

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

**AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO HGF/C-MET EM
NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE GLÂNDULAS
SALIVARES**

ARTUR CUNHA VASCONCELOS

Porto Alegre
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

Linha de pesquisa: Câncer Bucal

Tese:

**AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO HGF/C-MET EM
NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE GLÂNDULAS
SALIVARES**

por

ARTUR CUNHA VASCONCELOS

Orientadora: Profa. Dra. Manoela Domingues Martins

Porto Alegre
2014

ARTUR CUNHA VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO HGF/C-MET EM
NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE GLÂNDULAS
SALIVARES**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Doutorado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração em Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Manoela Domingues Martins

Porto Alegre
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Vasconcelos, Artur Cunha
AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO HGF/C-MET EM
NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE GLÂNDULAS
SALIVARES / Artur Cunha Vasconcelos. -- 2014.
122 f.

Orientador: Manoela Domingues Martins.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2014.

1. GLÂNDULAS SALIVARES. I. Martins, Manoela
Domingues, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **João Batista Vasconcelos** e **Sandra Cunha**, pelo exemplo de vida e porque sempre me ensinaram a lutar por meus objetivos.

Aos meus irmãos, **Tatiane Cunha Vasconcelos** e **Felipe Cunha Vasconcelos**, pelo incentivo mesmo estando de longe, sempre estiveram muito presente em minha vida e compreender meus momentos de estudo e construção desta pesquisa.

A toda a minha **família** de mãe e pai por todo o apoio em toda a minha vida.

Vocês são meus maiores exemplos de vida, que deram condições e apoio durante toda minha trajetória para concretizar meus sonhos. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Meu profundo obrigado a minha orientadora e professora **Prof.Dra. Manoela Domingues Martins**, por sua brilhante e competente orientação, credibilidade conferida para realização deste trabalho, esforço, dedicação e presença constante. Sou grato em contar com a experiência de uma professora fascinante e admirável e que me apoiou e me carregou durante minha caminhada acadêmica. Agradeço imensamente o quanto fez e faz não só por mim, mas por todos em sua volta. Agradeço também por essa chance de estudar patologia pois sempre foi uma área de muito interesse para mim.

Sou muito grato à amiga e colega **Vivian Petersen Wagner**. É bom saber que temos amigos em quem podemos confiar, pessoas que nos apoiam e acolhem com carinho nos momentos difíceis. Conte comigo para o que for possível. Meu sincero e eterno agradecimento.

Ao **Prof. Dr. Pantelis Varvak Rados** por esta oportunidade, recepção e pelos ensinamentos na docência.

Ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho** pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Vinicius Coelho Carrard** pelo apoio, compreensão, conhecimentos, por todo ensinamento oferecido desde o início.

À **Profa. Dra. Laura Campos Hildebrand** pela dedicacao, paciência e compreensão.

À **Profa. Dra. Fernanda Visioli** pela convivência, por acreditar em mim e ter sido uma parceira acompanhando meu processo de formação.

Ao **Prof. Dr. Marco Antonio Trevizani Martins** pela atenção, incentivos, ensinamentos, confiança e amizade.

À **Profa. Dra. Marcia Gaiger de Oliveira** pelo apoio e disponibilidade em ajudar.

À **Profa. Dra. Anna Fossati** pela disponibilidade e incentivos dispensados.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Lazon Lamers** pela força e por ter criado momentos de encontros importantes de estudo.

À **Profa. Dra. Luise Muerer** pelo compromisso, competência e parceria inestimável.

Ao **Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas e Felipe Paiva Fonseca** pelo apoio prestado em todas etapas realizadas na UNICAMP.

À **Profa. Dra. Lelia Batista de Souza** pelo exemplo profissional, incentivo e disponibilidade.

Aos professores **Rogério Moraes Castilho** e **Cristiane Helena Squarize** pelo auxílio com a imunistoquímica e valorosas discussões.

À **Profa. Dra. Maria Cristina Munerato** pela atenção, aprendizado e apoio no HCPA.

À **Alessandra Selinger Magnusson, Flavia Rejane Giusti, Chris Krebs Danilevicz e Isabel lauxen** pelo suporte, técnico e logístico na condução da pesquisa, bondade e sabedoria.

Aos amigos **Alessandra Dutra, Alessandro Menna, Ana Carolina Amorim Pellicoli, Ana Claudia Flores, Bruna Maraschin, Carlos Alberto Nascimento, Felipe Nor, Francine Martelli, Gabriela Salvadori da Silva, Grasieli Ramos, Isadora Peres Klein, Kelly Dias, Liana Webber, Marina Curra, Natalia Koerich, Thaise Nobrega e Viviane Palmeira** que foram meus grandes parceiros de trabalho a qual dedico minha eterna gratidão.

À **UFGRS** por tornar possível a realização do curso de Pós-Graduação.

À **CAPES, Fundação de Incentivo à Pesquisa do HCPA (FIPE/GPPG), CNPq e UMICH** pelo apoio financeiro ao longo do doutorado.

Se, de alguma forma, não mencionei ou deixei de lembrar algum nome, meu pedido de perdão.

Sei que todos são importantíssimos. Meu apreço e meu “obrigado”.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DA LITERATURA.....	5
OBJETIVOS.....	42
ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	43
ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ANEXOS

RESUMO

As neoplasias de glândula salivar (NGS) são tumores raros que despertam interesse por sua diversidade histopatológica e comportamento clínico. A compreensão da patobiologia assim como, dos mecanismos envolvidos no comportamento invasivo destas lesões é necessária para melhor entender a biologia das NGS e posteriormente delinear novas estratégias terapêuticas. A presente tese foi dividida em dois artigos. O objetivo do primeiro estudo foi descrever os dados demográficos, clinicopatológicos e de prognóstico das NGS diagnosticados em um centro de atenção terciário. Para tal, foi realizada uma análise retrospectiva utilizando os dados de arquivos e de prontuários. Foram identificados 109 casos de NGS cuja média de idade dos pacientes foi de 46.47 anos e a relação homens:mulheres foi de 0.94:1. As glândulas salivares maiores foram mais acometidas (75.2%) e os tumores benignos os mais prevalentes (75.2%) sendo o adenoma pleomórfico o tumor benigno mais comum e o carcinoma adenóide cístico o principal maligno. O objetivo do segundo estudo foi analisar o padrão de expressão da via de sinalização do HGF/c-Met/PI3K em NGS e correlacionar com o perfil proliferativo e desfechos clínicos das lesões. Foram construídos microarranjos de tecido (TMAs) de 93 casos de NGs e as lâminas foram submetidas a análise imunohistoquímica para HGF, p-Met, p-Akt e Ki67. Foi observada maior expressão de HGF nos tumores benignos ($p=0.04$), enquanto que as proteínas p-Met ($p=0.03$), p-Akt ($p=0.00$) e Ki-67 ($p=0.00$) foram mais expressas nos tumores malignos. Nas neoplasias malignas houve maior ativação da via HGF observada pela maior expressão do seu receptor fosforilado (p-Met) bem como, maior ativação da via do PI3k pela fosforilação de Akt (p-Akt) resultando em um maior perfil proliferativo. Pode-se concluir que a via de sinalização do HGF/c-Met/PI3k parece estar ativa nas NGS regulando a proliferação especialmente nas neoplasias malignas.

Palavras-chave: neoplasias de glândulas salivares, fator de crescimento de hepatócito, c-Met, Akt, proliferação

ABSTRACT

Salivary gland tumors (SGT) are rare yet interesting neoplasms due to their histopathological diversity and clinical behavior. Understanding the pathobiology as well as the mechanisms involved in the invasive behavior of these lesions is needed to better comprehend the biology of SGT and further delineate new therapeutic strategies. This thesis was divided in two papers. The aim of the first study was to describe the demographic, clinicopathological and prognostic data of SGT diagnosed in a tertiary care center. For this purpose, a retrospective analysis using data from the archives and records was performed. One hundred and nine cases of SGT were identified. The patients mean age was 46.47 years and the male:female ratio was 0.91:1. The major salivary glands were the most affected (75.2%) and the benign SGT were more prevalent (78%) being pleomorphic adenoma the most common benign tumor and adenoid cystic carcinoma the most common malignant tumor. The objective of the second study was to analyze the expression pattern of HGF/c-Met/PI3K signaling pathway in SGT and correlate the findings with the proliferative profile and clinical outcomes of cases. Tissue microarrays (TMAs) of 93 cases of SGT were constructed; the slides were submitted to immunohistochemical analysis for HGF, p-Met, p-Akt and Ki-67. Increased expression of HGF was observed in benign tumors ($p = 0.04$), while p-Met ($P = 0.03$), p-Akt ($p = 0:00$) and Ki-67 ($p = 0:00$) were most expressed in malignant tumors. In salivary glands carcinomas there was a higher activation of the HGF pathway observed by the higher expression of its phosphorylated receptor (p-Met) as well as the higher activation of PI3k pathway through Akt (p-Akt) phosphorylation, resulting in a higher proliferative profile. It can be concluded that HGF/c-Met/PI3K signaling pathway appears to be active in SGT regulating the proliferation specially in malignant tumors.

Keywords: salivary gland, neoplasias, hepatocyte growth factor, c-Met, Akt, proliferation

LISTA DE TABELAS

Lista de tabelas da revisão da literatura

Tabela 1. Características morfológicas e gradação histopatológica do carcinoma mucoepidermóide (Barnes et al, 2005).	13
Tabela 2. Sistema de Gradação proposto por Brandwein et al (2001) com descrição das características e pontos avaliados nos CME de glândulas salivares.	14
Tabela 3. Estadiamento proposto pela American Joint Committee on Cancer* para neoplasias malignas de glândulas salivares.	15
Tabela 4. Efeitos biológicos do HGF nas células intra-tumorais. Adaptado de MIZUNO e NAKAMURA, 2013.	29

Lista de tabelas do artigo 1

Table I. Distribution of the 109 salivary gland tumors according to the location.	49
Table II. Histologic and gender distribution of 109 salivary gland tumors.	49
Table III. Distribution of 109 benign and malignant salivary gland tumors according to age (years-old).	49
Table IV. Distribution of salivary glands tumors in different countries.	50

Lista de tabelas do artigo 2

Table 1. Antibodies, Origin, clone, antigen retrieval, dilution and detection system used for immunohistochemistry.	64
Table 2. Spearman's correlation coefficients in benign SGT.	73
Table 3. Spearman's correlation coefficients in malignant SGT.	73

LISTA DE FIGURAS

Lista de figuras da revisão da literatura

- Figura 1. Processo de produção do HGF. Fonte: MIZUNO e NAKAMURA, 2013. 25
- Figura 2. Via de sinalização HGF/c-MET. Fonte: PIRKER e POPPER, 2007. 28
- Figura 3 - Estrutura da variante 1 da proteína Akt. Importantes resíduos contidos dentro dos domínios catalítico (Thr308) e regulatório (Ser473). Fonte: MARQUES 2007. 34
- Figura 4 - Mecanismo de ativação e principais alvos envolvidos na via de sinalização da proteína Akt responsáveis pela inibição da apoptose e proliferação celular. Fonte: MARQUES 2007 35

Lista de figuras do artigo 1

- Fig.1. Distribution of the 109 salivary gland tumors according to their occurrence in major or minor salivary glands. 48

Lista de figuras do artigo 2

- Figure 1. Higher expression of HGF in benign SGT. (A) Representative examples of HGF expression in normal salivary glands and in SGT. (B) Analysis of HGF positive cases in SGT. Note that PA presented the higher percentage of positive cases compared to malignant SGT (Pearson chi-square test, $p < 0.00$). (C) Benign SGT presented higher expression of HGF compared to malignant tumors (Mann-Whitney test, $p = 0.04$). 67
- Figure 2. Higher expression of p-Met in malignant SGT. (A) Representative examples of p-Met expression in normal salivary glands and in SGT. (B) Analysis of p-Met positive cases in SGT. (C) Malignant SGT presented higher expression of p-Met compared to benign tumors (Mann-Whitney test, $p = 0.03$) 69
- Figure 3. Higher expression of p-Akt in malignant SGT. (A) Representative 70

examples of p-Akt expression in normal salivary glands and in SGT. (B) Analysis of p-Akt positive cases in SGT. Note that malignant tumors presented the higher percentage of positive cases compared to PA (Pearson chi-square test, $p < 0.00$). (C) Malignant SGT presented higher expression of p-Akt compared to benign tumors (Mann-Whitney test, $p < 0.00$)

Figure 4. Higher proliferative profile of malignant SGT. (A) Malignant salivary gland tumors exhibited higher value of Ki-67 expression compared to benign tumors (Mann-Whitney test, $p < 0.00$) (B) Representative examples of Ki67 expression in SGT

71

Figure 5. Association between of p-Met expression and clinical stages of malignant SGT. Salivary gland carcinomas in more advanced clinical stages presented higher expression of p-Met (Mann-Whitney test, $p = 0.04$)

72

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândulas salivares (NGS) representam um amplo grupo de lesões incomuns que perfazem cerca de 3% a 5% das neoplasias de cabeça e pescoço. A incidência mundial está em torno de 3 casos/100.000 pessoas. O diagnóstico dessas lesões é desafiador, tendo em vista a ampla variedade de padrões morfológicos e o distinto comportamento biológico (SAGHRAVANIAN et al., 2013).

Recentes avanços no campo da biologia celular e molecular têm permitido uma análise mais abrangente das NGS, especialmente em relação à heterogeneidade dessas lesões. Neste sentido, estudos destinados a ampliar a compreensão das alterações clínicas, histopatológicas e imunoistoquímicas das NGS, bem como alterações genéticas envolvidas no seu desenvolvimento e agressividade, vêm sendo realizados, com o intuito de estabelecer prognóstico e de desenvolver novas estratégias terapêuticas (VARGAS et al, 2008a; VARGAS et al, 2008b; LUJAN et al, 2010; GOMES et al, 2012a; GOMES et al, 2012b; BELL e EL-NAGGAR, 2013; NESKEY et al, 2013; ZHANG et al, 2013).

A carcinogênese é um processo que se faz em várias etapas, tanto a nível genético quanto fenotípico. Múltiplos genes e suas proteínas correspondentes estão relacionados em uma ou mais vias com a promoção ou supressão tumoral (COTRAN et al, 2000). Atualmente, existe uma vasta literatura relatando o papel dos fatores de crescimento e seus receptores na ativação das vias de sinalização intracelulares envolvidas na regulação da diferenciação, sobrevivência, metabolismo, mobilidade e crescimento celular nos diferentes tipos de câncer. Isto, porque a desregulação dos fatores de

crescimento, de seus receptores e das diversas vias de sinalização são responsáveis pela aquisição do fenótipo maligno, da capacidade de invasão e metástase destas lesões (LESKO e MAJKA, 2008; COHEN et al, 2011; SNIETURA et al, 2012; ALYASIRI et al, 2012). Estes estudos são fundamentais para compreender a patogênese do câncer, identificação de marcadores biológicos de progressão tumoral e para o desenvolvimento de terapias alvo específicas que atuem na regulação dessas vias.

O HGF (do inglês *hepatocyte growth factor*), também conhecido como fator de dispersão, é um dos principais fatores envolvidos no crescimento invasivo de neoplasias (TRUSOLINO e COMOGLIO, 2002). Isto, porque o HGF pode integrar as respostas biológicas aparentemente independentes que constituem o modo de crescimento invasivo, tais como dissociação de células, transição epitélio-mesênquima (TEM), invasão da matriz extracelular (MEC), motilidade e sobrevivência, ativando um conjunto específico de vias de sinalização quando se liga ao seu receptor c-Met (DE HERDT e BAATENBURG DE JONG, 2008). A produção de HGF é limitada a células de origem mesenquimal e atua predominantemente sob células epiteliais e endoteliais que expressam o seu receptor tirosina-quinase (c-MET) (BIRCHMEIER et al, 2003).

