 22 espécimes de glândulas salivares normais. A MUC1 foi positiva para todos os tipos celulares com marcação citoplasmática e de membrana e foi relacionada com a gradação histológica, de acordo com os critérios da AFIP (1992) e Brandwein et al. (2001). Quando analisado o intervalo de sobrevida, os autores observaram que os casos com mais de 50% de células positivas apresentaram um intervalo livre de doença menor que os casos que apresentaram 50% ou menos dessas células. Setenta e cinco por cento dos casos com metástase linfonodal apresentaram percentual acima de 50% de células MUC1⁺. Os autores concluíram que a transformação maligna de glândulas salivares em CME está associada com mudanças no padrão de expressão de mucinas e que esta expressão pode ser utilizada com finalidade de diagnóstico. Por exemplo, MUC1 e MUC4 são fortemente reativos na membrana e no

citoplasma de células neoplásicas. MUC5AC, MUC5B e MUC6 são freqüentemente expressos em tecido glandular bem diferenciado, já MUC2 e MUC7 são raramente expressos. A diferenciação tumoral para MUC1 e MUC4 é modulada de maneira peculiar em relação à expressão. A alta expressão de MUC1 e baixa expressão de MUC4 são características de tumores pobremente diferenciados e mais agressivos e o contrário é observado para tumores de baixo grau.

Handra-Luca et al. (2005) investigaram 63 casos de CME, por imunoistoquímica, para as glicoproteínas MUC1, MUC2, MUC4 e MUC5AC, com o intuito de verificar se a marcação de mucinas poderia contribuir para melhor caracterizá-lo. O padrão da expressão e os tipos de células marcadas foram registrados. Os resultados foram comparados com a gradação histológica, metástase linfonodal, características clínicas e preservação. MUC1 e MUC4 marcaram a membrana apical de células glandulares e toda a membrana das células intermediárias, claras e epidermóides, enquanto o MUC2 e MUC5AC foram expressas no citoplasma de células intermediárias, glandulares e epidermóides. A MUC1, contrariamente a MUC4, apresentou maior expressão à medida que a gradação tumoral foi maior. Também, foi observado que a expressão de MUC1 se relacionou com um intervalo de sobrevida livre da doença mais curto, portanto, a sua expressão foi indicativa de um pior prognóstico.

Como pode ser observado o CME em glândula salivar menor ainda requer investigações com referência ao seu comportamento biológico tendo como base a atividade proliferativa e mucossecretora relacionadas às variáveis clínicas. Na sequência apresentamos as razões que justificam a nossa pesquisa.

2. Justificativa

Tomando como base:

1. O fato de o CME ser a neoplasia maligna de glândula salivar mais freqüente entre indivíduos adultos e jovens (Seifert et al. 1986; Bradley et al. 2007; Lopes et al. 2006);
2. Escassez de estudos comparativos referentes ao comportamento biológico do CME em indivíduos jovens e adultos, investigando proliferação celular e atividade mucossecretora por meio de imunoistoquímica (Lopes et al. 2006); escassez de trabalhos investigativos restritos ao CME em glândulas salivares menores de cavidade oral (Yin et al. 2000; Okabe et al. 2001; Triantafillidou et al. 2006);
3. A maior freqüência do CME no gênero feminino (Stewart et al. 1945; Conley & Tinsley, 1985; Mannweiler et al. 2003; Pires et al. 2006; Buchner et al. 2007; Jones et al. 2008) e a ausência de trabalhos investigativos e comparativos sobre comportamento biológico entre os gêneros feminino e masculino;
4. A importância de contribuir com o entendimento da significância do valor prognóstico da gradação histológica quando correlacionada ao índice de proliferação celular - proteína Ki-67 - (Yin et al. 2000; da Cruz Perez et al. 2004; Okabe et al. 2001; Hicks & Flaitz 2000; Triantafillidou et al. 2006) e à atividade mucossecretora - glicoproteína MUC1 (Mannweiler et al. 2003; Alos et al. 2005; Handra-Luca et al. 2006) - no CME de glândulas salivares menores;
5. Ausência de estudos relacionando atividade de proliferação celular com atividade mucossecretora em CME.

Diante, portanto, das razões acima elencadas e da caracterização do problema, suportadas pela literatura investigada, nossa hipótese de estudo foi que o CME poderia

apresentar diferenças no comportamento biológico entre indivíduos jovens e adultos. Além disso, que a sua maior predileção relatada para o gênero feminino poderia também influenciar no prognóstico. Não obstante isso foi investigada também a possibilidade da gradação histológica de malignidade apresentar relação com o comportamento biológico tumoral.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral:

Investigar o valor prognóstico de variáveis clínicas e patológicas no CME de glândulas salivares menores de cavidade oral, tomando como base o índice de proliferação celular e a atividade mucossecretora.

3.2 Objetivos Específicos:

1. Investigar se há diferenças na atividade proliferativa e mucossecretora através da imunoexpressão da proteína Ki-67 e da glicoproteína MUC1 respectivamente em indivíduos jovens e adultos;
2. Verificar a influência do gênero no valor prognóstico, tendo como base o percentual de proliferação celular (Ki-67) e atividade mucossecretora (MUC1);
3. Relacionar atividade de proliferação celular (Ki-67) e atividade mucossecretora (MUC1) com a gradação histológica de malignidade de acordo com os critérios estabelecidos por Batsakis e Luna (1990).

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção, seleção e caracterização da amostra

Este estudo foi desenvolvido de acordo com as normas que regulamentam pesquisas com material biológico, humano e animal, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG - protocolo número 107/2007 (Anexo 3).

As obtenções das amostras foram realizadas nos arquivos de laudos e blocos dos Laboratórios de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG) e do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG). Um total de 35 casos de CME de glândulas salivares menores de cavidade oral constituíram a amostra deste estudo. Além dos casos de CME, cinco casos de tecido glandular não neoplásico de glândulas salivares menores, sem sinais de inflamação, foram utilizados para estabelecer o padrão de normalidade do índice de proliferação celular e da atividade mucossecretora.

Como critérios de inclusão foram considerados os blocos de peças cirúrgicas, com espécimes de CME que apresentavam boas condições para manipulação e que permitiram cortes suficientes para o desenvolvimento da pesquisa, com sobra para o arquivo. Os critérios para exclusão levaram em consideração os blocos que não foram encontrados nos arquivos e aqueles que apresentavam estado de conservação indesejável para o desenvolvimento da pesquisa, ou ainda os casos que não corresponderam ao diagnóstico revisitado. Para os casos de tecido de glândula salivar normal foram selecionados cortes que continham tecido glandular normal livre de inflamação e/ou infecção.

Todas as amostras foram novamente cortadas e coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE) e Periodic Acid Schiff (PAS), para identificação de áreas mucóides. O diagnóstico microscópico foi revisado por dois patologistas independentes (EFM & ACB) que

também classificaram as amostras quanto a gradação histológica de malignidade, de acordo com os critérios propostos por Batsakis e Luna (1990) – (Anexo 1) , possibilitando a constituição de dois grupos: grupo 1- tumores de baixo grau de malignidade e grupo 2 - constituído por tumores de grau intermediário e alto grau, devido à semelhança histológica entre estes tumores e ao pequeno número da amostra, quando considerados critérios estatísticos.

As amostras de CME, também, foram divididas em dois grupos distintos quanto a idade: pacientes jovens - indivíduos abaixo de 25 anos de idade; e pacientes adultos- indivíduos a partir de 25 anos de idade, segundo a classificação da OMS para critérios de saúde.

Todos os prontuários referentes as amostras selecionadas foram reunidos e as informações relativas aos dados demográficos, modalidade terapêutica instituída, gradação histológica, presença ou não de metástase, recidiva e sobrevida foram registradas. (Anexo 4)

4.2 Avaliação histológica

Para avaliação microscópica foram utilizadas técnica histológica convencional e imunoistoquímica.

4.2.1 Técnica de rotina (HE)

Os espécimes incluídos em parafina foram seccionados em micrótomo (Leica RM2165), obtendo-se de cada bloco cortes consecutivos de 5µm, que foram colocados sobre lâminas e corados pelo método de HE e PAS. Esses cortes foram utilizados para caracterização e classificação microscópica das amostras.