Os efeitos biológicos do HGF são mediados após a sua interação com seus receptores c-MET, que são heterodímeros de 190 KDa, formados por duas unidades dissulfídicas ligadas: uma cadeia alfa extracelular de 50KDa e uma cadeia beta transmembrana de 145 KDa, mostrando atividade tirosina quinase (COOPER, 1992). A ligação HGF/c-MET causa uma multimerização, fosforilação e ativação catalítica que recruta proteínas adaptadoras, como a

GAB-1, SHC e c-Cbl. A formação desses complexos estimula vias de sinalização diferentes, tais como: RAS/MAPK, PI3K/Akt, FAK(quinase de adesão focal), STAT 3/5, RAC/RHO, PLC-g(fosfolipase Cg), c-src, SHP2 e CRKL, que são essenciais para a regulação do crescimento, sobrevivência, motilidade, invasão e modificações no citoesqueleto das células neoplásicas (epitelial, mioepitelial e acinares) (FURGE et al, 2000).

A expressão aumentada de HGF/c-Met tem sido observada em uma gama de neoplasias, como a de tireóide (RUGGERI et al, 2010; RUGGERI et al, 2012; KOO et al, 2014), colorretal (MOORE et al, 2009; MATSUI et al, 2010), estômago (AMEMIYA et al, 2010; GRAZIANO et al, 2011; TOIYAMA et al, 2012; AMEMIYA et al, 2013), próstata), mama (KANG et al, 2003; LINDEMANN et al, 2007; LOCATELLI et al, 2012), pulmão (NAVAB et al, 2009; TRETIAKOVA et al, 2011; SCAGLIOTTI et al, 2013; OZASA et al, 2014) e de cabeça e pescoço (MARSHALL e KORNBERG, 1998; CHEN et al, 2004; BELLO et al, 2010; BRUSEVOLD et al, 2010; KIM et al, 2010; LIM et al, 2012). A elevação da imunomarcagem de HGF/c-MET tem sido associada com pior prognóstico de neoplasias, radioresistência, diminuição de sobrevida, resistência a apoptose e aumento de metástases (LESKO e MAJKA, 2008). Tendo em vista que a ligação HGF/c-MET desempenha papel importante na formação, progressão, e disseminação de vários tipos de neoplasias malignas epiteliais, estas proteínas têm sido um alvo terapêutico promissor para essas doenças. Além disso, estudos prévios sugerem que HGF/c-MET podem ser biomarcadores para neoplasias epiteliais malignas e ter um papel importante na carcinogênese humana. Entretanto, poucos trabalhos foram encontrados avaliando a expressão destes biomarcadores no carcinoma espinocelular

(CEC) de cabeça e pescoço (CHEN et al, 2004; VARGAS et al, 2008a; VARGAS et al, 2008b; BELLO et al, 2010; BRUSEVOLD et al, 2010; KIM et al, 2010; LIM et al, 2012) e em NGS (KLOSEK et al., 2005; HARA et al, 2006; DE HERDT et al, 2008; HARA et al., 2008; ACH et al, 2013; SUZUKI et al, 2003), justificando, portanto, os esforços em pesquisas que busquem elucidar a presença e o papel destes marcadores nesse grupo de neoplasias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Dentre os diferentes tipos de neoplasias que acometem as glândulas salivares maiores e menores, as benignas, especialmente o adenoma pleomórfico, e o mais comuns (LAWAL et al, 2013). As neoplasias malignas são lesões raras e mostram uma incidência anual de 2.2–3.0 casos a cada 100.000 pessoas nos Estados Unidos (ADAMS et al., 2013). Dentre estas, o carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenóide cístico e carcinoma de células acinares têm sido as mais relatadas, variando o percentual de incidência de acordo com o sítio anatômico acometido (VARGAS et al, 2002; ITO et al, 2005; FONSECA et al, 2012).

As NGS representam um amplo grupo de lesões incomuns que perfazem cerca de 3% a 5% das neoplasias de cabeça e pescoço. A incidência mundial está em torno de 3 casos/100.000 pessoas (de OLIVEIRA et al, 2009; ITO et al, 2005). Em virtude da sua complexidade de padrões histológicos, ainda representa uma desafio no seu diagnóstico.

2.1.1 Adenoma Pleomórfico

O Adenoma Pleomórfico (AP) é a neoplasia mais comum das glândulas salivares, correspondendo a cerca de 60% dos casos (EVESON et al, 1985). Trata-se de uma neoplasia benigna de origem epitelial composta por células que demonstram diferenciação epitelial e mesenquimal. Antigamente, era chamado de tumor misto, por apresentar componente epitelial e

mesenquimatoso. Entretanto, há alguns anos passou a ser chamado de AP devido a variabilidade de arranjos morfológicos (AUCLAIR et al, 1996).

A patogênese do AP ainda não está bem definida, assim como quais os fatores que estão relacionados com o risco de malignização. Alguns estudos têm demonstrado alterações citogenéticas em cerca de 70% dos casos de AP. O gene PLAG1, localizado no cromossomo 8q12, é o gene mais observado em alterações citogenéticas nos APs. Em 25% dos casos, têm sido descrito translocações no PLAG1 e o CTNNB1 nas regiões t(3;8) (p21;q12). Foram descritos 3 padrões de rearranjos, sendo observado alterações no cromossomo 8q12 em 39% dos casos de AP, no cromossomo 12q13-15 em 8% dos casos e alterações denominadas de esporádicas que não incluem as anteriormente descritas em cerca de 23% dos casos (DECLERQ et al, 2008; SONG et al, 2011).

O AP pode afetar indivíduos de qualquer idade, porém é mais freqüente em pacientes na quinta e sexta décadas de vida (AUCLAIR et al, 1996; RIVERA-BASTIDAS et al, 1996; ALVES et al, 2002; TOIDA et al, 2005; FONSECA et al, 2012). Geralmente, as mulheres são mais acometidas do que os homens (AUCLAIR et al, 1996; ALVES et al, 2002; TOIDA et al, 2005; ITO et al, 2005; PIRES et al, 2007; MENDENHALL et al, 2008; FONSECA et al, 2012).

Clinicamente, apresenta-se como nódulo assintomático, de consistência firme, crescimento lento e que pode atingir grandes dimensões quando não tratado (AUCLAIR et al, 1996; TAKAHAMA et al, 2008). A parótida é o local de maior predileção de desenvolvimento deste tumor e geralmente acomete a região inferior do lóbulo superficial, causando abaulamento sobre o ângulo da mandíbula. Na cavidade bucal, o principal sitio é o palato, seguido pela mucosa

jugal, lábio superior e região retromolar (TOIDA et al, 2005). Raramente são ulcerados, exceto quando são traumatizados secundariamente.

A histogênese desta neoplasia está relacionada com a transformação neoplásica da unidade ducto-acinar completa, ao invés do componente ductal (epitelial) em particular, como é visto em outras NGS (DARDICK, 1990; WEBB et al, 2001). Histologicamente, o AP se caracteriza pela proliferação neoplásica benigna de células epiteliais e mioepiteliais das glândulas salivares. Estas se arranjam em ninhos, cordões, espaços pseudo-císticos (túbulos), lençóis celulares e estruturas ductiformes com duas camadas celulares, uma mais internamente do tipo epitelial, e outra, externamente, do tipo mioepitelial. Essa organização celular resulta em diferentes padrões, propiciando uma ampla variedade citológica e arquitetural (DARDICK 1990; EVESON et al, 1985; AUCLAIR et al, 1996; ITO et al, 2009). As células mioepiteliais podem se apresentar com aspecto fusiforme, arredondadas ou plasmocitóide. O componente mesenquimal varia de mixóide, hialínio, condróide, osteóide ou uma associação destas variações, sendo as células mioepiteliais as responsáveis por estas modificações. No mesênquima, ainda, podem ser encontrados corpos psamomatosos (AUCLAIR et al, 1996; ITO et al, 2009). O componente epitelial do AP pode mostrar células com aspecto cuboidal, basalóide, escamoso, fusiforme, plasmocitóide e, algumas vezes, com citoplasma claro. Diferenciação sebácea e de células mucosas são vistos raramente (EVESON et al, 1985). As células mioepiteliais perdem sua forma estrelada com prolongamentos longos e delicados, assumindo morfologia angular, fusiforme, redonda, com núcleo excêntrico e citoplasma eosinófilo hialinizado, lembrando células plasmocitóides (CHAU et al, 1989; ITO et al,

2009). Estas células têm sido indicadas como as responsáveis pela produção de matriz extracelular no AP (SKALOVA et al, 1992; ITO et al, 2009).

Aproximadamente 1/3 destes tumores mostram uma proporção quase igual entre os componentes epitelial e mesenquimal (VEGARI et al, 2012). Entretanto, Seifert et al. (1976) classificaram os AP em 4 tipos, baseado na diferenciação das células epiteliais, quantidade e natureza do estroma. O tipo I, conhecido como clássico, apresenta proporção equilibrada entre as células epiteliais e o componente estromal (30-50% de estroma). No tipo II, chamado de mixóide (rico em estroma), 80% do tumor é composto pelo estroma. O tipo III é denominado de celular (rico em células). O Tipo IV possui proporção semelhante ao tipo III, porém exibe diferenciação monomórfica do componente epitelial.

O AP é tipicamente uma neoplasia encapsulada, bem circunscrita. No entanto, esta cápsula pode ser incompleta ou mostrar-se infiltrada por células neoplásicas. A cápsula incompleta é comumente encontrada nos tumores de glândulas salivares menores (WEBB et al, 2001).

O tratamento do AP consiste na sua completa remoção cirúrgica. Nos casos que afetam as glândulas menores, o tratamento consiste na remoção cirúrgica com pequena margem de segurança (AUCLAIR et al, 1996). Na casos de AP situados no lóbulo superficial da parótida, pode ser realizado parotidectomia superficial com pequena margem de tecido normal e preservação do nervo facial, com resultados no índice de controle local em torno de 95% (MENDENHALL et al, 2008). Nos casos em que a neoplasia está localizada no lóbulo profundo da parótida, uma parotidectomia total é recomendada (FORESTA et al, 2014). Quando afetam as glândulas

submandibulares, o tratamento deve ser a remoção da lesão e da glândula envolvida (ALVES et al, 2002).

O risco de transformação maligna do AP é pequeno, mas pode ocorrer em cerca de 5% dos casos (AUCLAIR et al, 1996; WORLEY et al, 1997). O risco tem sido relacionado com longo tempo de evolução, casos submetidos a vários procedimentos cirúrgicos, bem como histórico de diversas recorrências (TARAKJI et al, 2013). Microscopicamente, alguns aspectos têm sido descritos como indicativos de maior risco de transformação maligna, tais como: Atipia celular, aumento no número de mitoses, hiperplasia, invasão da cápsula por células neoplásicas, hialinização estromal intensa, calcificações focais e necrose (TARAKJI et al, 2013). Entretanto, AUCLAIR (1996) apenas consideram o estroma hialinizado e calcificações focais como preditores de transformação maligna. Biomarcadores da transformação maligna vem sendo estudados e de acordo com Freitas et al. (2005) tanto p53 como c-erbB-2 parecem estar envolvidos nos estágios iniciais de transformação maligna do AP.

Embora considerada uma neoplasia benigna, três subtipos de tumor misto maligno são descritos: (1) Adenoma Pleomórfico Metastático, no qual tanto o tumor primário quanto a metástase apresentam características histológicas de um tumor benigno; (2) Carcinoma Ex-Adenoma Pleomórfico (CXAP), caracterizado pela transformação maligna do componente epitelial do AP; e (3) Adenoma Pleomórfico Maligno Verdadeiro, ou também chamado de Carcinosarcoma, na qual tanto o tumor primário como as metástases consistem de tumor de origem epitelial e mesenquimal (OLSEN et al, 2001). O mais comum dentre esses é o CXAP, que representa cerca de 3,6% de todos

os tumores de glândulas salivares e 11,7% dentre os malignos (OLSEN et al, 2001; ANTONY et al, 2012).

2.1.2 Carcinoma mucoepidermóide

O carcinoma mucoepidermóide (CME) é uma neoplasia maligna epitelial que representa cerca de 2,8 a 15,5% das NGS. Em alguns estudos, é considerada a neoplasia maligna de glândulas salivares mais prevalentes, correspondendo a cerca de 14,4% a 32,5% dessas lesões (BARNES et al, 2005; BELLO et al, 2012; LUKSIC et al, 2011; FONSECA et al, 2012; WANG et al, 2012; BJØRNDAL et al, 2012). Aproximadamente 50% se originam em glândula salivar maior, sendo a parótida o local mais acometido e o palato o principal sítio intra-bucal (BARNES et al, 2005).

O CME pode acometer ampla faixa etária, com pico de prevalência entre a quarta e quinta décadas de vida (PIRES et al, 2004; OTOH et al, 2005; RAPIDIS et al, 2007; FONSECA et al, 2012) e com discreta predileção pelo gênero feminino (BRANDWEIN et al, 2001, BARNES et al, 2005; FONSECA et al, 2012). Aproximadamente 60% dos pacientes afetados têm idade acima de 40 anos, com média de 45 anos no momento do diagnóstico (BARNES et al, 2005; FONSECA et al, 2012). Embora seja raramente observado nas primeiras décadas de vida, é o tumor de glândula salivar mais comum em crianças e adolescentes (HICKS et al, 2000; TRIANTAFILLIDOU et al, 2006; VÉDRINE et al, 2006; FONSECA et al, 2012).

Clinicamente, se apresenta como nódulo firme, de crescimento lento, indolor, embora eventualmente possa estar associado a dor, paralisia e ulceração superficial. CME localizados mais superficialmente podem exibir uma

coloração azulada-arroxeadada e mimetizar lesões de retenção de saliva (mucocele) ou lesões vasculares. Aquelas lesões que se desenvolvem próximo ao tecido ósseo podem causar erosão superficial (BARNES et al, 2005).

A origem dos CME é incerta (CHAUDHRY et al, 1989; HASSANIN et al, 1989; LUNA, 2006), entretanto, dentre as diferentes teorias especulativas quanto a histogênese das NGS, acredita-se que o CME seja derivado das células de reserva dos ductos excretorios (EVERSOLE, 1971; BATSAKIS, 1980; DARDICK et al, 1984; LOYOLA et al, 1998; ADAMS et al, 2013). Esta hipótese se baseia na teoria de que as células progenitoras do ducto excretor seriam responsáveis pela formação de células escamosas, mucosas e colunares, enquanto que as do ducto intercalado, pelas células acinares, do ducto intercalado e estriado, e provavelmente também das células mioepiteliais (EVERSOLE, 1971).

Histologicamente, os CME apresentam proporção variada de células mucosas, células epidermóides, intermediárias, colunares e claras. A quantidade de cada tipo celular e o arranjo arquitetural (cístico e sólido) varia dentro de uma mesma neoplasia e influencia o grau de malignidade e o comportamento biológico da lesão. Essa neoplasia é usualmente multicística, com áreas de arranjo sólido. Em alguns casos, porém, o componente sólido pode ser o predominante (GOODE et al, 1998; SOBRAL et al, 2001; BARNES et al, 2005; LUNA, 2006; NANCE et al, 2008). Os espaços císticos são revestidos por células mucosas, células intermediárias cuboidais e basalóides dispersas e, em menor quantidade, podem ser observadas células epidermóides poligonais que raramente formam pérolas de queratina. As células mucosas são PAS e mucicarmin positivas e apresentam citoplasma

amplo, pálido e núcleo deslocado para a periferia. Populações de células claras, colunares e/ou oncocíticas podem estar presentes e, ocasionalmente, são proeminentes (JAHAN-PARWAR et al, 1999; BARNES et al, 2005; KRISHNANAND et al, 2007). Invasão perineural, necrose, aumento do número de mitoses e anaplasia celular são incomuns e, quando presente, indicam alto grau de malignidade (AUCLAIR et al, 1992; GOODE et al, 1998; BARNES et al, 2005). Ocasionalmente, pode ser vista cápsula definida e, usualmente, o tumor infiltra o parênquima da glândula adjacente.

Diversos sistemas e critérios de classificação (gradação) para os CME foram descritos na literatura, sem existir um consenso. As classificações mais utilizadas (AUCLAIR et al, 1992; GOODE et al, 1998) subdividem os CME em três graus de malignidade (baixo, intermediário e alto), baseado na proporção relativa dos principais tipos celulares, grau de invasão, padrão de invasão, quantidade de mitoses, proporção relativa de espaços císticos em relação com o grau de formação sólida, e invasão neural e vascular (LUNA, 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) (BARNES et al, 2005), em sua última publicação dos tumores de cabeça e pescoço, adota a gradação histológica do CME acima descrita e que está representada na Tabela 1. Esta subdivisão tem se mostrado útil no estabelecimento da terapêutica e na avaliação do prognóstico desta neoplasia (SOBRAL et al, 2001).

Tabela 1. Características morfológicas e gradação histopatológica do carcinoma mucoepidermóide (Barnes et al, 2005).

Características	Pontos
Componente intracístico < 20%	2
Invasão neural	2
Necrose	3
Mitoses (4 ou mais/ 10 HPF)	3
Anaplasia	4
Grau de malignidade	Pontos
Baixo	0-4
Intermediário	5-6
Alto	7 ou mais

HPF (High Power Fields)- Campo de maior aumento

Outro sistema de gradação comumente utilizado foi proposto por BRANDWEIN et al (2001), semelhante ao sistema anteriormente descrito, e pode ser observado na Tabela 2. Este sistema leva em consideração, além do componente intracístico, invasão neural, necrose e número de mitoses, também a invasão linfática, vascular ou óssea, padrão de invasão e atipia nuclear, o que pode conferir maior acurácia à gradação. Todavia, esses critérios não podem ser aplicáveis em casos de biópsias incisionais ou que envolvam pequena quantidade de material, e atipia nuclear é uma característica incomum deste tipo de lesão, independentemente do grau de malignidade que possa apresentar.

Tabela 2. Sistema de Gradação proposto por Brandwein et al (2001) com descrição das características e pontos avaliados nos CME de glândulas salivares.

Características	Pontos
Componente intracístico < 25%	2
Padrão de Invasão em pequenos ninhos e ilhas	2
Atipia nuclear pronunciada	2
Invasão linfática e ou vascular	3
Invasão óssea	3
Acima de 4 mitoses/10HPF*	3
Extensão perineural	3
Necrose	3
Classificação	Pontos
Grau I	0
Grau II	2-3
Grau III	4 ou mais

HPF*- High Power Fields (campos de maior aumento)

O CME pode exibir variável agressividade biológica correlacionada, principalmente com o estadiamento clínico e grau histológico de malignidade, descrito anteriormente. Esses dois critérios têm sido tradicionalmente usados na determinação do tratamento e avaliação do prognóstico dessa lesão (NASCIMENTO et al, 1986; BRANDWEIN et al, 2001). O estadiamento clínico do CME de glândulas salivares maiores baseia-se em dados como tamanho da lesão, envolvimento linfonodal e metástase (AUCLAIR, 1996) e estão descritos

na Tabela 3. Este sistema foi criado para a avaliação de neoplasias malignas em glândulas salivares maiores. Nos casos de neoplasias de glândulas salivares menores, os principais critérios a serem considerados são o tamanho da lesão e localização, pois o envolvimento linfonodal e metástase são menos freqüentes (TRANTAFILLIDOU et al, 2006).

Tabela 3. Estadiamento proposto pela American Joint Committee on Cancer* para neoplasias malignas de glândulas salivares.

Estadio	Tumor Primário	Doença	
		Linfonodal	Metastatica
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
Estadio IV	T3	N1	M0
	Qualquer T	N2	M0
	Qualquer T	N2	M0
	Qualquer categoria com T4		
	Qualquer categoria com M1		

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

O tratamento de escolha para o CME é, até o momento, a ressecção cirúrgica, sendo a radioterapia uma importante associação nos tumores de alto grau. Cerca de 55% dos CME de alto grau provenientes de glândula salivar maior e 80% nos originados em glândula salivar menor desenvolvem metástases. Já os tumores de baixo grau mostram metástases em 17% dos casos e tem recorrência em 9% destes. Desta forma, a radioterapia, após uma ampla excisão cirúrgica do tumor, tem sido recomendada para CME de alto grau de malignidade. Linfadenectomia e radioterapia adjuvante são indicadas quando há comprometimento nodal cervical (AGULNIK et al, 2004; NANCE et al, 2008).

Apesar do estadiamento clínico se mostrar importante, as características histopatológicas têm sido mais relevantes na determinação do comportamento do CME. A maioria dos pacientes tem bom prognóstico; apenas 8% dos pacientes morrem da doença. O prognóstico está diretamente relacionado ao estadiamento e ao grau histopatológico do tumor (GOODE et al, 1998). A variante tumoral de baixo grau geralmente apresenta bom prognóstico, com taxa de sobrevivência em 5 anos de 76-95%. Por outro lado, CME de alto grau são agressivos, mostram comprometimento linfonodal e a taxa de sobrevivência em 5 anos cai para 30-50% (GOODE et al, 1998; NANCE et al, 2008). Alguns CME podem sofrer disseminação que tipicamente ocorre para linfonodos e tecidos moles adjacentes. Metástases à distância são raras e, quando ocorrem, afetam mais comumente pulmão, ossos e fígado (ARAKAWA et al, 2008; LUNA, 2006). Trabalhos recentes sugerem que a localização do tumor, também, deve ser considerada um fator prognóstico, já que tumores originados em região submandibular, mesmo de baixo grau, apresentam um curso mais agressivo,

demandando uma terapêutica mais radical (BARNES et al, 2005). Interessantemente, quando crianças e adolescentes são acometidos, o CME exibe um comportamento clínico mais favorável (da CRUZ PEREZ et al, 2004; HICKS et al, 2000; GONÇALVES et al, 2011).

Alguns trabalhos que tentaram estabelecer marcadores prognósticos para o CME os relacionaram à gradação histológica dos tumores. Os resultados destes estudos revelaram expressão aumentada das proteínas Ki-67, p53 e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) associados aos CME de alto grau de malignidade (NGUYEN et al, 2003; PIRES et al, 2004; TRIANTAFILLIDOU et al, 2006; VACCHI-SUZZI et al, 2010). Inversamente, altos índices de antígeno carcinoembrionário (CEA) e bcl-2 foram relacionados a neoplasias de baixo grau de malignidade (PIRES et al, 2004; JANJUA et al, 2013).

2.1.3 Carcinoma adenóide cístico

O carcinoma adenóide cístico (CAC) é definido pela OMS como uma neoplasia basalóide que se caracteriza pela presença de células epiteliais e mioepiteliais com vários arranjos morfológicos, incluindo o padrão tubular, cribriforme e sólido. O CAC corresponde a cerca de 10% de todas as neoplasias malignas de glândulas salivares (BARNES et al, 2005). 55% desses tumores são encontrados nas glândulas maiores (principalmente na parótida e glândula submandibular) e 45% nas glândulas salivares menores (AUCLAIR, 1996).

Representa cerca de 30% das neoplasias epiteliais de glândulas salivares, sendo observado, preferencialmente, em palato, seguido pela língua,

mucosa jugal, mucosa labial e assoalho bucal (da CRUZ PEREZ et al, 2004; ITO et al, 2005; da CRUZ PEREZ et al, 2006a; PIRES et al, 2007; FONSECA et al, 2012).

ITO et al. (2005) realizaram um levantamento das neoplasias que afetavam as glândulas salivares maiores e menores numa amostra proveniente de uma população brasileira. Do total de 496 casos, o CAC foi a 4ª neoplasia mais frequente, correspondendo a 7,9% do total. Dentre as malignas, foi a 2ª mais comum, correspondendo a 24,2% dos casos diagnosticados. Em outro estudo, FONSECA et al. (2012) avaliaram 493 neoplasias de glândulas salivares. Deste total, 22 casos foram diagnosticados como CAC, representando 4.4% de todas as neoplasias e 17.7% dentre as malignas.

Com relação à idade dos pacientes acometidos pelo CAC, a maior incidência foi verificada na quinta década de vida, sendo incomum em jovens (AUCLAIR et al, 1996; RAPIDIS et al, 2005; LOYOLA et al, 1995; da CRUZ PEREZ et al, 2004; MOUKARBEL et al, 2008; FONSECA et al, 2012). Já com relação à distribuição desta neoplasia por gênero, a literatura não apresenta um consenso (NASCIMENTO et al, 1986; VAN DER WAL et al, 2002; RAPIDIS et al, 2005; MOUKARBEL et al, 2008; FONSECA et al 2012).

Clinicamente, estas neoplasias se apresentam como lesões nodulares, de crescimento lento e persistente, podendo apresentar infiltração tecidual e dor (NASCIMENTO et al,1986; RAPIDIS et al, 2005; da CRUZ PEREZ et al, 2006; YURUT-CALOGLU et al, 2007). Alguns casos de CAC em parótida podem apresentar paralisia facial, sendo este um indicativo de pior prognóstico (da CRUZ PEREZ et al, 2006a; da CRUZ PEREZ et al, 2006b). Invasão perineural, metástases à distância (principalmente envolvendo pulmão, ossos, fígado e

cérebro) e recorrências múltiplas já foram relatadas para essa neoplasia (KOKEMUELLER et al., 2004; RAPIDIS et al, 2005; da CRUZ PEREZ et al, 2006a).

Os aspectos histopatológicos do CAC demonstram a participação de dois tipos celulares principais: as células epiteliais ductais (luminais); e as células mioepiteliais (não luminais), com predominância destas últimas (RAPIDIS et al, 2005). As células podem se arranjar em diferentes padrões morfológicos, sendo classificados em padrão cribriforme, tubular e sólido. Usualmente, existe uma combinação destes padrões e a neoplasia é, então, classificada com base no padrão predominante (RAPIDIS et al, 2005).

O padrão cribriforme é a variante mais comum e se caracteriza por ilhas de células neoplásicas pequenas e cuboidais de aspecto basalóide, mostrando um núcleo angulado, pequeno, escuro, com citoplasma escasso, delimitando espaços císticos cilindromatosos. Estes espaços císticos contêm material mucóide e/ou hialinizado. O tipo tubular é composto por células neoplásicas formando múltiplos ductos de pequeno calibre ou túbulos envoltos por estroma hialino. O padrão sólido é o menos comum e se caracteriza por ilhas epiteliais sólidas uniformemente basalóides, com áreas de necrose central. As células são pequenas, basofílicas e hiper cromáticas, com núcleo densamente granular e raras figuras mitóticas. Esta variante apresenta o pior prognóstico clínico (CLEVELAND et al, 1990; BHAYANI et al, 2012; FUJITA et al, 2012). O estroma geralmente é hialino e as invasões neurais e ósseas são relativamente comuns (AUCLAIR et al, 1996; BARNES et al, 2005).

O CAC não é encapsulado e apresenta tendência de recorrência local e metástase, mesmo após o tratamento. Dentre os pacientes diagnosticados com

CAC, cerca de 80%-90% morrem num período de 10-15 anos após esse diagnóstico, em função do alto índice de recidiva e metástase (MARCINOW et al, 2013). MATSUBA et al. (1986) reportaram taxa de recorrência de 18% em uma série de 71 pacientes seguidos por um período de 15 anos. SPIRO et al. (1997) mostrou uma taxa de insucesso no tratamento de 62%, sendo que 38% desses ocorreram devido às metástases.

As características histopatológicas do CAC têm sido correlacionadas a sua evolução. O padrão tubular apresenta o melhor prognóstico, seguindo para o padrão cribriforme. O padrão sólido apresenta o pior prognóstico. Além do padrão histopatológico, outros fatores prognósticos incluem tamanho (T), localização anatômica, presença ou ausência de metástases (M) no momento do diagnóstico, invasão do nervo facial, e condição da margem cirúrgica (BATSAKIS et al, 1990; QING et al, 2006; KO et al, 2007; AGARWAL et al, 2008; BIANCHI et al, 2008; MARCINOW et al, 2013).

O tratamento do CAC evolve a resecção cirúrgica com margem de segurança seguido, em alguns casos, de radioterapia. Nos casos de recidivas, as opções de tratamento são limitadas, tanto pela morbidade, como baixa resposta a novas intervenções cirúrgicas e radioterapia. A resposta desse tumor frente à quimioterapia tem sido baixa (BARNES et al, 2005; LEIVO et al, 2005; ADELSTEIN et al, 2012; BELL et al, 2012).

2.1.4 Carcinoma de células acinares

O carcinoma de células acinares (CCA) é uma neoplasia maligna epitelial rara cujas células exibem diferenciação acinar serosa ou mucosa. Corresponde a uma faixa de 7 a 17% das neoplasias malignas de glândula

salivar. A parótida é o local mais acometido (90% dos casos), seguido pelas glândulas salivares menores (principalmente da mucosa jugal e palato). Afeta, principalmente, adultos na 5ª década de vida (abrangência geral de 3 a 90 anos), com uma predileção mulher/homem de 2:1 (INOUE et al., 1984; GUIMARÃES et al, 1989; HOFFMAN et al,1999; ORVIDAS et al, 2000; AL-ZAHER et al, 2009; MUNTEANU et al, 2012). Depois do carcinoma mucoepidermóide, o carcinoma de células acinares é o tumor maligno de glândula salivar mais frequente em crianças, assim como é o mais frequente a apresentar bilateralidade (EVESON e CAWSON, 1985; SPIRO, 1986; ELLIS et al, 1991; NAPIER et al, 1995; JIA et al, 2012; Durand et al, 2013;).

Histologicamente, o CCA é formado por dois tipos básicos de células: as células serosas acinares e as células intercalares. As células acinares são grandes, poligonais, com citoplasma granular basofílico e núcleo excêntrico. O citoplasma contém grânulos de zimogênio (BARNES et al, 2005). Estas células são PAS e mucicarmin positivas (CHAUDHRY et al,1986). As células intercalares são pequenas, cuboidais, eosinofílicas a anfófilicas, com o núcleo centralizado e circundado por um espaço luminal de tamanho variável. Células vacuolizadas, claras e glandulares não específicas também são descritas. As células vacuolizadas contêm vacúolos citoplasmáticos que variam de tamanho e número; as células claras são similares em tamanho e aparência com as células acinares, mas o citoplasma não é corado; já as células glandulares não específicas são redondas a poligonais, anfófilicas a eosinofílicas, com núcleo redondo e bordas celulares pobremente demarcadas. As figuras de mitose são raras (SAITO et al, 1989).

O CCA pode exibir vários padrões histológicos. São eles: sólido, microcístico, cístico-papilar e folicular. No padrão sólido, as células tumorais encontram-se arranjadas em ilhas, nódulos ou agregados. No padrão microcístico, são observados numerosos espaços pequenos, mas de tamanho variável. O padrão papilar-cístico é caracterizado por cistos proeminentes e grandes espaços císticos que são parcialmente preenchidos com proliferações papilares. No padrão folicular, múltiplos espaços císticos revestidos por células epiteliais são preenchidos por material proteináceo eosinofílico, que produz aparência semelhante a um folículo da tireóide (DRUT e GIMÉNEZ, 2008). Embora um único tipo celular e um único padrão de crescimento frequentemente predominem, em alguns casos pode ser observada uma combinação de tipos celulares e dos padrões de crescimento. Os padrões sólido/lobular e microcístico são os mais freqüentes, seguidos dos padrões papila-cístico e folicular (ELLIS e CORIO, 1983; LEWIS et al,1991). Entretanto, os padrões microscópicos parecem não influenciar no prognóstico (BARNES et al, 2005).