4.2.2 Técnica Imunoistoquímica

Para a técnica da imunistoquímica foram obtidos cortes seriados de 3µm que foram estendidos sobre lâminas de vidro silanizadas (A3648 - EasyPath) e submetidos à técnica imunistoquímica, com o método de identificação com polímero, para a detecção dos seguintes antígenos: proteína Ki-67 e glicoproteína MUC1. Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados e hidratados por meio de: 1-xilol, 3 vezes, 10 minutos cada vez; 2-álcool absoluto, 3 vezes, 2 minutos cada vez; 3-álcool etílico 95% 1 vez, 2 minutos; 4-solução salina tamponada de Tris (TBS), Ph=7.2 - 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão citrato, pH=6.0 (SIGMA, P4809, Saint Louis – USA) aquecido a uma temperatura de 95°C, com auxílio de panela de pressão por 5 minutos. Após lavagens com TBS, as lâminas foram mergulhadas em peróxido de hidrogênio a 3% em solução salina tamponada (Sistema Novolink, Novocastra, RE7280-K), por 5 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, foram novamente lavadas com TBS e, em seguida, as lâminas foram incubadas com solução para bloqueio de proteínas endógenas (Sistema Novolink, Novocastra, RE7280-K) por 5 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS e, em seguida, incubadas com os anticorpos primários, por 12 horas e mantidas na temperatura de 4°C, overnight. Os anticorpos primários utilizados foram: o anticorpo monoclonal de rato anti-Ki-67 (Clone MM1, Novocastra) e o anticorpo monoclonal de rato anti-MUC1 (Clone 695, Biocare Medical). Todas as diluições foram realizadas utilizando PBS associado a soro albumina bovina (PBS-BSA) a 1%. As diluições dos anticorpos foram determinadas em etapa de padronização prévia (Ki-67 1:400 e MUC1 1:300). Após o período de 12 horas, foram realizadas lavagens consecutivas e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com solução pós primário (Sistema Novolink, Novocastra, RE7280-K) por 30 minutos, lavadas e incubadas com o polímero (Sistema Novolink, Novocastra, RE7280-K) por mais 30 minutos, à temperatura de 22° a 25°C. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS e, a seguir, procedemos a revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma

solução cromogênica (Sistema Novolink, Novocastra, RE7280-K), por 5 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contracoradas com hematoxilina (Sistema Novolink, Novocastra, RE7280-K), por 3 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

4.3 Análises qualitativa, quantitativa e estatística dos dados

As amostras submetidas à técnica da imunoistoquímica foram avaliadas considerando as células Ki-67⁺, com marcação nuclear e MUC1⁺ com marcação de membrana e citoplasmática. Esta análise morfométrica foi realizada utilizando microscópio óptico contendo um retículo de integração em rede quadrada (CARL ZEISS, Germany), acoplado na objetiva no aumento de 1000x, sob imersão, com área de 0.015625mm² neste aumento. Para cada espécime avaliado foram analisados cinco campos microscópicos alternados, onde foram contadas as células positivas e negativas. Para o estabelecimento dos 05 campos foi realizado uma quantificação prévia (estudo piloto) contando ora 10 campos alternados e ora contando 05 campos o que permitiu evidenciar que a média por campo foi de 350 células independente da marcação. Diante disto, foi estabelecida a contagem de 05 campos alternados para todas as amostras. A análise quantitativa foi realizada considerando tanto as células positivas quanto negativas, possibilitando, assim, a avaliação percentual das células positivas.

Para estabelecer os parâmetros de proliferação celular e da atividade mucossecretora em tecido glandular não neoplásico e para permitir uma comparação com o tecido neoplásico, o mesmo critério quantitativo descrito acima foi definido nos cinco casos de tecido glandular normal. A média percentual de células positivas para a proteína Ki-67 nos 05 casos foi estabelecida em 2% e para a glicoproteína MUC1 em 30%. Portanto, os casos de CME que apresentaram percentuais acima de 2% para a proteína Ki-67 foram considerados como de alta

expressão e os casos que apresentaram percentuais abaixo de 2% considerados como de baixa expressão. Da mesma maneira foi considerado para a glicoproteína MUC1, ou seja, percentual acima de 30% foi considerado como alta expressão, e abaixo de 30% como de baixa expressão.

Em seguida foram realizados os testes paramétricos T Student e Chi-quadrado para a avaliação da relação entre a imunoexpressão da proteína Ki-67 e glicoproteína MUC1 e as variáveis, idade, gênero e gradação histológica. A avaliação da correlação entre a imunoexpressão de Ki-67 e MUC1 foi realizada através do Teste de Correlação de Spearman. Para o resultado, **P** menor que 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

5. Publicação

Título da Publicação:

**EXPRESSION OF KI-67 AND MUC1 IN INTRAORAL MUCOEPIDERMOID
CARCINOMAS OF MINOR SALIVARY GLANDS. PROGNOSTIC IMPLICATIONS.**

Formatação da publicação seguindo as normas da revista *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*.

**EXPRESSION OF KI-67 AND MUC1 IN INTRAORAL MUCOEPIDERMOID
CARCINOMAS OF MINOR SALIVARY GLANDS. PROGNOSTIC IMPLICATIONS.**

Authors: Cíntia Ferreira Gonçalves¹, Marília Oliveira Moraes¹, Rita de Cássia Gonçalves Alencar², Eliane Duarte Mota², Tarcília Aparecida da Silva³, Aline Carvalho Batista¹, Elismauro Francisco Mendonça¹

1 Department of Oral Medicine (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil;

2 Anatomopathology and Cytopathology Division of Araújo Jorge Hospital, Goiás Fight Cancer Association, Goiânia, Brazil;

3 Department of Oral Surgery and Pathology, Dental School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Running title: Expression of Ki-67 and MUC1 in Mucoepidermoid Carcinoma

Key words: Mucoepidermoid cancer; minor salivary gland; MUC1; Ki-67

Correspondence to:

Dr. Elismauro Francisco Mendonça

Disciplina de Patologia Geral e Bucal, Faculdade de Odontologia,

Universidade Federal de Goiás

Praça Universitária S/N, Setor Universitário Goiânia, Goiás, Brasil, CEP: 74605-220

Phone/Fax: +55 62 3521 1886

E-mail: *elismaur@odonto.ufg.br*

EXPRESSION OF KI-67 AND MUC1 IN INTRAORAL MUCOEPIDERMOID CARCINOMAS OF MINOR SALIVARY GLANDS. PROGNOSTIC IMPLICATIONS.

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the prognostic value of the Ki-67 protein and MUC1 glycoprotein into minor salivary gland MEC.

Study Design: From 1987 to 2007, 35 patients with MEC were selected at Araújo Jorge Hospital and Goiás Oral Medicine Center. Clinical data was obtained from the medical records and histologic findings were reviewed and graded according to the system proposed by Batzakis and Luna. Immunohistochemical analysis for Ki-67 and MUC1 was carried out and correlated to clinical-pathologic data by Student t-test and the chi-square test.

Results: The expression of Ki-67 was not related to age ($p=0.35$), gender ($p=0.58$), histologic grading ($p=0.18$), metastasis ($p=0.8$) and recurrence ($p=0.57$). The MUC1 expression was not related to age ($p=0.79$), gender ($p=0.4$), histologic grading ($p=0.6$) metastasis ($p=0.4$) and recurrence ($p=0.29$) either.

Conclusions: Our findings showed that age, gender, histologic grading, metastasis and recurrence did not show any prognostic significance value for MEC in our sample.

Introduction

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant neoplasm originating in major and minor salivary glands. It is also the most frequently occurring type of malignancy in the oral minor salivary glands.^{1,2,3} Most of the previous clinicopathologic studies for MEC include cases of both major and minor salivary glands.⁴⁻⁸ To date the literature contains few studies restricted to intraoral minor salivary gland MECs.⁹⁻¹⁰ It is the most malignant salivary gland tumor found in children and adolescents and it has a slight predilection for women.^{2,5,11-13}

Although the MEC is the most frequently occurring malignancy neoplasm in the adult group, it rarely occurs in the pediatric group.¹⁴ No more than 5% of all salivary gland neoplasms occur in children. In general they are diagnosed in patients in the 10 to 16 age group and do not appear in the first 2 years of life. The majority of MEC in these groups of patients is histologically classified as a low grade tumor and is rarely fatal.¹⁵ There are few studies investigating the biological behavior of MEC in young and adult group¹⁶. Some authors showed that MEC presented less aggressive biological behavior in young people, and this was justified by the fact that tumors in young people are generally classified as being of low grade malignancy.^{13,14,17-19}

Another significant fact which to date continues without scientific evidence is the implication of gender for the biological behavior of MEC. The literature clearly shows the predilection of this tumor for females^{2,5,6,11,13,14,20} and this fact led us to question if MEC in females presents a better or worse prognosis when compared to that of males. In the literature at present, there is scientific evidence reported on the influence of gender in MEC in relation to length of survival. In this line of research, two studies showed a shorter length of survival for males when compared with females, although the gender variable was not correlated to

tumoral grading.^{16,19} Another group found that MEC in females was associated with tumors of low grade.²¹ Some other factors that have implications for the prognosis of MEC may be the presence of metastasis, recurrences and the tumor staging.^{8,10,12,16}

The literature has also reported that the histologic grading of MEC has implications for the prognosis of this neoplasia.¹² In spite of this, MEC grading systems have a long history of controversy, about the best grading system to use and which of them facilitates inferences in the prognosis of this neoplasia.²² The truth is that various systems have been proposed for this end, with special characteristics for establishing tumoral grading, which involve different types of treatment^{2,3,23,24}. Nowadays, its important to emphasize the presence of other events like immunohistochemical technique to establishing the prognosis of the lesion in association with histologic grading.^{16,25} There are several studies reporting the prognostic value of the Ki-67, a proliferation cell marker, expression in MEC of both minor and major salivary gland origin.^{5,10,16,25,26}

Another important feature of the MEC is the presence of mucin. In recent times, mucin antibodies have been used in order to establish the relationship between the presence of mucosecretory activity and the prognosis of the tumor. Epithelial mucins (MUCs) are the major glycoprotein components of mucus and under normal circumstances are known to play a protective role in epithelial tissues.²⁷ Increasing concentrations of mucin-type glycoproteins in serum are correlated with an increasing tumor burden and a worse prognosis, and can be used as diagnostic markers in cancer.²⁸ MUC1 is detected in most epithelial tissues. Its expression is up-regulated in a variety of cancers, such as breast, pancreas and colorectal carcinomas.²⁹ In fact there are few studies which investigate the MUC1 glycoprotein expression in salivary gland MEC and the few which do exist only correlate its immunoexpression with the histologic grading variable.^{7,8}

The aim of this clinicopathological study was to investigate the prognostic value of the clinical variables (age, gender, regional metastasis, clinical staging and recurrence) and the pathological variable (histologic grading) in minor salivary gland MECs, using the immunoexpression of Ki-67 protein and MUC1 glycoprotein.