O tratamento de escolha do CCA é a ressecção cirúrgica com margem de segurança, sendo curativo na grande maioria dos casos. Estudos demonstram recorrência em 35% dos casos e metástases em 16%. Múltiplas recorrências e metástases em linfonodos indicam pior prognóstico. A presença de mitoses atípicas, necrose focal, invasão neural, pleomorfismo, infiltração e hialinização do estroma estão associados a neoplasias mais agressivas e com pior prognóstico. Usualmente, as neoplasias localizadas na glândula submandibular são mais agressivas em comparação àquelas que acometem as

glândulas salivares menores (LEWIS et al,1991; BARNES et al, 2005; TRIANTAFILLIDOU et al, 2010).

A marcação de Ki-67 tem se mostrado um importante preditor do comportamento biológico nos CCA. Nos casos de CCA com marcação de Ki-67 abaixo de 5% das células tumorais tem sido associados com ausência de recorrência enquanto que os pacientes com mais de 10% de células marcadas apresentam comportamento desfavorável (SKALOVA et al,1994; TRIANTAFILLIDOU et al, 2010)

2.2 HGF/c-MET

Atualmente, existe uma vasta literatura relatando o papel dos fatores de crescimento e seus receptores na ativação das vias de sinalização intracelulares envolvidas na regulação da diferenciação, sobrevivência, metabolismo, mobilidade e crescimento celular nos diferentes tipos de câncer. Isto, porque a desregulação dos fatores de crescimento, de seus receptores e das diversas vias de sinalização são responsáveis pela aquisição do fenótipo maligno, da capacidade de invasão e metástase dos tumores malignos (LESKO e MAJKA, 2008; COHEN et al, 2011; ALYASIRI et al, 2012; SNIETURA et al, 2012; LAUXEN et al, 2013). Estes estudos são fundamentais para compreender a patogênese do câncer, identificação de marcadores biológicos de progressão tumoral e para o desenvolvimento de terapias alvo específicas que atuem na regulação dessas vias.

Nos últimos anos, uma atenção especial tem sido dada aos mecanismos moleculares envolvidos no crescimento e invasão dos tumores dependentes da via de sinalização do fator de crescimento de hepatócito (HGF) e seu receptor

c-MET, porém poucos estudos foram encontrados em NGS (TSUKINOKI et al, 2003; HARA et al, 2006; HARA et al, 2008; ACH et al, 2013).

O HGF, também conhecido como fator de dispersão, foi identificado inicialmente em 1984 como um fator hepatotrófico capaz de estimular a síntese de DNA e a proliferação de cultura primária de hepatócitos (NAKAMURA et al, 1984). O HGF é uma molécula heterodimérica composta por uma cadeia α de 99kDa e uma cadeia β de 34kDa (MATSUMOTO et al, 2008). Ele é produzido por células mesenquimais, como fibroblastos, e é secretado numa forma inativa chamada de pro-HGF. Em condições de doença, o pro-HGF pode ser convertido, por enzimas específicas como a u-PA, em HGF maduro, que vai ser entregue aos sítios lesados pela via parácrina e endócrina (MIZUNO e NAKAMURA, 2013), atuando predominantemente sob células epiteliais e endoteliais que expressam o seu receptor tirosina-quinase, c-MET (BIRCHMEIER et al, 2003) (Figura 1).

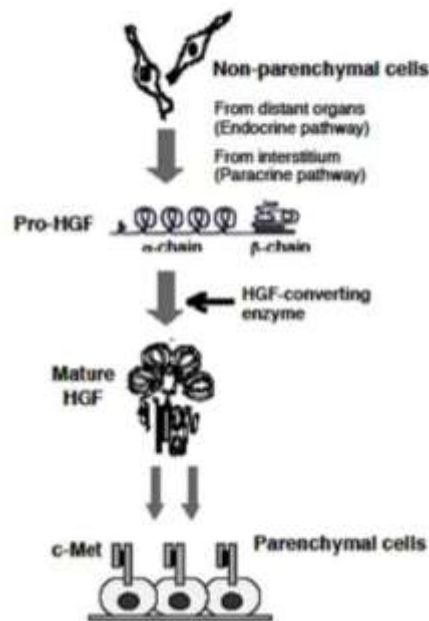


Figura 1. Processo de produção do HGF. Fonte: MIZUNO e NAKAMURA, 2013.

Nos anos 80, o MET, um oncogene localizado no sétimo cromossomo (7q21-q31) em humanos, foi identificado em uma linhagem de células de sarcoma osteogênico, e o isolamento da sequência completa deste proto-oncogene revelou que ele seria responsável por codificar um receptor tirosina quinase conhecido como c-MET (COOPER, 1992, DEAN et al, 1985, PESCHARD et al, 2007). Apenas em 1991, Bottaro et al, identificaram que o c-MET poderia representar um receptor para o HGF. Este receptor é heterodímero de 190 KDa e é formado por duas unidades dissulfídicas ligadas: uma cadeia alfa extracelular de 50KDa e uma cadeia beta transmembrana de 140 KDa, mostrando atividade tirosina quinase (COOPER, 1992). Esta via apresenta papel essencial em processos fisiológicos, sendo responsável por codificar proteínas envolvidas na sobrevivência, crescimento e migração em

diferentes células e tecidos (SCHIMIDT et al, 1995; UEHARA et al, 1995; BLADT et al, 1995).

Há uma diversidade notável de respostas celulares que sucedem a ativação do c-MET (Tabela 4). Isto se deve às vias de sinalização distintas que podem ser ativadas e a sua cooperação com outros sistemas de sinalização (GEHARDI et al, 2012). Atualmente, sabe-se que o HGF secretado pelas células mesenquimais possui um papel importante no crescimento invasivo de tumores (TRUSOLINO e COMOGLIO, 2002; MIZUNO e NAKAMURA, 2013). Isto, porque o HGF pode integrar as respostas biológicas aparentemente independentes que constituem o programa de crescimento invasivo, tais como dissociação de células, TEM, invasão da MEC, motilidade e sobrevivência, ativando um conjunto específico de vias de sinalização (DE HERDT e BAATENBURG DE JONG, 2008).

A ligação HGF/c-MET causa uma multimerização, fosforilação e ativação catalítica que recruta proteínas adaptadoras como a GAB-1, SHC e c-Cbl. A formação desses complexos estimula vias de sinalização diferentes, tais como: RAS/MAPK, PI3K/Akt, FAK (quinase de adesão focal), STAT 3/5, RAC/RHO, PLC-g (fosfolipase Cg), c-src, SHP2 e CRKL, que são essenciais para a regulação do crescimento, sobrevivência, motilidade, invasão e modificações no citoesqueleto das células tumorais (FURGE et al, 2000) (Figura 2). Diversos estudos realizados tanto em animais quanto em humanos têm mostrado que além da mutação do MET, a super-produção de HGF leva a desfechos oncogênicos através da ativação de vias moleculares ligadas ao c-MET, como descritas na tabela 4.

Embora outros receptores tirosina-quinases possam sinalizar utilizando essas mesmas vias (RAS/MAPK, PI3K/Akt, FAK, STAT 3/5, RAC/RHO, PLC-g, c-src, SHP2 e CRKL) a sinalização c-MET dependente é distinta das demais devido: (1) à presença de um único sítio de ancoragem multi-substrato na região C-terminal do receptor; e (2) à sinalização através de uma proteína adaptadora única para c-MET, chamado Gab-1, que tem sido demonstrada como a principal mediadora biológica da sinalização MET-dependente (PONZETTO et al, 1994; WEIDNER et al, 1996; SACHS et al, 2000). A sinalização dependente do tempo e a regulação espacial do complexo c-MET é diferente de outros receptores tirosina-quinases, sendo elementos essenciais para distinguir a sinalização c-MET e sua função biológica em relação a outros receptores. Uma faceta adicional única da sinalização da via do c-MET é a interação com os complexos de adesão FAK e não quinases, tais como as integrinas B4, CD44, e semaforinas, o que torna ainda mais complexa a regulação da função da célula por este receptor.

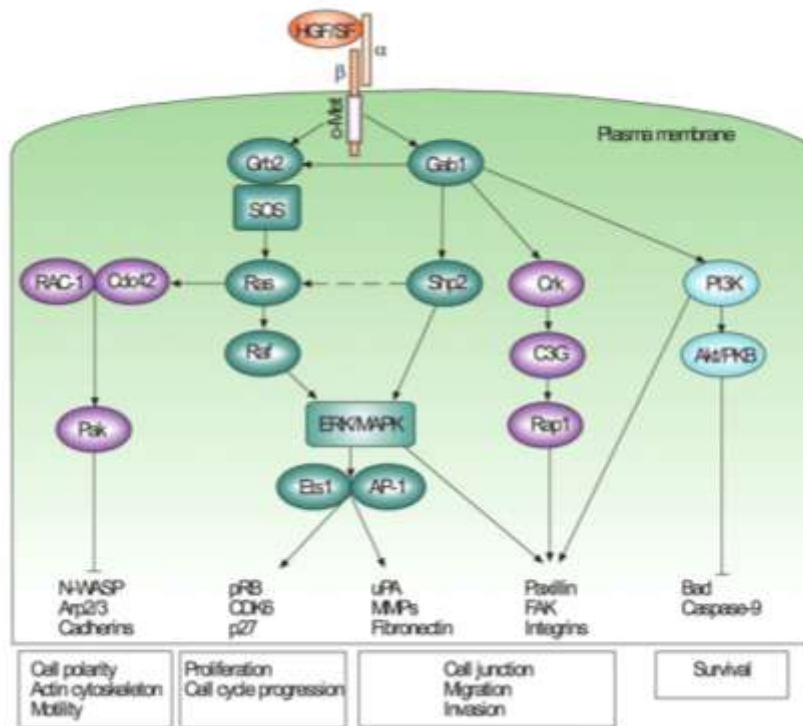


Figura 2. Via de sinalização HGF/c-MET. Fonte: PIRKER e POPPER, 2007.

Tabela 4. Efeitos biológicos do HGF nas células intra-tumorais. Adaptado de MIZUNO e NAKAMURA, 2013.

Células alvo	Efeito	Mecanismo envolvido	Referência
Células tumorais	Crescimento	Ativação de β -catenina, Src, RAS	Giordano et al, 2000; Nakaigawa et al, 2000 Lin et al, 2012
	Dissociação	Ativação de β -catenina e caderina endocitose	Miura et al, 2001 Kimura et al, 2006
	Migração	Ativação do cdc42-rac-PAK	Royal et al, 2000;
	Invasão da MEC	Indução de MMP	Parr et al, 2001
	Suspensão da apoptose	Ativação da PI3K-AKT Via integrina-CD151	Li et al, 1998; Jiang et al, 2001 Zeng et al, 2002; Franco et al, 2010
	Metástase	Aumento de CXCR4 Aumenta resposta para SDF1	Huang et al, 2012; Tu et al, 2009
<i>Células vasculares</i>			
Endotélio	Mitogeneses	Ativação da ERK1/2	Bussolino et al, 1992; Kuba et al 2000
	Adesão das cels tumorais	Envolvimento da Integrina- β 4	Royal et al, 2000; Parr et al, 2001
	Permeabilidade	Regulação da ocludina	Jiang et al, 1999
	Migração	Ativação da PI3K-AKT	Nakamura, Mizuno 2010
Pericitos			
<i>Células imunes</i>			
Células dendriticas	Efeito tolerogenico	Balanço de TH1 << TH2	Rutella et al, 2006
	Linfócitos T	Anti-proliferação	Redução de INF- γ

A expressão aumentada de HGF/c-Met tem sido observada em uma gama de neoplasias, como a de tireóide (RUGGERI et al, 2010; RUGGERI et al, 2012; KOO et al, 2014), colorretal (MOORE et al, 2009; MATSUI et al, 2010; SHOJAEI et al, 2012; MATSUMURA et al, 2013; SAMAMÉ PÉREZ-VARGAS et al, 2013), estômago (AMEMIYA et al., 2010; GRAZIANO et al., 2011; TOIYAMA et al., 2012; AMEMIYA et al., 2013) próstata, mama (KANG et al, 2003; LOCATELLI et al, 2012; LINDEMANN et al, 2007), pulmão (NAVAB et al, 2009; TRETIAKOVA et al, 2011; SCAGLIOTTI et al, 2013; OZASA et al, 2014) e de cabeça e pescoço (MARSHALL e KORNBERG, 1998; CHEN et al, 2004; BELLO et al, 2010; BRUSEVOLD et al, 2010; KIM et al, 2010; LIM et al, 2012). A elevação da imunomarcção de HGF/c-MET tem sido associada com pior prognóstico de neoplasias, radioresistência, diminuição de sobrevida, resistência a apoptose e aumento de metástases (LESKO e MAJKA, 2008). Tendo em vista que a ligação HGF/c-MET desempenha papel importante na formação, progressão, e disseminação de vários tipos de neoplasias malignas epiteliais estas proteínas tem sido um alvo terapêutico promissor para essas doenças. Além disso, estudos prévios sugerem que HGF/c-MET podem ser biomarcadores para neoplasias epiteliais malignas e ter um papel importante na carcinogênese humana. Entretanto, poucos trabalhos foram encontrados em CEC de cabeça e pescoço (CHEN et al, 2004; VARGAS et al, 2008a; VARGAS et al, 2008b; BELLO et al, 2010; BRUSEVOLD et al, 2010; KIM et al, 2010; LIM et al, 2012) e em neoplasias de glândulas salivares (SUZUKI et al, 2003; KLOSEK et al, 2005; HARA et al, 2006; HARA et al, 2008; DE HERDT et al, 2008; BRUSEVOLD et al, 2010; ACH et al, 2013).

Poucos estudos foram conduzidos avaliando o papel da via de sinalização HGF/c-Met em glândulas salivares normais e NGS. Estudos realizados em glândulas salivares em desenvolvimento demonstraram que o HGF está expresso nas células epiteliais luminais, sendo responsável pela morfogênese dos ductos (AMANO et al, 1994; IKARI et al, 2003). Em glândulas salivares de adultos, a expressão de HGF se mantém nas células luminais, sendo que há ausência de marcação nas células acinares e mioepiteliais (TUSKINOKI et al, 2003). Embora os resultados deste estudo pareçam estar de acordo com os resultados encontrados nos trabalhos prévios com glândulas salivares em desenvolvimento, é importante ressaltar que a amostra deste trabalho foi composta por glândulas salivares adjacentes a NGS.

Alguns trabalhos foram realizados em cultura celular de NGS com o objetivo de avaliar o papel da via HGF/c-Met no desenvolvimento destes tumores. A expressão do HGF e seu receptor c-Met foram avaliadas em cultura de carcinoma adenoide cístico através de PCR por Suzuki et al. (2003). Apenas o c-Met foi expresso pelas células estudadas e a estimulação com HGF foi capaz de induzir a invasividade destas células. Hara e colaboradores conduziram dois estudos (2006; 2008) em cultura de carcinomas de glândulas salivares, avaliando a expressão de c-Met relacionada à hipóxia e posteriormente se a expressão de c-Met estava relacionada com diferentes formas fosforiladas da proteína Akt. Ambos os estudos utilizaram western blot como metodologia para avaliar a expressão protéica. Os autores concluíram que a hipóxia é capaz de ativar a via do HGF/c-Met e parece estar envolvida na invasividade dos tumores estudados. Ainda como conclusões, propuseram que este potencial de invasividade estaria relacionado com a ativação de diferentes

isoformas da proteína Akt. É importante ressaltar que em ambos os trabalhos a expressão de HGF não foi avaliada e não foi utilizado um anticorpo específico para a forma fosforilada do c-Met, prejudicando assim a interpretação dos resultados.

Em relação aos trabalhos utilizando imunistoquímica, Suzuki et al. (2003) estudaram a expressão de HGF e c-Met em 15 casos de carcinomas adenoide cístico. Como resultado, mostraram que todos os casos apresentaram expressão luminal para HGF e 10 casos apresentaram expressão de c-Met nas células mioepiteliais. Tuskinoki et al. (2003) avaliaram apenas a expressão de HGF em NGS benignas (n=61) e malignas (n=60) através de imunistoquímica e hibridização *in situ*. A expressão de HGF foi maior em tumores benignos quando comparada aos tumores malignos e não teve correlação com os desfechos clínicos.

Furuse et al. (2010) avaliaram a expressão imunistoquímica de diferentes fatores de crescimento e seus receptores, dentre eles o HGF e c-Met, em uma amostra de 10 carcinomas ex-adenoma pleomórfico e 4 adenomas pleomórficos. O HGF apresentou um padrão de expressão semelhante nas células epiteliais malignas e nas células luminais dos tumores benignos, enquanto que o c-Met teve maior expressão nas células epiteliais malignas. Ach et al. (2013) avaliaram a imunomarcagem de c-Met em 226 pacientes com carcinomas de glândulas salivares, além de realizar hibridização *in situ* para avaliar alterações no MET, EGFR e PTEN. Os resultados imunistoquímicos não mostraram nenhuma associação da expressão de c-Met com os parâmetros clinicopatológicos estudados, entretanto ganhos e

perdas genômicas na atividade do Met tiveram correlação com o crescimento agressivo dos tumores, metástase regional e pior sobrevida dos pacientes.

Todos os trabalhos aqui apresentados que avaliaram o c-Met através de imunistoquímica não utilizaram o anticorpo que detecta o receptor na sua forma fosforilada. Além disso, apenas um dos trabalhos comparou amostras representativas de tumores benignos com malignos, entretanto este estudo apenas avaliou a expressão de HGF (TUSKINOKI et al, 2013). Outro ponto importante é que faltam estudos que avaliem a expressão imunistoquímica desta via e que correlacionem os resultados com parâmetros clinicopatológicos, especialmente relacionados ao prognóstico das lesões.

Embora em NGS o papel desta via ainda não esteja completamente elucidado, em outras neoplasias, como de carcinomas de pulmão e tireóide, sua significância e relação com diferentes desfechos oncogênicos está amplamente esclarecida, fazendo com que houvesse um crescimento no estudo de novas drogas que possuem esta via como alvo. Estas drogas podem atuar exclusivamente no HGF ou no seu receptor c-Met, e têm demonstrado resultados promissores em ensaios clínicos de fase III em tumores de pulmão e tireóide, e em ensaios fase II de tumores de cabeça e pescoço (SEIWERT et al, 2013) (www.vai.org/metclinicaltrials). Tanto estudos *in vitro* quanto ensaios clínicos têm demonstrado que cânceres com amplificação do gene MET são mais sensíveis a inibidores de c-Met, entretanto novas evidências sugerem que certas drogas possuem ação citotóxica nas células tumorais, tanto dependentes quanto não dependentes da via c-Met (KATAYAMA et al, 2013).

2.3 AKT

A via do HGF/c-MET ativa, entre outras, a via do PI3K/Akt . A proteína Akt é uma serina/treonina quinase de 59 kDa e é também conhecida como PKB (proteína quinase B), produto do oncogene *v-akt* (NICHOLSON e ANDERSON, 2002; FRESNO VARA et al, 2004). As diferentes isoformas da proteína Akt (Akt1/2/3) compartilham mais de 80% da identidade sequencial dos aminoácidos. As proteínas possuem um domínio PH (do ingles *pleckstrin homology*) com cerca de 100 aminoácidos na região N-terminal, responsável pela ancoragem na membrana, seguido por um domínio catalítico, e uma região regulatória C-terminal (Figura 3) (NICHOLSON e ANDERSON, 2002).

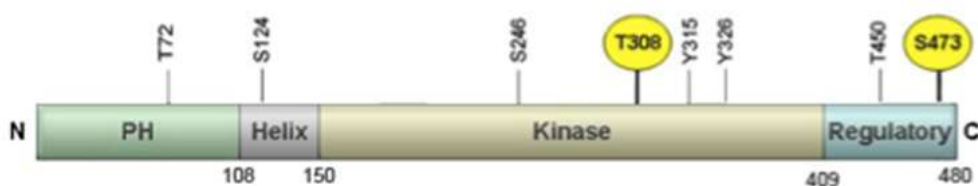


Figura 3 - Estrutura da variante 1 da proteína Akt. Importantes resíduos contidos dentro dos domínios catalítico (Thr308) e regulatório (Sr473). Fonte: MARQUES 2007.

Sob ativação, o receptor de fator de crescimento ativa a subunidade catalítica do PI3K (p110) via recrutamento da subunidade reguladora correspondente (p85) ou via ativação do Ras, o qual ativa diretamente p110. O p110, por sua vez, fosforila o fosfoinosítídeo (PI) na posição D3 do anel inositol, gerando PIP3. A união do PIP3 ao domínio PH da proteína Akt representa um

passo essencial e limitante na sua ativação, pois esta união promoverá a translocação do Akt para a membrana plasmática, onde será fosforilada pelas proteínas PDK1, no resíduo Thr 308, e pela PDK2, no resíduo Sr 473 (Figura 3). A fosforilacão destes sítios é fundamental para completa ativação da proteína Akt (Hay, 2005).

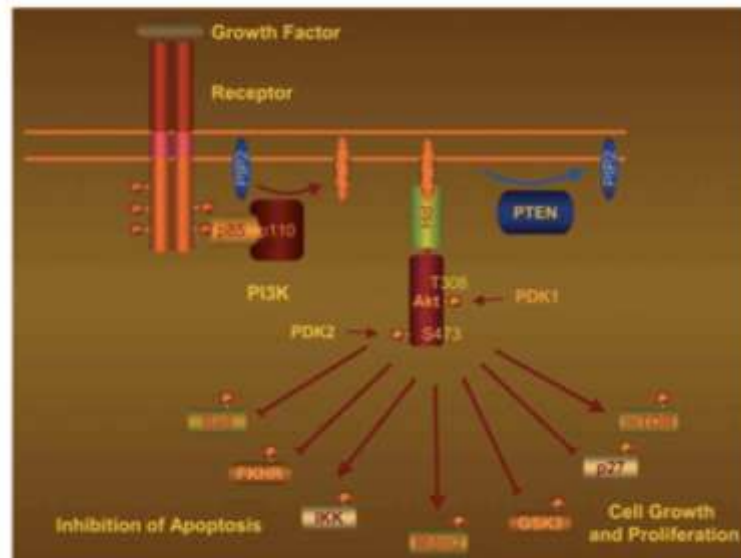


Figura 4 – Mecanismo de ativação e principais alvos envolvidos na via de sinalização da proteína Akt responsáveis pela inibição da apoptose e proliferação celular. Fonte: MARQUES 2007.

Uma vez ativada, a proteína Akt pode atuar, por exemplo, sobre alguns substratos principais, promovendo: (1) ativação da proteína IKK α , que inibe a I κ B, provocando a liberação de NF κ B (DATTA, BRUNET, GREENBERG, 1999; JOYCE et al, 1999); (2) ativação da proteína mTOR (FINGAR et al, 2004); (3) sobrevivência celular, através da inibição (fosforilação) das proteínas Caspase-9 e Bad, que apresentam atividade pró-apoptótica (DATTA, BRUNET, GREENBERG, 1999; JOYCE et al, 1999); (4) inibição da quinase de GSK3, responsável, entre outras funções, pela estabilização da β -catenina no

citoplasma (LIANG e SLINGERLAND, 2003); (5) inibição de fatores de transcrição da família forkhead, levando à diminuição de p27, por exemplo (MEDEMA et al, 2000) e (6) estimulando a produção de metaloproteínas (THANT et al, 2000).

A regulação inapropriada da via PI3K/Akt tem sido associada à tumorigênese em diversas neoplasias (ZHANG et al, 2007; CHANG et al, 2013). Esta associação é resultado da grande variedade de funções exercidas pela Akt, através da interação com diferentes substratos, como já citado anteriormente. A superexpressão da proteína Akt está relacionada com a hipersensibilidade a níveis normais de fatores de crescimento, insensibilidade a sinais responsáveis pela parada do crescimento, inibição da morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase (TESTA e BELLACOSA, 2001; MURUGAN et al, 2013).

O papel da ativação da via do Akt em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço está bem descrito na literatura. Sabe-se que a ativação da proteína Akt é um evento precoce no processo de carcinogênese (MOLINOLO et al, 2007) e a sua ativação persistente contribui para a manutenção do fenótipo alterado das células (AMORNPHEMOLTHAN et al, 2004). Em NGS, pesquisas vêm sendo realizadas para elucidar o papel desta via no processo de tumorigênese, além de buscar correlacionar sua ativação com diferentes desfechos clínicos.

Diversos estudos foram realizados focando o papel desta via especificamente em carcinomas adenoide císticos. Trabalhos em cultura celular demonstraram uma superexpressão da proteína Akt neste tumor (de LIMA et al, 2009) e que a sua ativação está relacionada com a capacidade de

invasão (HARA et al, 2008) e evasão dos fenômenos de apoptose (SUN et al, 2010). Além disso, trabalhos que utilizaram imunistoquímica foram capazes de identificar que a maior expressão da forma fosforilada da Akt está relacionada com um maior risco de recidiva (VOLKER et al, 2009).

Marques et al. (2008) encontraram uma superexpressão de Akt fosforilada em adenomas pleomórficos e mioepiteliomas, enquanto que Suzuki et al. (2012) encontraram que 51% dos casos estudados de carcinomas de glândulas salivares (24 / 47) apresentavam expressão de Akt fosforilada. Nenhuma análise de correlação com parâmetros clínicos foi realizada em ambos os estudos. Já o estudo de Ettl et al. (2012) realizou esta correlação avaliando 272 pacientes com NGS. Os resultados demonstraram que a marcação citoplasmática da Akt fosforilada está relacionada com maior grau de malignidade e pior sobrevida, enquanto que a marcação nuclear está relacionada com ausência de metástase regional e, conseqüentemente, melhor prognóstico.

Os trabalhos realizados com a via de sinalização da Akt em NGS, apesar de avaliarem em sua grande maioria a proteína na sua forma fosforilada, o que já representa uma metodologia mais criteriosa, falham na comparação da expressão de Akt em neoplasias benignas e malignas, principalmente na sua correlação com parâmetros clínicos.

2.4 Ki-67

Independente de sua causa primária, as neoplasias se caracterizam por apresentar distúrbios no controle da proliferação celular, o que leva a instauração de massas tumorais (RABENHORST et al, 1994). Métodos de

detecção e quantificação de células em proliferação constituem parâmetros importantes em neoplasias, pois apresentam relação com a ocorrência de metástases, recorrência além de servir como importante fator prognóstico (BRENNER et al, 2009).

Entre os métodos capazes de detectar células em proliferação, a técnica imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal Ki-67 tem sido amplamente aceita e utilizada. Isto, porque a proteína Ki-67 é um conhecido marcador biológico de proliferação celular. Seu nome é uma derivação da cidade de origem (Kiel, Alemanha) e do número da placa onde seu clone foi cultivado (67^a placa). A Ki-67 foi descoberta por Gerdes et al., em 1983, no núcleo de células de linfoma de Hodgkin, da linhagem L468. A proteína possui cerca de 395 KDa, e é produzida por um gene localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q25). O anticorpo anti a proteína Ki-67 reage com um antígeno nuclear que é expresso durante as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas não durante G0 (GERDES et al, 1983). O Ki-67 não é expresso em células quiescentes e durante processos de reparo de DNA, constituindo assim um antígeno estritamente relacionado ao ciclo celular (SCHLUTER et al, 1993).

O Ki-67 esta localizado predominantemente no córtex nucleolar e nos componentes fibrilares densos do nucléolo durante a interfase, ao passo que durante a mitose torna-se associada com a periferia dos cromossomos condensados (VERHEIJEN et al, 1989b; ISOLA et al, 1990). Tem sido sugerido que a proteína Ki-67 é associada com a matriz nuclear (VERHEIJEN et al, 1989a), com pré-ribossomos (ISOLA et al, 1990) ou com o DNA das células durante a interfase, assim como com o cromossomo de células mitóticas (VERHEIJEN et al, 1989).

Apesar da capacidade do antígeno Ki-67 identificar células nas fases ativas do ciclo celular estar completamente aceita e de ele ser amplamente utilizado para avaliar a capacidade proliferativa de neoplasias, sua exata função celular permanece incerta (STARBORG et al, 1996). Três possíveis papéis durante a mitose têm sido sugeridos: envolvimento na condensação e descondensação de cromossomos; proteção e estabilização de cromossomos; ou envolvimento no mecanismo de distribuição simétrica de proteínas nucleolares entre as células-filhas (STARBORG et al, 1996).

Diversos estudos relacionam a expressão de Ki-67 com o comportamento clínico das neoplasias, prognóstico e com a sobrevida dos pacientes. Nas neoplasias de cabeça e pescoço, altas expressões de Ki-67 estão relacionadas a prognósticos ruins e baixas taxas de sobrevida (SILVA et al, 2004; RODRIGUEZ-TOJO et al, 2005; VARGAS et al, 2008a, LARSEN et al, 2012; TADBIR et al, 2012; VELICKOVIĆ et al, 2013)

Diversos trabalhos foram conduzidos utilizando a marcação de Ki-67 em glândulas salivares normais e NGS. No tecido normal foi visto que, apesar da baixa expressão de Ki-67, todos os tipos celulares presentes nos ductos salivares apresentam certo potencial proliferativo (IHRLER et al, 2002). Em NGS, especialmente em tumores malignos, o Ki-67 aparece como o marcador prognóstico utilizado mais frequentemente, sendo usualmente expresso como o percentual de células positivas (proliferativas). Os trabalhos conduzidos nesta área buscam encontrar um ponto de corte que determine a divisão entre um comportamento menos agressivo e um comportamento mais agressivo.

Nordgard et al. (1997), em um estudo com 44 carcinomas adenoide císticos, encontraram que Ki-67 maior que 4% representava o fator prognóstico

mais forte sugerindo então este ponto de corte. Seguindo nesta linha e utilizando 4% como ponto de corte, Lin et al. (2012), encontraram que a expressão de Ki-67 em carcinomas de glândulas salivares teve correlação com o tamanho do tumor, estadiamento clínico e sobrevida. Tang et al. (2011) encontraram que, mesmo em uma análise multivariada, o Ki-67 representou um fator prognóstico independente para sobrevida em pacientes com carcinoma adenoide cístico. Outra corrente utiliza valores de corte de 5% e 10% baseado no estudo de Skalova e Leivo (1996) realizado em carcinomas mucoepidermoide e de células acinares. Neste estudo, foi visto que tumores com Ki-67 abaixo de 5% não apresentaram recorrência, enquanto que casos com índice acima de 10% estavam associados a piores desfechos. Xin e Paulino (2002) encontraram, em seu estudo com 18 carcinomas de glândula salivar, que todos os casos metastáticos apresentaram Ki-67 maior que 10%, concluindo que esse marcador apresentou uma sensibilidade de 100% em predizer um pior prognóstico.

Quando comparados os tumores benignos com malignos, um maior percentual de células positivas é usualmente expresso em tumores malígnos (ex. CME e CAC), quando comparados ao AP (TADBIR et al, 2012; ASHKAVANDI et al, 2013).