Materials and method

This study was approved by the Federal University of Goiás Ethics Committee for human subjects, registered under number 107/2007.

Tissue Samples

Thirty-five intra-oral minor salivary gland tumors with a diagnosis of MEC and 05 normal and non-neoplastic intraoral minor salivary gland surgical tissues were retrieved from the archives of the Oral Pathology Laboratory at the Federal University of Goiás Dental School, and the Anatomopathology and Cytopathology Division of the Araújo Jorge Hospital, Goiás Fight Cancer Association, Goiânia, Brazil. All neoplastic tissues had been surgically removed between 1987 and 2007. The non-neoplastic tissues of minor salivary glands were used solely to establish the cut-off values when investigating the normal percentage of positive cells. Age, gender, histologic grading, anatomic location, treatment, clinical outcome, recurrence and regional metastasis were recorded.

Histologic grading of mucoepidermoid carcinomas:

All cases were histologically reviewed in sections stained with hematoxylin-eosin and Periodic Acid Schiff (PAS). The microscopic features were evaluated independently by two pathologists (E. F. M. and A. C. B.), without any knowledge of clinical outcome and other clinical data, and classified as low, intermediate or high histologic grade, according to the Batsakis and Luna system. The discrepancies were resolved by simultaneous reexamination of the slides. The features evaluated included: architecture, invasion pattern, predominant cell type, cellular pleomorphism, prominence of nucleoli, frequency of mitotic figures, and prominence of fibrosis and inflammatory infiltrate. In addition, an evaluation of vascular and perineural invasion was carried out. For the non-neoplastic tissues to be included, the tissue could not have any associated inflammation.

Immunohistochemistry

The samples of neoplastic and non-neoplastic tissue of minor salivary gland were immunohistochemically analyzed. Paraffin-embedded tissues were sectioned and collected in serial sections of 3 μm on glass slides coated with 2% 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO). The sections were deparaffinized by immersion in xylene, and this was followed by immersion in alcohol and then incubation with 3% hydrogen peroxide diluted in Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.4) for 40 minutes. The sections were then immersed in a citrate buffer (pH 6.0) for 5 minutes at 95°C for antigen retrieval, in a pressure cooker. Peroxidase was then blocked by incubation with 3% normal bovine serum for 20 minutes. Then the slides were incubated with the following primary mouse monoclonal antibodies: anti-human Ki-67 (MM1; Novocastra, Newcastle, UK) at 1:300 and anti-human MUC1 (clone 695, Biocare Medical, Concord, CA, USA) at 1:300, at 4°C and kept overnight in a humidified chamber. After washing in TBS, the sections were treated with the labeled streptavidin-biotin (LSAB kit, K0492, Dako) and then incubated with 3,3'-Diaminobenzidine (K3468, Dako) for 2 to 5 minutes at room temperature. Finally the sections were counter-stained with Mayer's hematoxylin, washed, dehydrated and mounted. Appropriate positive controls were used: lymphoma and basal layer cells from MEC cases were used as an internal positive control for Ki-67 protein, and lung cells were used for MUC1 glycoprotein.

Cell counting and statistical analysis:

The immunohistochemical results were obtained as a percentage of positive cells. All counts were performed in 05 alternate microscopic high-power fields ($\times 100$) using an integration graticule (474068000000-Netzmikrometer 12.5x, Carl Zeiss, Göttingen, Germany), under oil immersion, and, at this magnification, each field of integration graticule had an area of 0.015625mm^2 and a minimum of 350 tumor cells were counted both for MEC

cases and normal glandular tissue. The expression results in normal tissue made it possible to define the following cut-off values: 2% and 30% for the Ki-67 protein and MUC1 glycoprotein, respectively. By means of these values, it was possible to establish that immunoexpression above 2% for the Ki-67 protein and 30% for the MUC1 glycoprotein would indicate a high expression and the opposite would define a low expression of these markers for MEC.

In our study we decided to dichotomize the MECs into two groups: low-grade and high grade. High grade was made up of both intermediate and high grade MECs because of the similarities between these two categories and the limited number of cases in our sample. Moreover, to dichotomize the age variable we used the criterion specified by World Health Organization (WHO)³⁰ which classifies as young all those under 24 years of age. Consequently, adults are all those over 25 years of age.

Initially a descriptive analysis of the data was undertaken. The Student t-test and the chi-square test were used to investigate the relationship between the variables age, gender, histologic grading, metastasis, recurrence and clinical staging and the immunoexpressions of Ki-67 and MUC1. The Pearson Correlation was used to verify the correlation between the immunoexpressions of Ki-67 and MUC1. Differences were considered statistically significant with $P < 0.05$.

Results

The main clinicopathological features of our series of 35 patients with minor salivary gland MEC are summarized in Table 1.

In a qualitative analysis when the immunoexpression of Ki-67 protein was compared with the histologic grading, we observed that in the low-grade tumors the Ki-67 expression was lower than in those of intermediate-grade, which, in turn, was lower than that of high-grade tumors (Figs. 1 *A*, *B* and *C*). The pattern of immunoexpression shown for Ki-67 was represented by strong nuclear staining and, of the 35 cases, 77% were positive.

In addition, the pattern of expression observed for MUC1 in our study was a strong membrane and cytoplasm staining. This immunoexpression was observed in all kinds of cells (mucous, epidermoid, intermediate, clear and columnar) and 94.3% of the MEC cases showed positivity for MUC1 glycoprotein. It is important to emphasize that this expression was significantly stronger when compared to that of the non-neoplastic tissue. As the association between this expression and the histologic grading in MEC cases, it was seen that MUC1 showed a lower expression in low grade tumors and increased in intermediate and high-grade tumors (Figs. 2 *A*, *B* and *C*).

In a quantitative analysis, when the Ki-67 expression was compared with the age variable (Fig. 3 *A*), it was seen that the adult group showed higher Ki-67 expression, than the young group indicating, therefore, greater proliferative activity. However, this result was not statistically significant ($P=0.35$). The results of the comparison between mucosecretory activity and the variable age, were similar for the young and adult groups ($P=0.79$) (Fig. 3 *B*).

When the immunoexpression of these proteins was evaluated for gender variable, it was seen that males presented greater Ki-67 ($P=0.58$) and MUC1 ($P=0.4$) immunoexpressions than females, which would indicate greater proliferative and mucosecretory activity in males.

However, these results did not reach statistical significance either (Figs. 4 *A* and *B*, respectively).

With reference to the implications of the cellular proliferation percentage of the Ki-67 protein and the mucosecretory activity of the MUC1 glycoprotein for the histologic grading dichotomized into just two categories, namely, low and high grade, it was seen that the high grade tumors presented a greater expression of the Ki-67 protein when compared with low grade tumors, thereby indicating greater proliferative activity. The same was seen in terms of the mucosecretory activity of the MUC1 glycoprotein, that is, high grade tumors presented a tendency towards greater mucosecretory activity, even though in the case of these two markers no results of statistical significance were found (Ki-67 – $P=0.18$ and MUC1 – $P=0.6$) (Figs. 5 *A* and *B*).

When the Ki-67 immunoexpression was analyzed with absence of metastasis, we noted that did not exist relationship between the both ($P=0.8$). This fact repeated for the analysis of MUC1 immunoexpression and absence of metastasis ($P=0.4$). Moreover, in a comparison of Ki-67 expression and the variable recurrence, $P=0.57$ and for MUC1, $P=0.29$, i.e., the absence of recurrence showed no relationship with proliferation cell and mucosecretory activity. This results plus the comparison between immunoexpression of Ki-67 and MUC1 and the clinical staging are described in Table 2.

In our study there was no correlation between the Ki-67 and MUC1 immunoexpression, or rather, the MUC1 immunoexpression was independent of the Ki-67 expression ($P=0.31$).

Discussion

MEC is the most common malignant neoplasm of the salivary glands in adults.^{3,9,13,17,18-20,31,32} and is rare in children and young patients, and there have been few reported series in the literature restricted to this group.^{14,18,33} In our research, 80% of the MEC cases were in adults, and 20% were considered young according to our criteria. The mean age in this study was 39 years of age and this is also consonant with the literature, which reports a predilection for the third to fifth decades of life.³⁴ In our series, we only selected patients with minor salivary gland MEC because there is a shortage of scientific studies investigating the biological behavior of minor salivary gland MEC exclusively.^{9,10,12} In our results, when we correlated the variable age to proliferative and mucosecretory activity, it has been demonstrated a tendency towards greater proliferative activity for the adult group when compared with the young group. However, these results were not statistically significant. When we compared the tumoral biological behavior of the genders, relating proliferative and mucosecretory activity, our study showed a slight increase in the immunoexpression of Ki-67 and MUC1 in males, even though the result was not statistically significant. Moreover, no statistically significant difference was found for the association between histologic grading and immunoexpression for Ki-67 and MUC1 immunoexpression either; however we obtained that the high grade group tended to have a higher expression of Ki-67 and MUC1 than the low grade group.

It is important to emphasize that, as there is no consensus in the literature about where youth ends and adulthood begins, it is difficult to compare series of different authors who consider different ages as limits for children, young people and adults. Researches have used a variety of ages to define who is a young patient, such as Perez et al.³⁵ who considered young patients to be less than 18; Budnick³⁶ considered children to be patients under 17; Krolls et al.¹⁷ and Luna et al.¹⁵ agreed that children are patients of 15 and under. Dahlqvist and

Östberg³³ considered children to be patients of up to 16. Other researches, involving both children and adolescents, considered them to be patients up to 18¹⁸ and 20¹³ years old. In our study in order to decide who is young we used a parameter based on World Health Organization (WHO) criteria³⁰ which classifies as young all those under 24 years of age and adults all those over 25 years of age. It's interesting that some retrospective studies based on registers of clinical and pathological data from clinical records showed that MEC in young patients is in general histologically characterized as being of low grade malignancy.^{4,13,14,17,18} However, different results were obtained in our sample, as 57.14% (n=04) of the young people presented MEC of an intermediate grade of malignancy, 28.57% (n=02) presented low grade malignancy and only one case in our criteria for age groups were high grade.

In this study we used the quantification of the Ki-67 protein and MUC1 glycoprotein, respectively, through the immunohistochemistry technique. In these lines of research, some authors affirmed that high Ki-67 index remains the most useful marker for predicting an adverse outcome in salivary gland carcinoma.²⁶ We established our cut-off value for Ki-67 in 30%. In another study the cut-off values were not established and only the marking of the Ki-67 protein was quantified, based on the histologic grading of the tumors: low grade tumors presented 1% of positive cells; intermediate grade presented 3-4% and high grade presented 10% of Ki-67 positive cells.¹² Another study also found higher results for MEC in children and adolescents: low grade tumors presented 7% of positive cells; intermediate grade were 12% while high grade tumors presented 26% of Ki-67 positive cells.⁵ Moreover, MUC1 is a membrane-bound MUC which, under normal conditions, has the function of protecting the apical surface of the epithelial and it also plays a regulatory role.^{28,37,38} Handra-Luca et al.¹⁰ established values of 5 to 10% of positive tumoral cells as low expression, while values above 50% were considered of high expression, in minor and major MEC. There is a research in colorectal tumors that defined the cut-off value of distinct staining at luminal surfaces seen in

at least 30% of the tumor cells on the section.³⁸ Until this time, our research is the first whom defines the cut-off value for MUC1 in minor salivary gland MEC.

In the literature on MEC, there is one study¹⁶ which used a cellular proliferation marker and related it to age. These authors found that people under 40 presented a better prognosis when compared to those over 40, but without statistical significance. However, they used the proliferative cellular nuclear antigen (PCNA) as a cell proliferation marker and nowadays this is not recognized as a reliable proliferation marker.⁴⁰ In our series of MEC cases when we evaluated the histologic grade, we can affirm that females presented a greater frequency of low grade tumors with a more favorable prognosis and a smaller amount of high grade tumors. Monoo et al.²¹ found similar results, where females were associated with tumors of low grade malignancy and males with high grade. It is worthy of note that in the literature some researches showing worse survival rates for males.^{16,19} In addition, it is worth noting the importance of Pires et al.⁴⁰ investigation, which showed that the ER antigen does not participate in the etiopathogenesis of MEC.

When we dichotomized the sample into two groups (low-grade and intermediate/high-grade tumors) no statistically significant difference was found for the association between histologic grading and immunoexpression for Ki-67. However, previous data have demonstrated this correlation with statistical significance.^{9,10,12,16} Okabe et al.¹⁰ found that metastasis presence and clinical stage influence the disease-free survival and overall survival, thus constituting prognostic factors for MEC. Our results, in contrast, showed no relationship between immunoexpression of Ki-67 protein and MUC1 glycoprotein with metastasis, recurrence and clinical staging.

When we correlated the immunoexpression of MUC1 with histologic grading dichotomized we obtained that the high grade group tended to have a higher expression of

MUC1 than the low grade group. However, this difference was not statistically significant. Our results were consonant with previous literature.⁸ According to Alos et al.⁷, the MUC1 expression was associated with histologic grading, which could be observed in our study in the qualitative analysis so the low grade tumors had the lowest level of immunoexpression whereas high grade tumors had the highest. Some authors have affirmed that tumors with a high MUC1 positivity have a worse prognosis, with shorter disease-free intervals and higher rates of recurrence and metastasis, because the MUC1 glycoprotein reduces cell-matrix and cell adhesion, thereby, facilitating an invasion of the underlying stroma, lymph and blood vessels by tumoral cells.^{7,8,28,37,38} It is important to emphasize that colorectal cancer with lymphatic or venous invasion, lymph node metastasis and liver metastasis showed a higher immunoexpression of MUC1 than those colorectal cancer without this prognosis factors.³⁸ Handra-Luca et al.⁸ noted in their study that age, gender, and clinical stage was not related with MUC1, MUC2, MUC4 and MUC5AC expression. Our results about the MUC1 immunoexpression and metastasis, recurrence and tumor staging corroborate to these findings of the literature. It is noteworthy that recent studies have synthesized a MUC1 inhibitor (called GO-201) that binds to the MUC1 cytoplasmic domain and blocks the formation of MUC1 oligomers in cells. GO-201 also arrests growth and induces necrotic death. Administration of GO-201 to nude mice bearing human breast tumor xenografts was associated with loss of tumorigenicity and extensive necrosis, which results in prolonged regression of tumor growth.⁴¹ So we believe that further research should be conducted with the glycoprotein MUC1, since there may be some answers to the control of tumor growth.

Conclusion:

Our results demonstrated that MEC in minor salivary glands has a tendency to present higher cell proliferative activity in adults when compared to young people, in males when compared to females, and in intermediate and high histologic grade tumors when compared to low grade tumors. Young patients presented a tendency to higher mucosecretory activity when compared to adult patients, as did males when compared to females. Just like proliferative activity, high grade tumors may have a higher level of MUC1 glycoprotein than low grade tumors. This study verified that the variables age, gender and histologic grading have no prognostic significance value which is supported by statistical data; moreover metastasis, recurrence and clinical stages did not show any correlation with prognosis tumor. However, Ki-67 protein and MUC1 glycoprotein may have a diagnostic and prognostic value in MEC, since it is related to the degree of malignancy. We believe that further studies are necessary to continue this line of research.

References

1. Spiro RH, Huvos AG, Berk R, Strong EW. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. A clinicopathologic study of 367 cases. *Am J Surg* 1978;136:461-8.
2. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histologic grading. *Am J Surg Pathol* 2001;25:835-45.
3. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid Carcinoma of Intraoral Salivary Glands. Evaluation and Application of Grading Criteria en 143 Cases. *Cancer* 1992;69:2021-9.
4. 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;68:895-902.
5. Hicks J, Flaitz C. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescents: assessment of proliferation markers. *Oral Oncol* 2000;36:454-60.
6. Mannweiler S, Beham A, Langner C. MUC1 and MUC2 expression in salivary gland tumors and in non-neoplastic salivary gland tissue. *APMIS* 2003;111:978-84.
7. Alos L, Lujan B, Castillo M, Nadal A, Carreras M, Caballero M, et al. Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands. *Am J Surg Pathol* 2005;29:806-13.
8. Handra-Luca A, Lamas G, Bertrand JC, Fouret P. MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC expression in salivary gland mucoepidermoid carcinoma: diagnostic and prognostic implications. *Am J Surg Pathol* 2005;29:881-9.