Alguns trabalhos da literatura indicam que o CAC (padrão sólido) apresenta expressão aumentada de Ki-67, quando comparado aos demais subtipos histológicos, sugerindo que a expressão deste marcador é sensível a gradação histológica convencional (NORBERG-SPAACK et al, 2000; SEETHALA et al, 2007; MALHOTRA et al, 2009). Vargas et al. (2008a) verificaram a expressão de Ki-67 em diferentes neoplasias de glândulas

salivares: CAC, carcinoma ex-adenoma pleomorfo, carcinoma mucoepidermóide, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, carcinoma de células acinares e adenoma pleomórfico. As amostras de CAC apresentaram a maior expressão da proteína, confirmando os resultados dos estudos anteriores.

OBJETIVOS

ARTIGO 1

Gerais

Avaliar o perfil demográfico, os aspectos clinicopatológicos e prognóstico de neoplasias de glândulas salivares diagnosticados em um centro de atenção à saúde de nível terciário.

Específicos

Comparar os dados observados na população Brasileira estudada com os resultados de outros trabalhos realizados em diferentes regiões do mundo.

ARTIGO 2

Gerais

Avaliar a via de sinalização HGF/c-MET em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares e correlacionar com o perfil proliferativo e comportamento clínico das lesões.

Específicos

Avaliar a correlação da imunomarcagem das proteínas celulares envolvidas na via de sinalização HGF/c-MET (HGF, c-MET fosforilado, AKT fosforilada) entre as neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

Verificar se há correlação entre a imunomarcagem das proteínas celulares envolvidas na via de sinalização HGF/c-MET (HGF, c-MET fosforilado, AKT fosforilada) com a graduação histológica das lesões.

Verificar se há correlação entre a imunomarcagem das proteínas celulares envolvidas na via de sinalização HGF/c-MET (HGF, c-MET fosforilado, AKT fosforilada) com o comportamento clínico das lesões.

ARTIGO CIENTIFICO 1*

Clinicopathological and prognostic analysis of salivary gland neoplasm in a single tertiary health center over a 15-year period

Artur Cunha Vasconcelos, Felipe Nör, Luise Meurer, Gabriela Salvadori, Lelia Batista de Souza, Pablo Agustin Vargas, Manoela Domingues Martins

Abstract

Salivary gland tumors (SGT) are rare lesions that generate considerable interest because of their histopathological diversity and clinical behavior. The aim of this study was to investigate demographic, clinicopathological aspects and prognosis of SGTs of the head and neck region diagnosed at a tertiary health center and compare with other epidemiological findings in different geographic locations. Cases with histopathological diagnosis of SGTs from a single center in the period between 1995 to 2010 were reviewed. Data such as gender, age, ethnic group, anatomic location of the lesion, histological type and clinical behavior of the tumor were assessed. Descriptive statistical analysis of the data was performed using the frequencies of categorical variables. Of 2168 cases of tumors in the head and neck, 243 (11.20%) cases were diagnosed in salivary glands. Of these, 109 met the inclusion criteria, being 85 (78%) cases benign and 24 (22%) malignant. The mean age of patients was 46.47 years of which 56 cases (51.4%) affected women and 53 (48.3%) in men. The major salivary glands were more affected (75.2%) than smaller ones. The most frequent benign and malignant SGT were pleomorphic adenoma (81.2%) and adenoid cystic carcinoma (58.3%), respectively. Among the malignant tumors,

adenoid cystic carcinoma showed worse clinical behavior with 4 (3.66%) cases exhibiting recurrence. We conclude that the major salivary glands are most affected by salivary gland tumors and pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma are among the most frequent benign and malignant lesions.

* Este trabalho será submetido ao periódico Brazilian Oral Research (Qualis Capes 2013- B1, ISSN 1079-2104).

Introduction

Salivary glands tumors (SGTs) are uncommon entities that still represent a challenge in their diagnosis, mainly due to its complex histopathological features (1). These tumors are also interesting due to variation in their clinical aspects, and clinical behavior (2-4).

Epidemiologically, SGTs represents around 3-6% of all head and neck tumors with annual incidence rates in the world varying between 0.05 to 2 new cases per 100,000 people (5). Several epidemiological data have shown different frequency and morphologic incidence of SGT in distinct populations, showing a geographic and ethnic groups variation, making it difficult to establish a global estimative (1, 6-16). Although these studies have provided valuable knowledge, some of the data become contradictory. Local record is a useful strategy to analyze the distribution and particular features of SGT in a specific population, leading to an appropriate therapy approach. This research aims to describe demographic, clinicopathological aspects and prognosis of SGTs of the head and neck region diagnosed at a tertiary health center and compare with other epidemiological findings in different geographic locations.

Material and Methods

A retrospective analysis was carried out using archival data of Pathology Laboratory of tertiary health center situated in Southern Brazil (Porto Alegre Clinical Hospital). The present study was approved by Institutional Ethical Committee (process n.130152/12). During 15-years period (1995 to 2010), 2168 cases of head and neck tumors were identified. From these, 243 cases were SGTs, but only 109 cases had all data's completed from clinic records like age,

gender, location, clinics aspects, treatment, survival and years of evolution. Hematoxylin-eosin stained slides of all cases were revised by three experienced pathologists and separate according to WHO Histologic Typing of Salivary Gland Tumors (17). Continuous variables were expressed as mean (standard deviation) and categorical variables as percentage of number of cases, in addition to we included in side of analysis all case with over 70% of the completed information with legibly letters and that original slides stained by H/E or block for realization of new blades to be available.

Results

Of all 109 SGTs diagnosed, 81 (74.3%) cases were located in major salivary gland while 28 (25.7%) cases were found in minor salivary glands. The most common location of major SGT was the parotid gland (66.9%) followed by submandibular (7.3%). With respect to minor SGTs, the palatine gland was the most frequent location (14.6%). The sublingual gland did not present any case of tumor (Figure 1 and Table I).

Regarding the gender, 53 (48.3%) patients were males and 56 (51.4%) were females, with a male-to-female ratio of 0.9:1 (benign tumors) and 1:1 (malignant tumors) (Table II). The majority of the tumors occurred in patient between 41 to 60 years old (range 9-81 years). Among all patients, the average age was 46.47 years (47.6 in benign tumors / 42.3 in malignant tumors) and complete data is depicted in Table III.

According to behavior and histological lineage, 85 (78%) cases were classified as benign tumors and 24 (22%) as malignant tumors, with a benign-to-malignant ratio of 3.5:1. This proportion was different regarding to the type of salivary gland analyzed. Of the 81 cases of major SGT, 67 (82.7%) were benign

and 14 (17.3%) were malignant whereas, of 28 cases that affected minor salivary glands, 18 (64.3%) were benign and 10 (35.7%) were malignant (Table I).

Taken all 85 cases of benign tumors, 68 (79.06%) were pleomorphic adenoma and 16 (18.6%) were Warthin's tumor. Considering the total of 24 cases of malignant tumors, 14 (58.3%) were adenoid cystic carcinoma, 5 (20.8%) mucoepidermoid carcinoma and 5 (20.8%) were acinic cell carcinoma (Table I).

Adenoid cystic carcinomas and mucoepidermoid carcinomas were classified according to WHO Histologic Typing of Salivary Gland Tumors (17). Of the 14 cases of adenoid cystic carcinoma, 7 (50.0%) cases were cribriform, 5 (35.7%) tubular and 2 (14.3%) solid. Of the 5 cases of mucoepidermoid carcinoma, 4 were classified as intermediate-grade and 1 as intermediate grade.

With respect to the clinical aspect, all the benign tumors were nodules. In the other hand, the malign tumors were nodule only in 19 cases (11 adenoid cystic carcinoma, 4 mucoepidermoid carcinoma and 4 acinic cell carcinoma) and ulcerated nodule in 5 cases (3 adenoid cystic carcinoma, 1 mucoepidermoid carcinoma and 1 acinic cell carcinoma). The clinical staging of the 24 malignant tumors revealed 11 (45.8%) cases in stage I and II, and 13 (54.2%) cases were found in stage III and IV.

All cases underwent surgical treatment and, in 13 (11.92%) patients of malignant cases, the surgery was complemented by radiation therapy. Of these, 7 (53.8%) cases were adenoid cystic carcinoma, 3 (23.1%) mucoepidermoid carcinoma and 3 (23.1%) acinic cell carcinoma. The follow-up

period varies between 4 to 17 years with 7.4 years of mean. During the follow-up period, 19 (79.2%) of malignant lesions remained alive without recurrence, 1 (4.2%) case remained alive with tumor (adenoid cystic carcinoma) and 1 (4.2%) case died by unspecified reasons. Three (12.6%) patients died by the tumor and all of these cases were in TNM stage III and IV. Of these, 1 (4.2%) case was acinic cell carcinoma and 2 (8.4%) cases adenoid cystic carcinoma. Recurrence was observed in 4 (3.66%) cases of pleomorphic adenoma and in 4 (3.66%) cases of adenoid cystic carcinoma.

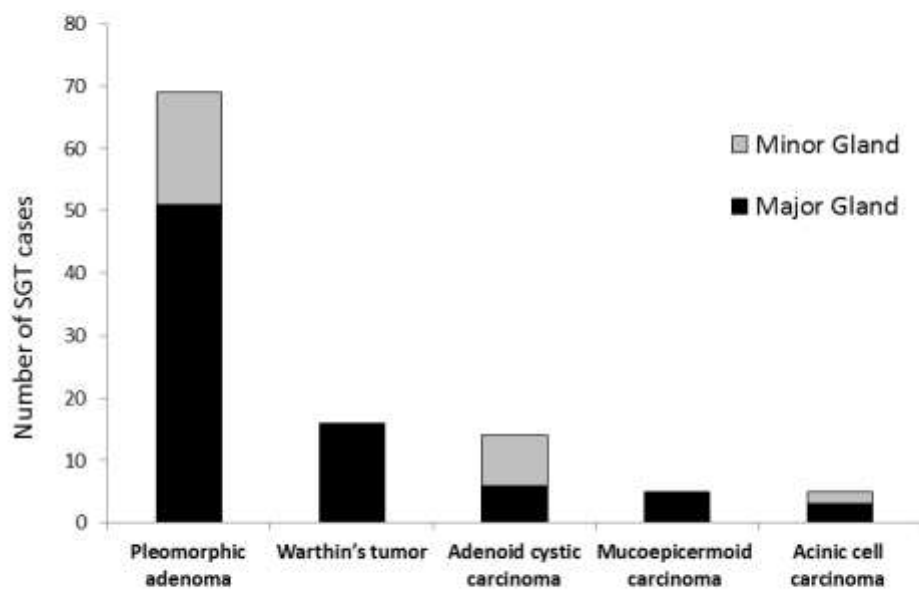


Fig.1. Distribution of the 109 salivary gland tumors according to their occurrence in major or minor salivary glands.

Table I. Distribution of the 109 salivary gland tumors according to the location.

	Parotid		Submandibular		Palate		Other	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Benign tumors								
Pleomorphic adenoma	48	69.6	3	4.3	11	15.9	7	10.1
Warthin's tumor	16	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Subtotal (% in the group of benign tumors)	64	75.3	3	3.5	11	12.9	7	8.2
Malignant tumors								
Adenoid cystic carcinoma	3	21.4	3	21.4	4	28.6	4	28.6
Mucoepidermoid carcinoma	3	60.0	2	40.0	0	0.0	0	0.0
Acinic cell carcinoma	3	60.0	0	0.0	1	20.0	1	20.0
Subtotal (% in the group of malignant tumors)	9	37.5	5	20.8	5	20.8	5	20.8
Total (% according n=109)	73	66.9	8	7.3	16	14.7	12	11.0

Table II. Histologic and gender distribution of 109 salivary gland tumors.

	n = 109		% in the group of benign or malignant tumors	Gender			
				Male		Female	
	n	%		n	%	n	%
Benign tumors							
Pleomorphic adenoma	69	63.3	81.2	31	28.4	38	34.9
Warthin's tumor	16	14.7	18.8	10	9.2	6	5.5
Total	85	78	100	41	37.6	44	40.4
Malignant tumors							
Adenoid cystic carcinoma	14	12.8	58.3	6	5.5	8	7.3
Mucoepidermoid carcinoma	5	4.6	20.8	3	2.7	2	1.8
Acinic cell carcinoma	5	4.6	20.8	3	2.7	2	1.8
Total	24	22	100	12	10.9	12	10.9

Table III. Distribution of 109 benign and malignant salivary gland tumors according to age (years-old).

	0-20		21-40		41-60		>61	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Benign tumors								
Pleomorphic adenoma	5	7.2	24	34.8	28	40.6	12	17.4
Warthin's tumor	0	0.0	0	0.0	9	56.3	7	43.8
Subtotal (<i>% in the group of benign tumors</i>)	5	5.9	24	28.2	37	43.5	19	22.4
Malignant tumors								
Adenoid cystic carcinoma	1	7.1	2	14.3	8	57.1	3	21.4
Mucoepidermoid carcinoma	2	40.0	0	0.0	2	40.0	1	20.0
Acinic cell carcinoma	3	60.0	2	40.0	0	0.0	0	0.0
Subtotal (<i>% in the group of malignant tumors</i>)	6	25.0	4	16.7	10	41.7	4	16.7
Total (<i>% according n=109</i>)	11	10.1	28	25.7	47	43.1	23	21.1

Table IV. Distribution of salivary glands tumors in different countries.

Region	Authors	Number of cases (n)	Benign	Malignant	Major	Minor	PA	CAC	MEC
			(% of all tumors)						
China	Tian et al. 2010	6982	67.9	32.1	71.6	28.4	47	9.7	9.6
China	Li et al. 2008	3461	59.8	40.2	73.6	26.4	51.3	7.3	7.5
USA	Spiro et al. 1986	2807	54.5	45.5	78	22	45.4	10	15.7
Finland and Israel	Bello et al. 2012	1888	85.1	14.9	90	10	50	3.5	3.2
Croatia	Luksic et al. 2011	779	64.2	35.8	72.8	27.2	47.2	11.7	8.2
UK	Jones et al. 2008	741	64.9	35.1	38.6	61.4	44.4	8.4	11.5
Brazil	Vargas et AL.2002	124	79.8	20.2	97.97	2.02	67.7	4.03	10.4
Brazil	de Oliveira et al. 2009	599	78.3	21.7	78.3	21.7	67.8	6.5	4.8
Brazil	Ito et al. 2009	496	67.5	32.5	77.2	22.8	54.2	7.9	13.5
Brazil	Fonseca et al. 2012	493	50.5	49.1	74.8	25.1	85	17.7	31.4
Italy	Ascani et al. 2006	454	89.2	10.3	93.4	6.6	63.2	1.8	3.3
Nigeria	Lawal et al. 2013	413	46.5	53.5	55	45	40.9	22.5	14.8
Mexico	Meija-Velazquez et al. 2012	360	67	23	76.4	23.6	65.6	5	4.7
Israel	Bello et al. 2012	330	66.4	33.7	66.7	33.3	70.5	31.8	28.2
Congo	Kayeme et al. 2002	275	65.5	34.5	61.5	38.5	55.3	16	8
Uganda	Vuhahula 2004	268	32.8	67.2	54.1	45.9	73.8	29.3	20.3
Jordan	Ma'aita et al. 1999	221	68.3	31.7	81	19	62.9	5.4	17.2
Tanzania	Masanja et al. 2003	133	54	46	42,4	57,6	44.4	24.8	9.8
Iran	Ansari et al. 2007	130	68.5	31.5	86.1	13.9	65.4	2.3	11.5
Brazil	Present study	109	78	22	74.3	25.7	63.3	12.8	4.6
Nigeria	Otoh et al. 2005	79	55.7	44.3	58.2	41.8	44.3	8.9	10.1

Discussion

These tumors present different biological behavior and their etiopathogenesis remains unknown (2, 5). Several epidemiologic studies were conducted in different parts of the world and differences in incidence of SGTs and in histological type frequency have been reported (Table IV). The present study reviewed the demographic, clinicopathologic aspects and prognosis of 109 cases of SGTs of the head and neck region diagnosed at one tertiary health center. In general, the current regarding demographic and clinical aspects, major/minor gland distribution, histopathologic findings and tumor behavior are in agreement with numerous reports, including some previously reported in Brazil (1, 8, 10, 12, 15, 16, 18).

According to the literature, the common clinical presentation of SGTs is in form of a well delimited nodular tumor with a normal overlying surface color. The lesions are usually asymptomatic and affects more female in any age with peak of incidence correspond to the period between the fifth and seven decades of life (10, 15, 17, 19-22). The clinical features that allow differentiation between benign and malignant SGTs are the evolutionary course, presence of pain and ulceration. Benign tumors tend to be insidious and slow-growing with an average course of 3-6 years, without adherence to surrounding tissues. Malignant lesions are fast-growing, frequently under one year of evolution, adhered to deep layers, with ulcerate or telangiectasic surface. Presence of pain is the most suggestive characteristic of malignancy (17). In the present series, the majority of clinical characteristics observed were similar to the previous studies. Patients' ages varied from 09 to 81 years old, with an average of 46.47 years old. The clinical aspects of the lesions were nodules and, when ulceration was present, 4.6% of the lesions were malignant. The only difference with some authors in our case series was a similar male-female ratio (0.94:1) observed both in benign and malignant tumors. Although, this aspect

is not so common and this fact is in agreement with Luksic et al. (15) and Tian et al. (16). These results indicate that every painless swelling of a salivary gland should provoke suspicion and does not exclude a malignant nature.

In our study, major salivary glands, especially the parotid (66.9%), were most affected by tumors, followed by palatine glands (14.7%). Similar results were described by the majority of studies involving SGTs (Table IV), including those from Brazil (1, 6, 7). Another fact that could be related to higher predominance of major SGTs is that our study was conducted in tertiary center that receive most patients with parotid lesion. Minor SGT are usually diagnoses in primary and secondary services. Only the malignant major SGT are referred to the Hospital service.

Benign SGTs predominated in major glands, and comprised 78% of all salivary tumors, similar to the rates reported by authors in the Iran (19), Congo (18), UK (23), Jordania (24), Brazil (6, 7) and China (16). In all of these reports from different countries, benign tumors accounted for more than 50% of all salivary tumors, suggesting that benign tumors are predominant SGT worldwide. Our findings are in line with those earlier publications showing predominance of benign tumors versus malignant lesions, with a benign-to-malignant ratio of 3.5:1. Few studies reported more prevalence for malignant SGTs (11) and justify this uncommon findings based in fact that they are a tertiary center and, usually more severe cases of SGTs are indicated to them. According to these authors, less severe cases are diagnosed and treated at primary and secondary health facilities.

Pleomorphic adenoma is a benign neoplasm composed of epithelial and myoepithelial cells arranged in a great variety of morphological patterns, with areas of mesenchymal differentiation. In the present series, this tumor was the commonest SGT, accounting for 63.3% of all tumors and 81.2% of benign lesions. The majority of the cases

(73.9%) were located in major salivary glands. The incidence of pleomorphic adenoma has been reported to range from between 40.9% to 73.8% of all STGs (11, 21) as shown in Table IV. Large series of SGTs showed similar results with pleomorphic adenoma representing 60% to 73% of the parotid gland tumors, 40% to 60% of the submandibular and minor salivary glands tumors (11, 21). All cases of pleomorphic adenoma reported in this study was treated by surgery and recurrence was observed in 4 cases (3.66%).

In the present study, the adenoid cystic carcinoma was the most prevalent malignant SGT with 14 cases, representing 12.8% of all tumors and 58.3% of malignant, followed by mucoepidermoid carcinoma and acinic cell carcinoma. Adenoid cystic carcinoma predominance was previously described in Congo, Tanzania, Croatia and Nigeria. In Iran, Jordan, USA, UK and Italy the frequency of mucoepidermoid carcinoma was higher than adenoid cystic carcinoma. Similar distribution was reported in China, Finland and Mexico (Table IV). These studies suggest a geographic variation in frequencies of malignant SGTs.

Our results revealed that adenoid cystic carcinoma had the worst behavior between all SGTs analyzed. This tumor exhibits a slowly growing pattern with an early expression of nerve and lymph node involvement. Advanced tumor required surgical and radiation therapy (25). In this study, recurrence and death account 28.6% (4 cases) and 14.28% (2 cases) of adenoid cystic carcinoma, respectively. All the patients with these characteristics presented advanced TNM stage (III-IV) and received surgery plus radiation therapy. Previous studies revealed that overwhelming majority of patients with distant metastasis of adenoid cystic carcinoma have T3-T4 tumor size surgery and that radiation therapy offers excellent results for local and regional control (5, 26, 27). Another important aspect is the presence of perineural invasion, a common finding in adenoid cystic carcinoma that appears to contribute for a worse patient outcome (27). The mean follow-up period of our

study was 7.4 years and we observed a high survival. However, previous studies indicate that the 5-year survival rates are usually high, but the cure rate over 20 years is much lower (5, 8, 26, 27).

The present study revealed that in a southern Brazilian population, major salivary glands were most affected by neoplastic processes and pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma were the most frequent benign and malignant lesions, respectively. Analyzing together our results with the literature available regarding SGTs epidemiology, we can infer that some demographic characteristics (e.g. gender and age) and tumor histopathological diagnosis predominance (e.g. adenoid cystic carcinoma or mucoepidermoid carcinoma) differs with geographic variations. Further studies are necessary to determine variables related to SGTs behavior and prognosis.

Acknowledgments

The authors thank Flavia Rejane Giusti for technical support. This study was supported by the Postgraduate Research Group of the Porto Alegre University Hospital (GPPG/FIPE: 12– 0339). Luise Meurer, Lelia Batista de Souza, Pablo Agustin Vargas and Manoela Domingues Martins are research fellows at Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

References

1. de Oliveira FA, Duarte EC, Taveira CT, Maximo AA, de Aquino EC, Alencar Rde C, et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. *Head Neck Pathol.* 2009 Dec;(4):271-5.
2. Mariano FV, da Silva SD, Chulan TC, de Almeida OP, Kowalski LP. Clinicopathological factors are predictors of distant metastasis from major salivary gland carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011 May;(5):504-9.
3. Eveson JW, Cawson RA. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol.* 1985 May;(1):51-8.
4. Terhaard CH, Lubsen H, Van der Tweel I, Hilgers FJ, Eijkenboom WM, Marres HA, et al. Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group. *Head Neck.* 2004 Aug;(8):681-92; discussion 92-3.
5. Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M, Licitra L. Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010 May;(2):134-48.
6. Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jul;(5):533-6.
7. Fonseca FP, Carvalho Mde V, de Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG, et al. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Aug;(2):230-9.
8. Li LJ, Li Y, Wen YM, Liu H, Zhao HW. Clinical analysis of salivary gland tumor cases in West China in past 50 years. *Oral Oncol.* 2008 Feb;(2):187-92.

9. Al-Khateeb TH, Ababneh KT. Salivary tumors in north Jordanians: a descriptive study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 May;(5):e53-9.
10. Bello IO, Salo T, Dayan D, Tervahauta E, Almangoush A, Schnaiderman-Shapiro A, et al. Epithelial salivary gland tumors in two distant geographical locations, Finland (Helsinki and Oulu) and Israel (Tel Aviv): a 10-year retrospective comparative study of 2,218 cases. *Head Neck Pathol*. 2012 Jun;(2):224-31.
11. Lawal AO, Adisa AO, Kolude B, Adeyemi BF, Olajide MA. A review of 413 salivary gland tumours in the head and neck region. *J Clin Exp Dent*. 2013 Dec 1;(5):e218-22.
12. Mejia-Velazquez CP, Duran-Padilla MA, Gomez-Apo E, Quezada-Rivera D, Gaitan-Cepeda LA. Tumors of the salivary gland in Mexicans. A retrospective study of 360 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Mar;(2):e183-9.
13. Spiro RH. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg*. 1986 Jan-Feb;(3):177-84.
14. Bjorndal K, Krogdahl A, Therkildsen MH, Overgaard J, Johansen J, Kristensen CA, et al. Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: outcome and prognostic factors. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). *Oral Oncol*. 2012 Feb;(2):179-85.
15. Luksic I, Virag M, Manojlovic S, Macan D. Salivary gland tumours: 25 years of experience from a single institution in Croatia. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012 Apr;(3):e75-81.
16. Tian Z, Li L, Wang L, Hu Y, Li J. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Mar;(3):235-42.
17. Barnes L EJ, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumors.: Lyon IARC Press 2005.

18. Kayembe MK, Kalengayi MM. Salivary gland tumours in Congo (Zaire). *Odontostomatol Trop*. 2002 Sep;(99):19-22.
19. Ansari MH. Salivary gland tumors in an Iranian population: a retrospective study of 130 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Nov;(11):2187-94.
20. Otoh EC, Johnson NW, Olasoji H, Danfillo IS, Adeleke OA. Salivary gland neoplasms in Maiduguri, north-eastern Nigeria. *Oral Dis*. 2005 Nov;(6):386-91.
21. Vuhahula EA. Salivary gland tumors in Uganda: clinical pathological study. *Afr Health Sci*. 2004 Apr;(1):15-23.
22. Shishegar M, Ashraf MJ, Azarpira N, Khademi B, Hashemi B, Ashrafi A. Salivary gland tumors in maxillofacial region: a retrospective study of 130 cases in a southern Iranian population. *Patholog Res Int*. 2011:934350.
23. Jones AV, Craig GT, Speight PM, Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncol*. 2008 Apr;(4):407-17.
24. Ma'aita JK, Al-Kaisi N, Al-Tamimi S, Wraikat A. Salivary gland tumors in Jordan: a retrospective study of 221 patients. *Croat Med J*. 1999 Dec;(4):539-42.
25. Triantafillidou K, Iordanidis F, Psomaderis K, Kalimeras E. Acinic cell carcinoma of minor salivary glands: a clinical and immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Oct;(10):2489-96.
26. Seethala RR. An update on grading of salivary gland carcinomas. *Head Neck Pathol*. 2009 Mar;(1):69-77.
27. Bhayani MK, Yener M, El-Naggar A, Garden A, Hanna EY, Weber RS, et al. Prognosis and risk factors for early-stage adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Cancer*. 2012 Jun 1;(11):2872-8.

ARTIGO CIENTIFICO 2*

Expression Profile of c-MET/PI3K Signaling in Human Salivary Gland Tumors

Artur Cunha Vasconcelos¹, Vivian Petersen Wagner¹, Luise Meurer², Pablo Agustin Vargas³, Lélia Batista de Souza⁴, Felipe Paiva Fonseca³, Cristiane Helena Squarize⁵, Rogerio Moraes Castilho⁵, Manoela Domingues Martins¹

¹ Department of Oral Pathology, Dental School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

² Department of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

⁴ Oral Pathology Department, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

⁵ Laboratory of Epithelial Biology, Department of Periodontics and Oral Medicine, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, Michigan, USA.

* Este trabalho será submetido ao periódico Oral Oncology (Qualis Capes 2013- A1 ISSN 1368-8375)

Abstract

Salivary gland tumors (SGT) are rare yet interesting neoplasms due to their histopathological diversity and clinical behavior. Understanding the pathobiology as well as the mechanisms involved in the invasive behavior of these lesions is needed to better comprehend the biology of SGT and further delineate new therapeutic strategies. The aim of the present study was to analyze the expression pattern of HGF/c-Met/PI3K signaling pathway in SGT and correlate the findings with the proliferative profile and clinical outcomes of cases. Tissue microarrays (TMAs) of 93 cases of SGT were assembled; the glass slides were submitted to immunohistochemical analysis for HGF, p-Met, p-Akt and Ki-67. Increased expression of HGF was observed in benign tumors ($p = 0.04$), while p-Met ($p = 0.03$), p-Akt ($p = 0.00$) and Ki-67 ($p = 0.00$) were most expressed in malignant tumors. In salivary glands carcinomas there was a higher activation of the HGF pathway observed by the higher expression of its phosphorylated receptor (p-Met) as well as the higher activation of PI3k pathway through Akt (p-Akt) phosphorylation, resulting in a higher proliferative profile. The present study suggest that HGF/c-Met/PI3K signaling pathway appears to be active in SGT carcinogenesis regulating the proliferation especially in malignant tumors.

Keywords: salivary gland, neoplasias, hepatocyte growth factor, c-Met, Akt, KI-67

Introduction

Salivary gland tumors (SGT) represent a heterogeneous and rare group of neoplasms responsible for less than 1% of all human tumors and 3% to 5% of head and neck neoplasms.¹ SGT is composed by benign tumors characterized by slow growth and indolent disease progression, and by malignant tumors (carcinomas) presenting rapid progression and low survival rates.¹⁻³ Salivary gland carcinomas are composed by 24 different malignant subtypes follow the latest World Health Organization (WHO) classification.^{4,5} Patients presenting SGT face significant morbidity and debilitating disfigurement as common sequelae from available therapy. While surgery remains the main treatment option for these tumors, survival rate remain low with a 5-year survival rate for stages II, III and IV around 20-25%.³ The understanding of the pathobiology as the mechanisms involved in invasive behavior of these tumors are needed to better understand the biology of these tumors and further delineate new therapeutic strategies aiming at better quality of life and improve overall survival rate.

The development of cutting edge therapeutic strategies depend on the identification and understanding of the molecular mechanisms involved in tumor growth, progression, and metastasis. Recently, the signaling pathway involving the hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-Met has gained a special attention in part due to its increasing understanding in several physiological functions during embryogenesis, tissue regeneration and in the progression of solid tumors.⁶⁻¹⁰ The binding of HGF to c-Met triggers the recruitment of Grb2-SOS and Gab-1 proteins; which lead to the activation of different signaling pathways like Ras-ERK, PI3K/Akt, PLC- γ , Shp-2 and Crk-2, playing an important role in cell proliferation, morphogenesis and motility.¹¹ Even though this pathway presents an important function in physiological events, recent reports have shown that

overexpression of HGF along mutations of its receptor (c-MET) lead to key malignant hallmarks including reduced cell-cell contact, activation of epithelial mesenchymal transition (EMT), increased tumor angiogenesis and enhanced cellular survival.^{11,12} Recent, clinical trials exploring targeted inhibition of the HGF/c-Met circuitry have demonstrate promising results with the improvement of patient's outcome in different types of solid tumors.^{13,14}

However, only few studies have been conducted to evaluate the role of HGF/c-Met pathway in SGT. Interestingly, seminal studies have show the importance of HGF pathway in the development of normal salivary ducts, which is believed to be the anatomical structure of origin of several malignant SGT.^{8,15} Furthermore, high expression levels of HGF is observed in benign SGT compared to its malignant counterpart, albeit not associated with prognosis.¹⁵ Nonetheless, other studies have observed that increased tumor invasion, enhanced metastatic potential and poor survival rate of malignant SGT correlates with the constitutive activation of the HGF/c-MET pathway.¹⁶⁻¹⁸

Based on these controversial findings we decide to explore the expression pattern of the HGF/c-MET/PI3K signaling pathway at the protein levels using a panel of benign and malignant SGT and further correlate our findings with KI-67 labeling index and clinical outcome.

Methods:

Study population

Ninety three (93) cases of SGT diagnosed between January 1995 to December 2010 were retrieved from archives of the Pathology Service of Clinic Hospital from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Human Research Ethics Committee approval n.