9. Yin HF, Okada N, Takagi M. Apoptosis and apoptotic-related factors in mucoepidermoid carcinoma of the oral minor salivary glands. *Pathol Int* 2000;50:603-9.
10. 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.
11. Pires FR, Pringle GA, de Almeida OP, Chen SY. Intra-oral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 546 cases. *Oral Oncol*. 2006;43:463-70.
12. 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;12:364-70.
13. Seifert G, Okabe H, Caselitz J. Epithelial salivary gland tumors in children and adolescents. Analysis of 80 cases (Salivary Gland Register 1965-1984). *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1986;48:137-49.
14. Conley J, Tinsley PP. Treatment and Prognosis of Mucoepidermoid Carcinoma in the Pediatric Age Group. *Arch Otolaryngol* 1985;11:322-4.
15. Luna MA, Batsakis JG, El-Naggar AK. Salivary gland tumors in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100:869-71.
16. 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;134:622-6.

18. Krolls SO, Trodahl JN, Boyers RC. Salivary gland lesions in children. A survey of 430 cases. *Cancer* 1972;30:459-69.
19. Fonseca I, Martins AG, Soares J. Epithelial salivary gland tumors on children and adolescents in southern Portugal: a clinicopathologic study of twenty four cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72:696-701.
20. Guzzo M, Ferrari A, Marcon I, Collini P, Gandola L, Pizzi N, et al. Salivary gland neoplasms in children: the experience of the Istituto Nazionale Tumori of Milan. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:806-10.
21. Jones AV, Craig GT, Speight PM, Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncol* 2008;44:407-17.
22. Monoo K, Sageshima M, Ito E, Nishihira S, Ishikawa K. Histopathological grading and clinical features of patients with mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2003;106:192-8.
23. Luna MA. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. *Adv Anat Pathol* 2006;13:293-307.
24. Batsakis JG, Luna MA. Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: I. Mucoepidermoid carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99:835-8.
25. Seifert G, Brocheriou C, Cardesa A, Eveson JW. WHO International Histological Classification of Tumours. Tentative Histological Classification of Salivary Gland Tumours. *Pathol Res Pract*. 1990;186:555-81.

26. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
27. Cheuk W, Chan JK. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology*. 2007;51:1-20.
28. Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 2001;1:1192-206.
29. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 2004;4:45-60.
30. Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 1995;233:607-17.
31. Provisional guidelines on standard international age classifications. United Nations, New York, 1982. Accessed 2009 Jan 02. Available from: http://unstats.un.org/unsd/publication/SeriesM/SeriesM_74e.pdf
32. Healey WV, Perzin KH, Smith L. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. Classification, clinical-pathologic correlation, and results of treatment. *Cancer* 1970;26:368-88.
33. Vargas PA, Gerhard R, Araújo Filho VJF, de Castro IV. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2002;57:271-6.

34. Dahlqvist A, Östberg. Malignant salivary gland tumours in children. *Acta Otolaryngol* 1982;94:175-9.
35. Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Stavrianos SD, Faratzis G, Lagogiannis GA, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. *Oral Oncol* 2007;43:130-6.
36. Perez DE, Pires FR, Alves Fde A, Lopes MA, de Almeida OP, Kowalski LP. Juvenile intraoral mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:308-11.
37. Budnick SD. Minor-salivary-gland tumors in children. *ASDC J Dent Child* 1982;49:44-7.
38. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 1995;57:607-34.
39. Hiraga Y, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, et al. Immunoreactive MUC1 expression at the deepest invasive portion correlates with prognosis of colorectal cancer. *Oncology* 1998;55:307-19.
40. Schmitt FC, Pereira EM, Andrade LM, Torresan M, de Lucca L. The proliferating cell nuclear antigen index in breast carcinomas does not correlate with mitotic index and estrogen receptor immunoreactivity. *Pathol Res Pract* 1994;190:786-91.
41. Pires FR, Perez DEC, Almeida OP, Kowalski LP. Estrogen receptor expression in salivary gland mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004;10:166-8.

42. Raina D, Ahmad R, Joshi MD, Yin L, Wu Z, Kawano T, et al. Direct targeting of the mucin 1 oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2009;69:5133-4.

Acknowledgments

The authors thank the Anatomopathology and Cytopathology Division of Araújo Jorge Hospital, the Goiás Fight Cancer Association, Goiania, Brazil.

Table 1: Main Clinicopathological findings of patients with oral MEC of minor salivary glands (n=35)

Clinicopathological Features		n	%
Age	<25 years (young)	07	20
	≥25 years (adult)	28	80
Gender	Male	13	37.1
	Female	22	62.9
Site	Palate	19	54.2
	Mucous Jugal	6	17.2
	Tongue	6	17.2
	Retromolar area	2	5.7
	Floor of mouth	2	5.7
Treatment	WLE	35	100
	WLE + Rad therapy	6	17.4
Clinical outcome	Living	32	94.3
	Dead	3	5.7
Recurrence	Yes	3	8.6
	No	31	88.6
	NR	1	2.8
Metastasis	Yes	3	8.6
	No	10	28.6
	NR	22	62.8
Histologic Grade	Low-grade	15	42.9
	Intermediate-grade	13	37.1
	High-grade	7	20

Rad = Radiotherapy

NR = Not related

WLE = Wide Large Excision

Table 2: Comparison between the immunoexpression of Ki-67 and MUC1 and metastasis, recurrence and clinical staging.

Variable	Ki-67		p	MUC1		p
	Low Expression (%)	High Expression (%)		Low Expression (%)	High Expression (%)	
Metastasis						
No	9 (31%)	20 (69%)	0,8	3 (10,3%)	26 (89,7%)	0,40
Yes	1 (25%)	3 (75%)		1 (25%)	3 (75%)	
Recurrence						
No	8 (27,6%)	21 (72,4%)	0,57	6 (54,5%)	5 (45,5%)	0,29
Yes	2 (40%)	3 (60%)		0 (0%)	1 (100%)	
Clinical Staging						
CS I	3 (30%)	7 (70%)	0,89	2 (20%)	8 (80%)	0,50
CS II	3 (27,3%)	8 (72,7%)		1 (9,1%)	10 (90,9%)	
CS III	2 (28,6%)	5 (71,4%)	0,94	1 (14,3%)	6 (85,7%)	0,19
CS IV	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,91	0 (0%)	3 (100%)	0,40

Figures:

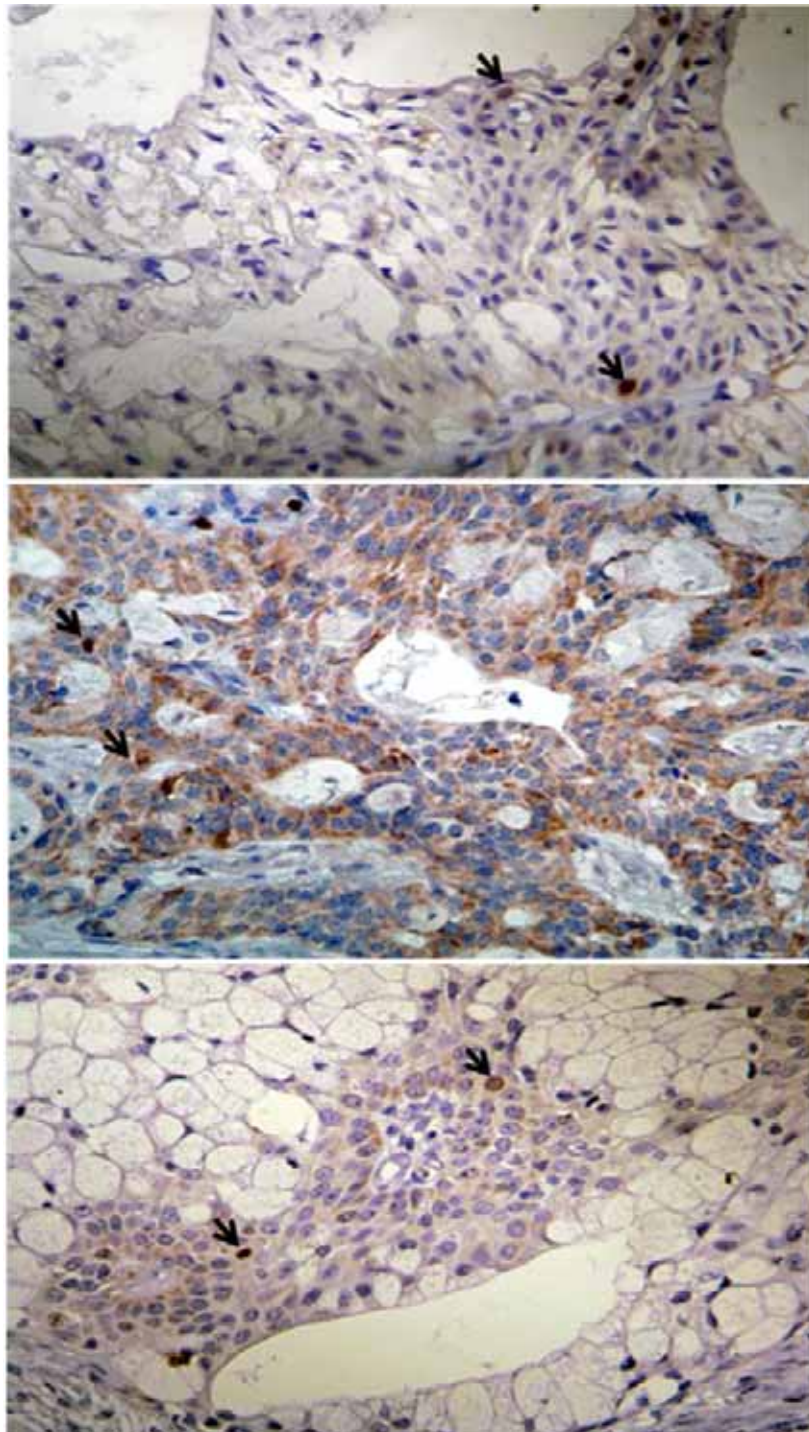


Fig.1. **A, B, C:** Expression of protein Ki-67 in neoplastic MEC cells, in low grade tumor (**A**), intermediate grade (**B**) and high grade (**C**) (arrows). Immunohistochemical staining, original magnification; x 400 (**A** to **C**).

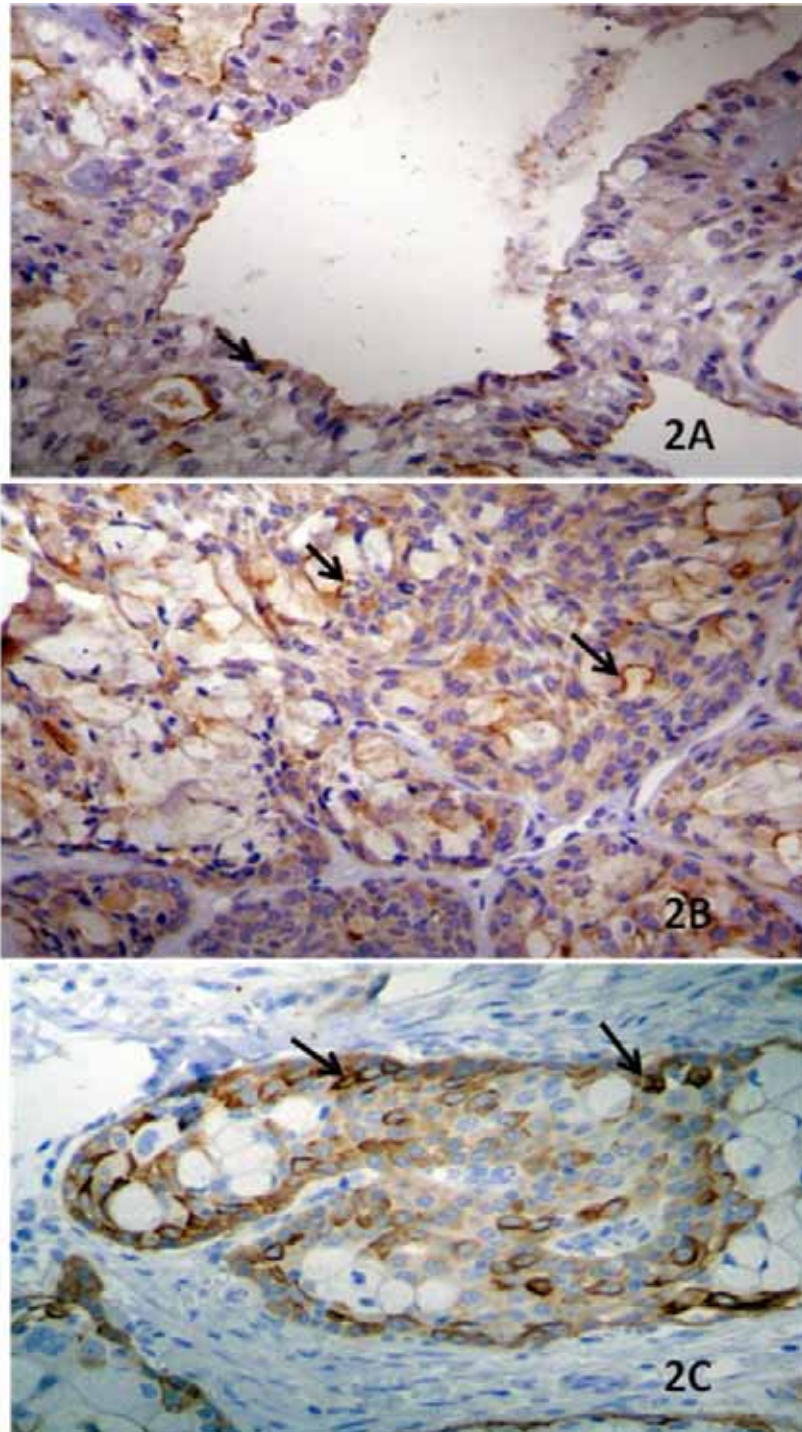


Fig.2. A, B, C: Expression of MUC1 in neoplastic MEC cells, in low grade (A), intermediate grade (B) and high grade (C). Immunohistochemical staining, original magnification; x 400 (A to C).

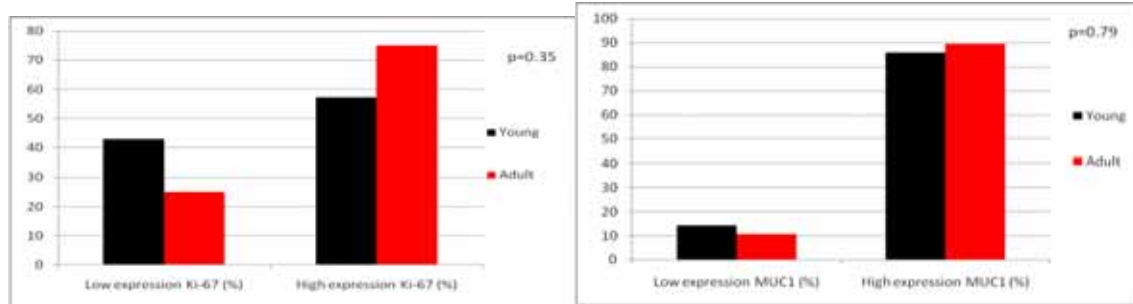


Fig.3. **A** - Comparison of Ki-67 immunoeexpression dichotomized (low and high expression) in percentages (%) and age (young and adults). **B** - Comparison of MUC1 immunoeexpression dichotomized (low and high expression) and age (young and adults).

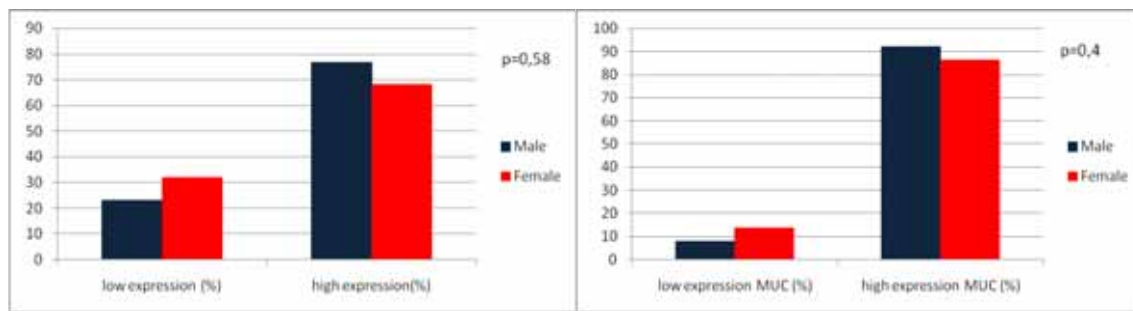


Fig.4. **A** - Comparison of dichotomized (low and high) Ki-67 immunoeexpression in percentages (%) and male and female genders. **B** - Comparison of dichotomized MUC1 immunoeexpression and male and female genders.

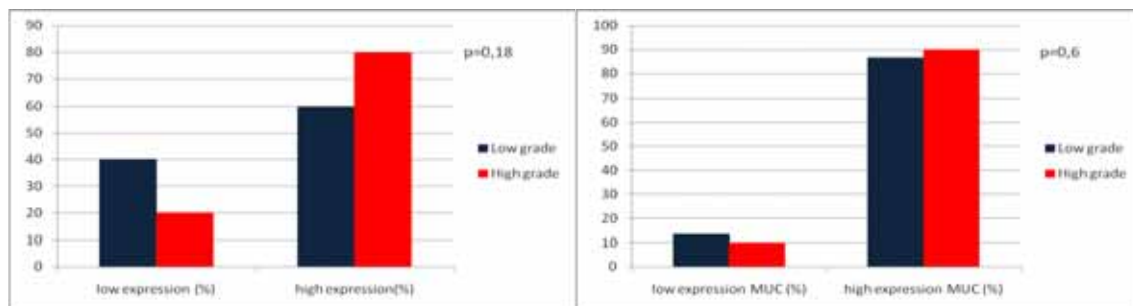


Fig.5. **A** - Comparison of Ki-67 immunoeexpression (low and high) in percentages (%) and histologic grading (low and intermediate/high grade). **B** - Comparison of MUC1 immunoeexpression and histologic grading (low and intermediate/high grade).

6. Conclusões / Considerações finais:

Embora em nosso estudo não tenha sido possível estabelecer o valor prognóstico com dados estatisticamente significantes das variáveis clínico-patológicas (idade, gênero e gradação histológica) no CME, foi possível observar resultados importantes sobre proliferação celular e atividade mucossecretora. Pois, houve uma maior tendência da imunoexpressão da proteína Ki-67 em indivíduos adultos, quando comparado aos indivíduos jovens; uma maior expressão no gênero masculino e em tumores de intermediário e alto grau de malignidade. Além disso, observamos também que a atividade mucossecretora da glicoproteína MUC1 foi mais acentuada em indivíduos jovens que em adultos, mais no gênero masculino, e em tumores de grau intermediário e alto. Estas observações podem contribuir tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico do CME em glândulas salivares menores. Acreditamos que novos estudos devem continuar esta temática com amostras maiores e com estudos multicêntricos.

7. Referências (Dissertação)

- 1 Alos L, Lujan B, Castillo M, et al. Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands. *Am J Surg Pathol* 2005;29:806-13.
- 2 Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid Carcinoma of Intraoral Salivary Glands. Evaluation and Application of Grading Criteria en 143 Cases. *Cancer* 1992;69:2021-9.
- 3 Batsakis JG, Luna MA. Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: I. Mucoepidermoid carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99:835-8.
- 4 Bradley P, McClelland L, Mehta D. Paediatric salivary gland epithelial neoplasms. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2007;69:137-45.
- 5 Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol* 2001;25:835-45.
- 6 Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, et al. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 1995 15;233:607-17.
- 7 Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of intra-oral minor salivary gland tumors: a study of 380 cases from northern California and comparison to reports from other parts of the world. *J Oral Pathol Med* 2007;36:207-14.
- 8 Cardoso WP, Denardin OV, Rapoport A, et al. Proliferating cell nuclear antigen expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *Sao Paulo Med J* 2000;118:69-74.

- 9 Cawson RA, Binnie WH, Eveson JW. Color atlas of oral disease. 2^a Ed. London: Mosby: 1994.
- 10 Conley J, Tinsley PP Jr. Treatment and prognosis of mucoepidermoid carcinoma in the pediatric age group. *Arch Otolaryngol* 1985;111:322-4.
- 11 da Cruz Perez DE, Pires FR, Alves FA, et al. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2004;68:895-902.
- 12 Dahlqvist A, Östberg. Malignant salivary gland tumours in children. *Acta Otolaryngol* 1982;94:175-9.
- 13 Epstein JB, Hollender L, Pruzan SR. Mucoepidermoid carcinoma in a young adult: recognition, diagnosis, and treatment and responsibility. *Gen Dent* 2004;52:434-9.
- 14 Fonseca I, Martins AG, Soares J. Epithelial salivary gland tumors on children and adolescents in southern Portugal: a clinicopathologic study of twenty four cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72:696-701.
- 15 Foote FW Jr, Frazell EL. Tumors of the major salivary glands. *Cancer* 1953;6:1065-133.
- 16 Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 1995;57:607-34.
- 17 Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.

- 18 Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-5.
- 19 Glassman LM. The Mucoepidermoid Tumour of the Minor Salivary Glands. *Diastema* 1983;11:11-16.
- 20 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;82:1217-24.
- 21 Guzzo M, Ferrari A, Marcon I, et al. Salivary gland neoplasms in children: the experience of the Istituto Nazionale Tumori of Milan. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:806-10.
- 22 Handra-Luca A, Lamas G, Bertrand JC, et al. MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC expression in salivary gland mucoepidermoid carcinoma: diagnostic and prognostic implications. *Am J Surg Pathol* 2005;29:881-9.
- 23 Healey WV, Perzin KH, Smith L. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. Classification, clinical-pathologic correlation, and results of treatment. *Cancer* 1970;26:368-88.
- 24 Hicks J, Flaitz C. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescents: assessment of proliferation markers. *Oral Oncol* 2000;36:454-60.
- 25 Hiraga Y, Tanaka S, Haruma K, et al. Immunoreactive MUC1 expression at the deepest invasive portion correlates with prognosis of colorectal cancer. *Oncology* 1998;55:307-19.

- 26 Irimura T, Denda K, Iida S, et al. Diverse glycosylation of MUC1 and MUC2: potential significance in tumor immunity. *J Biochem* 1999;126:975-85.
- 27 Ito FA, Ito K, Vargas PA, et al. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34:533-6.
- 28 Jaber MA. Intraoral minor salivary gland tumors: a review of 75 cases in a Libyan population. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:150-4.
- 29 Jones AV, Craig GT, Speight PM, et al. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncol* 2008;44:407-17.
- 30 Krolls SO, Trodahl JN, Boyers RC. Salivary gland lesions in children. A survey of 430 cases. *Cancer* 1972;30:459-69.
- 31 Lopes MA, Perez DEC, Alves FA, et al. Clinicopathologic and immunohistochemical study of intraoral mucoepidermoid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:622-6.
- 32 Luna MA. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. *Adv Anat Pathol* 2006;13:293-307.
- 33 Mannweiler S, Beham A, Langner C. MUC1 and MUC2 expression in salivary gland tumors and in non-neoplastic salivary gland tissue. *APMIS* 2003;111:978-84.
- 34 Monoo K, Sageshima M, Ito E, et al. Histopathological grading and clinical features of patients with mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2003;106:192-8.
- 35 Nascimento AG, Amaral LP, Prado LA, et al. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a clinicopathologic study of 46 cases. *Head Neck Surg* 1986;8:409-17.

- 36 Okabe M, Inagaki H, Murase T, et al. Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. *Mod Pathol* 2001;14:1008-14.
- 37 Pires FR, Pringle GA, de Almeida OP, et al. Intra-oral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 546 cases. *Oral Oncol* 2006;43:463-70.
- 38 Projeto de Lei nº4530. Congresso Nacional, Distrito Federal, 2004. Aprova o plano nacional da juventude e dá outras providências. Disponível em: <<http://www2.camara.gov.br/internet/eve/realizados/juventude/projetolei.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2009.
- 39 Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. *Oral Oncol* 2007;43:130-6.
- 40 Seifert G, Brocheriou C, Cardesa A, Eveson JW. WHO International Histological Classification of Tumours. Tentative Histological Classification of Salivary Gland Tumours. *Pathol Res Pract*. 1990;186:555-81.
- 41 Seifert G, Okabe H, Caselitz J. Epithelial salivary gland tumors in children and adolescents. Analysis of 80 cases (Salivary Gland Register 1965-1984). *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1986;48:137-49.
- 42 Sengupta A, Valdramidou D, Huntley S, et al. Distribution of MUC1 in the normal human oral cavity is localized to the ducts of minor salivary glands. *Arch Oral Biol* 2001;46:529-38.
- 43 Spiro RH, Huvos AG, Berk R, et al. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. A clinicopathologic study of 367 cases. *Am J Surg* 1978;136:461-8.

- 44 Stewart FW, Foote FW, Becker WF. Mucoepidermoid tumors of salivary glands. *Ann Surg* 1945;122:820-44.
- 45 Triantafillidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, et al. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. *Oral Dis* 2006;12:364-70.
- 46 Vargas PA, Gerhard R, Araújo Filho, VJF et al. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2002;57:271-6.
- 47 Wu AM, Csako G, Herp A. Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Mol Cell Biochem* 1994;137:39-55.
- 48 Yin HF, Okada N, Takagi M. Apoptosis and apoptotic-related factors in mucoepidermoid carcinoma of the oral minor salivary glands. *Pathol Int* 2000;50:603-9.

8. Anexos e apêndice

O presente trabalho é fruto de uma parceria entre a Faculdade de Odontologia/UFG e Associação Goiana de Combate ao Câncer/Hospital Araújo Jorge.

8.1 Anexo 1: Sistemas de Gradação

8.1.1 Sistema de Gradação de Batsakis & Luna³ (1990)

Características histológicas da Gradação do CME de acordo com o Sistema de Healey, modificado por Batsakis e Luna		
Grau 1 (Baixo)	Grau 2 (Intermediário)	Grau 3 (Alto)
Macroistos, microistos, transição com ductos excretores	Ausência de macroistos, poucos microistos, ilhas sólidas de células	Ausência de macroistos, predominantemente sólido, mas pode estar próximo de glândulas
Células diferenciadas produtoras de mucina e epidermóides, geralmente na proporção de 1:1, mínima a moderada população de células intermediárias	Ductos grandes não exuberantes	Os constituintes celulares vão desde pobremente diferenciados a reconhecidamente epidermóide e intermediário até ductal, como no adenocarcinoma
Proliferação de cistos filhos dos grandes cistos	Pouco a moderado pleomorfismo, poucas mitoses, proeminente núcleo e nucléolo	Considerável pleomorfismo, mitoses encontradas facilmente
Mínima ou ausência de pleomorfismo, raras mitoses	Pouco a moderado pleomorfismo, poucas mitoses, proeminente núcleo e nucléolo	Considerável pleomorfismo, mitoses encontradas facilmente
Frente larga, geralmente com invasão circunscrita	Qualidade invasiva, usualmente bem definida e não circunscrita	Inquestionável invasão tecidual, perineural, e intravascular
Piscinas de extravasamento de mucina com reação do estroma (como células inflamatórias crônicas)	Inflamação crônica na periferia, fibroses separando as ilhas de células e grupos de ilhas	Inflamação crônica menos proeminente, desmoplasia do estroma pode contornar o agregado

8.1.2 Sistema de Gradação da OMS (Seifert et al. 1990):

Baixo Grau	Grau Intermediário	Alto Grau
Células mucosas perfazem mais de 50% do tumor	Células mucosas perfazem mais de 10%	Raras células mucosas (-10%)
Células epidermóides bem diferenciadas e células intermediárias não numerosas	Células intermediárias e epidermóides são predominantes	Tendência a formação de massas sólidas de células intermediárias e epidermóides
Ausência de pleomorfismo nuclear	Massas sólidas são freqüentes	Presença de pleomorfismo nuclear
Raras ou ausentes mitoses	As células apresentam pleomorfismo de ligeiro a moderado	Presença de freqüentes mitoses
Tendência a formação de espaços císticos, contornados por células mucosas	Ocasionalmente mitoses estão presentes	Geralmente o tumor apresenta tendência à infiltração em tecidos adjacentes

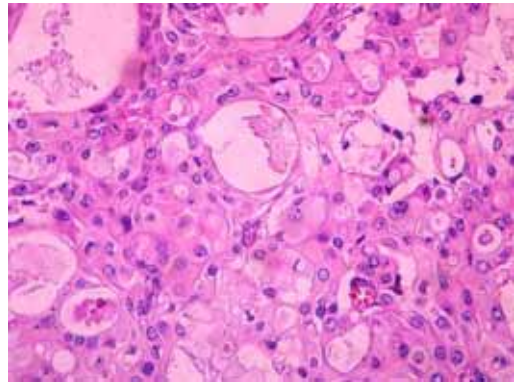
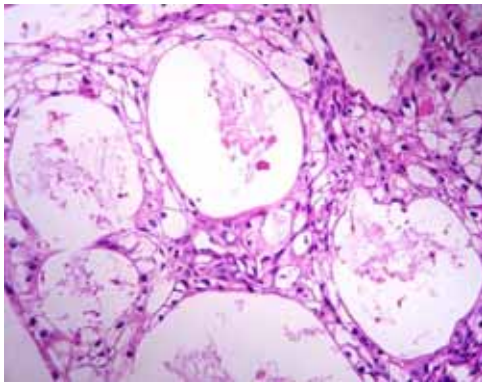
8.1.3. Sistema de Gradação de Auclair, Goode, Ellis² (AFIP-Instituto de Patologia das Forças Armadas)

Parâmetros	Valores da Pontuação
Componente intracístico < 20%	+2
Invasão neural presente	+2
Presença de necrose	+3
>4 mitoses/10 campos (HPF)	+3
Anaplasia	+4
Grau	Total de Pontos (Score)
Baixo	0-4
Intermediário	5-6
Alto	7 ou mais

8.1.4 Sistema de Gradação de Brandwein et al.⁴ (2001)

	Características normais	Características definitivas
Grau I	Componente de células caliciformes, formação cística pelas células intermediárias pode determinar o padrão circunscrito	Ausência de características definitivas do grau III, ausência de padrão de invasão agressivo
Grau II	Células intermediárias predominam mais que células mucosas, tumor com padrão mais sólido, células escamosas podem ser vistas	Agressivo padrão de invasão, ausência das características definitivas do grau III
Grau III	Predominância de células escamosas, células intermediárias e mucosas podem estar presentes, padrão mais sólido	Necrose perineural, invasão vascular e óssea, >4 mitoses/10 campos (HPF), alto grau de pleomorfismo nuclear
Características	Pontuação	
Componente intracístico <25%	2	
Parte da frente do tumor invadindo em pequenos ninhos e ilhas	2	
Pronunciada atipia nuclear	2	
Invasão linfática e/ou vascular	3	
Invasão óssea	3	
>4 mitoses/10 campos (HPF)	3	
Propagação perineural	3	
Necrose	3	
	Grau I	0
	Grau II	2-3
	Grau III	4 ou mais

8.2 Anexo 2: Figuras



Figuras 1 e 2: Fotomicrografia do CME de baixo grau histológico (Fig. 1) e grau intermediário (Fig. 2) x400, coloração para HE.

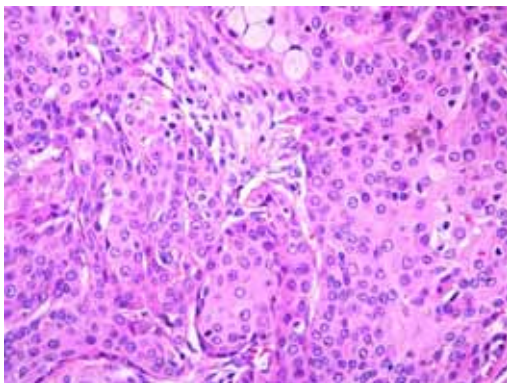


Figura 3 e 4: Fotomicrografia do CME de alto grau histológico x400, coloração para HE; imagem clínica de CME localizado em palato (Fonte CGDB).

8.3 Anexo 3:

Protocolo de aprovação do Comitê de ética em Pesquisa Médica Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás.

8.4 Anexo 4: Caracterização da amostra de CME de glândulas salivares menores:

	Bloco	Gênero	Idade	Localização	Gradação	Tratamento	Sobrevida	Desfecho
Caso 1	B94/0955-1	M	26	Palato	I	Cirurgia	119	Vivo
Caso 2	B95/9709	M	19	Palato	I	Cirurgia	156	Vivo
Caso 3	B96/3128-1	F	75	Língua	II	Cirurgia	151	vivo
Caso 4	B98/2876	M	13	Mucosa Jugal	II	Cirurgia	128	vivo
Caso 5	B98/4337	F	35	Palato	III	Cirurgia	162	vivo
Caso 6	B99/9528-1	M	76	Língua	I	Cirurgia	22	morto
Caso 7	B99/4540	F	42	Língua	I	Cirurgia	154	vivo
Caso 8	B99/13207-5	F	73	Mucosa Jugal	I	Cirurgia	107	vivo
Caso 9	B00/6322-5	M	54	Palato	I	Cirurgia + Rad	88	vivo
Caso 10	B00/2632	F	24	Palato	II	Cirurgia + Rad	235	vivo
Caso 11	B01/01206-1	M	56	Palato	II	Cirurgia	93	vivo
Caso 12	B01/10676-D	M	25	Palato	II	Cirurgia	86	vivo
Caso 13	B01/10290	M	17	Palato	II	Cirurgia	85	vivo
Caso 14	B01/12838	M	40	Palato	III	Cirurgia + Rad	65	morto
Caso 15	B04/10139	F	38	Língua	II	Cirurgia + Rad	51	vivo
Caso 16	B04/10330-1	F	27	Palato	II	Cirurgia	50	vivo
Caso 17	B04/13273	F	62	Palato	II	Cirurgia + Rad	47	vivo
Caso 18	B05/2477-1	F	67	Soalho	III	Cirurgia	47	vivo
Caso 19	B05/06892	F	36	Palato	II	Cirurgia	41	vivo
Caso 20	B05/10885	F	33	Palato	I	Cirurgia	30	vivo
Caso 21	B06/15665	F	30	Mucosa Jugal	I	Cirurgia	35	vivo
Caso 22	B06/00182	F	16	Palato	I	Cirurgia	33	vivo
Caso 23	B06/04860	M	51	Língua	II	Cirurgia + Rad	31	vivo
Caso 24	B06/06658	F	27	Palato	III	Cirurgia	32	vivo
Caso 25	B06/14190	F	27	Mucosa Jugal	III	Cirurgia	24	vivo
Caso 26	B07/06004	F	27	Palato	II	Cirurgia	19	vivo
Caso 27	B07/07884	F	19	Palato	II	Cirurgia	19	vivo
Caso 28	B07/09662	M	29	Língua	II	Cirurgia	14	vivo
Caso 29	B07/12037	M	48	Palato	II	Cirurgia	12	vivo
Caso 30	B07/12618	F	71	Mucosa Jugal	III	Cirurgia	1	morto
Caso 31	076-03	F	60	Soalho	I	Cirurgia	64	vivo
Caso 32	100-03	F	44	Rg Retromolar	I	Cirurgia	65	vivo
Caso 33	262-05	F	6	Mucosa Jugal	I	Cirurgia	39	vivo
Caso 34	632-06	M	30	Palato	I	Cirurgia	36	vivo
Caso 35	403-07	F	49	Rg Retromolar	I	Cirurgia	11	Vivo