201.848). The series consisted of 69 benign SGT (pleomorphic adenoma) and 24 malignant SGT being 14 adenoid cystic carcinoma (AdCC), 5 mucoepidermoid carcinoma (MEC) and 5 acinic cell carcinoma (AcCC). Clinical data concerning age, gender, clinical aspects, tumor localization, TNM system and follow-up information (clinical outcome and survival time) were retrieved from files. The follow-up period was defined as the time from diagnosis until the last visit to the hospital. Three oral pathologists reviewed the original hematoxylin-eosin stained slides without any knowledge of clinical outcomes following the World Health Organization's 2005 Histological Typing of Salivary Gland Tumors classification. Discrepancies were resolved by simultaneous reexamination of the slides. Periodic acid-Schiff (PAS) and Mucicarmin stain were also performed in all cases of MEC and AcCC needed. This study has been approved by the Human Research Ethics Committee of our institution (protocol number 130152/12).

Tissue Microarray (TMA) construction

Tumor areas were selected and marked on hematoxylin-eosin-stained sections using an objective marker (Nikon Corp, Tokyo, Japan). The slides were then overlaid on the original paraffin block to determine the corresponding area to be used. TMAs were constructed using a manual tissue arrayer (Sakura Co, Japan) and 3 representative cylindrical cores of 2.0 mm diameter were taken from each tissue block and then arranged sequentially into a recipient ready-to-use paraffin block (Sakura Co, Japan) according to Fonseca et al 2014.¹⁹. Two cores of normal parotid gland and one of oral squamous cell carcinoma were inserted in the left upper corner of each recipient block for orientation. A map specifying the exact position of each case was prepared to facilitate the interpretation of the immunohistochemical results.

Immunohistochemistry

For immunohistochemical staining, the samples were sectioned into 3- μ m sections; these were deparaffinized in xylene and hydrated in descending grades of ethanol. Endogenous peroxidase activity was blocked using 5% hydrogen peroxide in 2 baths, each of 15 minutes. Avidin-biotin blocking kit was used to block nonspecific binding (Kit Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). After washing with in PBS buffer (pH 7.4), slides were incubated overnight with primary antibodies; for each antibody, the antigen retrieval used, its origin, clone, dilution and the detection system used are specified in table 1. The sections were then incubated with diaminobenzidine tetra-hydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) and counterstained with Mayer's hematoxylin. Positive control sections were used for each antibody, whereas the negative control was obtained by omitting the specific primary antibody.

HGF, p-Met and p-Akt were analyzed semi-quantitatively by three observers using scores of cytoplasmic staining in tumor cells. Each case was assigned a score, as follows: 0 (none), 1 (1 to 20%), 2 (21– 50%), 3 (51 – 80%) and 4 (81–100%). The median of cores was used to represent the final score and for statistical analysis (FURUSE et al, 2010).

Proliferation index was determined using Ki-67. TMAs were quantitatively evaluated based on nuclear reactivity. Images of the selected fields were captured using a conventional light microscope (CX41RF model, Olympus Latin America, Inc., Miami, Florida, USA) coupled to a camera (QColor 5, Coolest, RTV, Olympus Inc., Miami, Florida, USA) and connected to a computer (Dimension 5150, Dell, Porto Alegre, RS, Brazil). The images were analyzed using the QCapture software program, version 2.81 (Quantitative Imaging Corporation, Inc., Surrey, BC, Canada). The number and percentage of positive cells were assessed in each case and 500 cells were counted at a magnification of 400x in

each core (total of 1500 cells per cases). The results were expressed as the percentage of 1500 positive cells (mean and standard deviation).

Table 1. Antibodies, Origin, clone, antigen retrieval, dilution and detection system used for immunohistochemistry.

Antibody	Origin	Clone	Antigen retrieval	Dilution	Detection system
HGF	R&D System	Polyclonal	Citric acid – microwave	1:10	ABC System
Phospho-Met (Tyr 1003)	Cell Signaling	13D11	Retrieval solution (pH 9) – steamer	1:150	Envision
Phospho-Akt (Thr308)	Abcam	C31E5E	Citric acid – microwave	1:25	ABC System
Ki67	Dako	MIB-1	Retrieval solution (pH 9) –	1:50	Envision

Statistical analysis

All clinical and immunohistochemical data were analyzed with SPSS for Windows, version 18.0. Relationship between immunohistochemical markers and dichotomised clinicopathologic factors were examined using Mann-Whitney test. Spearman's correlation coefficients was used to examine correlation of HGF, p-Met, p-Akt and Ki67 expression. For all tests, statistical significance was defined as probability value less than 0.05.

Agreement among observers for the interpretation of immunohistochemistry specimens was assessed by kappa (κ) statistics. In accordance with the criteria of Landis and Koch (1977)²⁰, the κ -values were divided into several classes to evaluate the degree of agreement: $\kappa < 0.00$ – poor; $0.00 < \kappa < 0.20$ – slight; $0.20 < \kappa < 0.40$ – fair; $0.40 < \kappa < 0.60$ – moderate; $0.60 < \kappa < 0.79$ – substantial; $0.80 < \kappa < 1.00$ almost perfect.

Results

Clinicopathologic characteristics

Considering the clinical features of all cases included, a slight female preponderance was observed (male-to-female ratio of 1:1.16). The mean age was of 43.74 years, ranging from 9 to 77 years. The location more affected was the parotid gland with a frequency of 61.29%, followed by the palate (17.20%), other intra-oral site (12.9%), and the submandibular gland (8.6%). No tumors of the sublingual gland were found. Regarding the histologic graduation according to WHO's Classification⁵, 69 cases were classified as PA, 14 cases were classified as AdCC, 5 cases as MEC, and 5 cases as AcCC. Among AdCC, 5 cases were tubular type, 7 cases were cribriform type and only 2 cases were solid. Among MEC, 04 were classified as low-grade and 01 as moderate grade.

Benign SGT represented by PA accounted 74.19% of the study sample. The male:female ratio was 1:1.3 and the mean age was 44.23 years, ranging from 9 to 77 years. The main location affected was the parotid gland (69.56%), followed by the palate (14.49%). Four cases of pleomorphic adenoma (5.79%), 3 located in the parotid gland and one in the palate, presented recurrence during the follow-up period analysis.

Malignant SGT represented 25.80% of the study sample and was composed by AdCC (58.33%), MEC (20.83%) and AcCC (20.83%). Between malignant SGT the male:female ratio was 1:1 and the mean age was 42.33 years ranging from 9 to 75 years. Intra-oral sites accounted for 41.66% of the cases, followed by the parotid gland (37.5%). Eleven cases (45.83%) were diagnosed in a less advanced clinical stage (I/II) and 13 cases (54.16%) were diagnosed in advanced clinical stages (III/IV). In the present sample of malignant SGT, 11 patients (45.83%) were treated only with surgery while 13 patients (54.16%) received radiotherapy after surgery. Four cases presented recurrence (16.66%)

and among those cases two, diagnosed as AdCC, evolved to death (mean follow up time: 10.5 years). Only one patient, diagnosed with AcCC, died during the follow-up period analysis (follow up time: 7 years).

HGF, p-Met and p-Akt in normal salivary glands

Normal salivary glands presented positive reaction to HGF, p-Met, p-Akt in epithelial luminal cells cytoplasm. Acinus and myoepithelial cells were negative to all proteins (Figure 1A, Figure 2A, Figure 3A).

Higher expression of HGF in benign SGT

Benign SGT presented higher number of HGF positive cases ($p < 0.00$ – Pearson chi-square test) and higher percentage of positive cells (score analysis) than malignant SGT ($p = 0.04$ - Mann-Whitney test) (Figure 1). In PA the immunolabeling was observed mainly in epithelial luminal duct cells (Figure 1A). Myoepithelial modified cells presented diversified patterns of reaction, being strictly negative in mixoid areas. AdCC labeling was mainly observed in epithelial cells while myoepithelial cells presented less expression of HGF. Epidermoid and intermediate cells of MEC carcinoma were positive to HGF. AcCC were negative to this protein (Figure 1A and B). Kappa (κ) statistics for the agreement of HGF labelling among observers was 0.85 ($p < 0.001$).

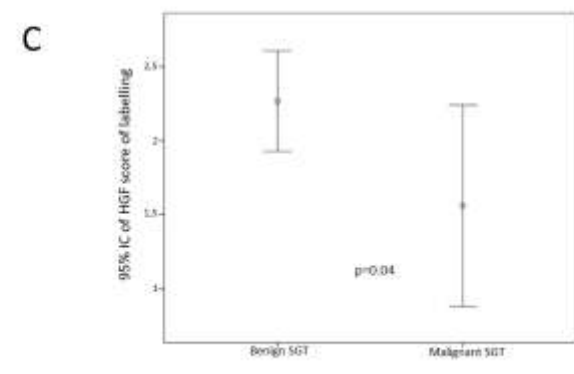
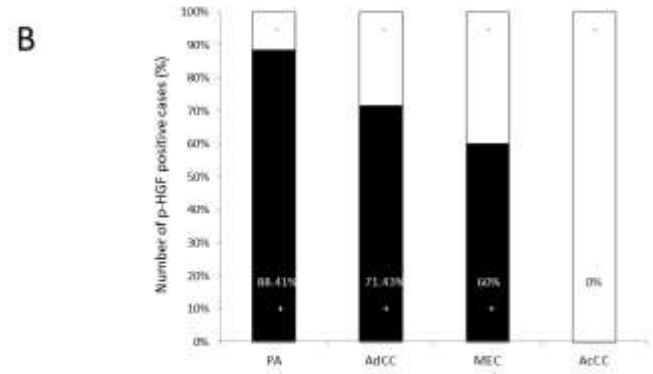
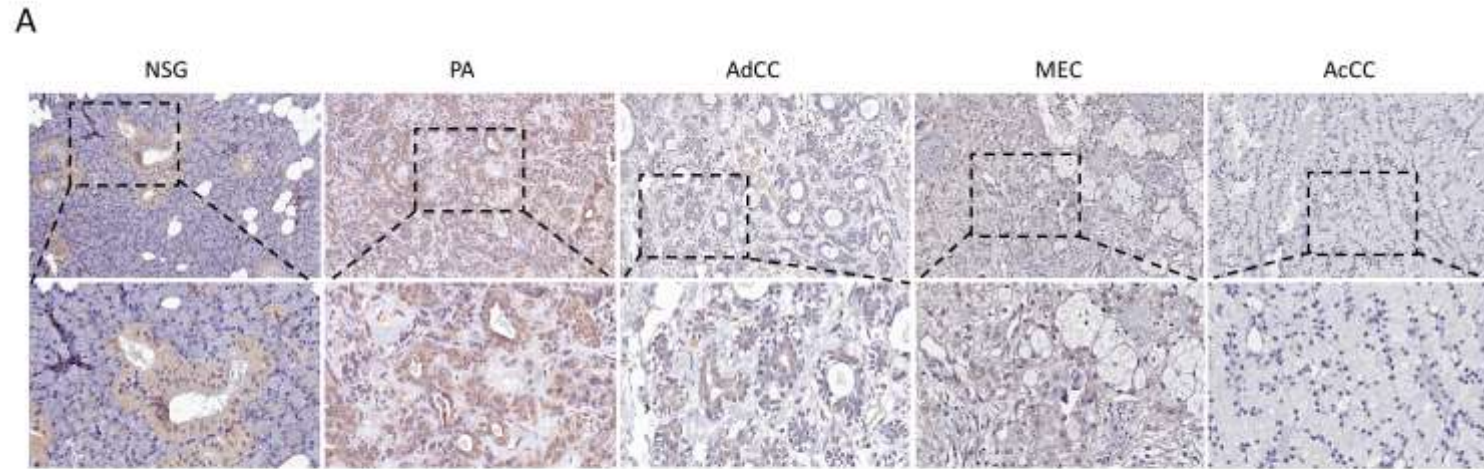


Figure 1. Higher expression of HGF in benign SGT. (A) Representative examples of HGF expression in normal salivary glands and in SGT. (B) Analysis of HGF positive cases in SGT. Note that PA presented the higher percentage of positive cases compared to malignant SGT (Pearson chi-square test, $p < 0.00$). (C) Benign SGT presented higher expression of HGF compared to malignant tumors (Mann-Whitney test, $p = 0.04$).

Higher expression of p-Met in malignant SGT

The activation of HGF was evaluated by assessing p-Met that indicate the phosphorylation status of c-Met receptor. The group of malignant SGT presented higher percentage of p-Met positive cells (score analysis) than benign SGT ($p=0.03$ - Mann-Whitney test) (Figure 2). PA exhibited positivity to p-Met in epithelial luminal cells of ductal structures and myoepithelial cells (Figure 2A). In mixoid areas myoepithelial modified cells were negative. All AdCC showed p-Met labeling mainly in epithelial cells. Modified myoepithelial cells presented lower expression of this protein. All MEC were labeled to p-Met with epidermoid and intermediate cells exhibiting positivity for this protein. The mucous cells were negative. Three cases of AcCC were positive for p-Met and two were negative (Figure 2). Kappa (κ) statistics for the agreement of p-Met labelling among observers was 0.85 ($p<0.001$).

Higher expression of p-Akt in malignant SGT

The group of malignant SGT presented higher number of positive cases ($p<0.00$ – Pearson chi-squared test) and higher percentage of p-Akt positive cells (score analysis) than benign SGT ($p<0.00$ - Mann-Whitney test) (Figure 3). In PA, epithelial luminal cells of ductal structures and myoepithelial cells when positive showed cytoplasmic labelling, however the majority of cases were negative (Figure 3). Few epithelial and myoepithelial cells exhibited p-Akt nuclei expression. Malignant SGT were positive to p-Akt protein in 100% of the case showing cytoplasmic and nuclear labelling (Figure 3). All AdCC revealed p-Akt expression in epithelial and myoepithelial cells. All cell types of MEC were positive to p-Akt. AcCC were positive to this protein (Figure 3). Kappa (κ) statistics for the agreement of p-Akt^{Tyr308} labelling among observers was 0.95 ($p<0.001$).

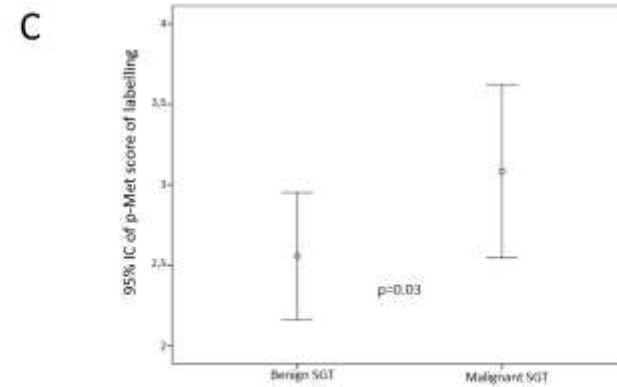
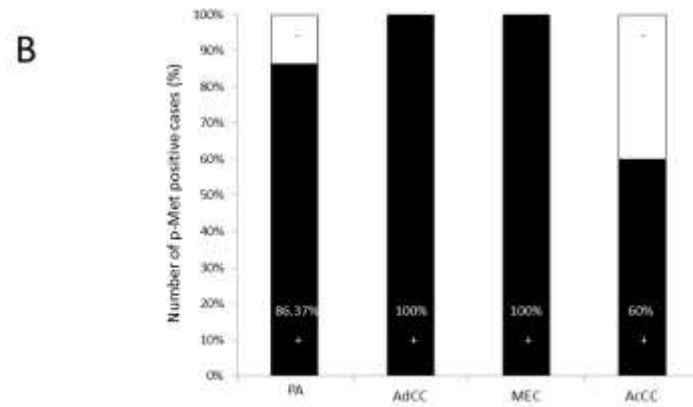
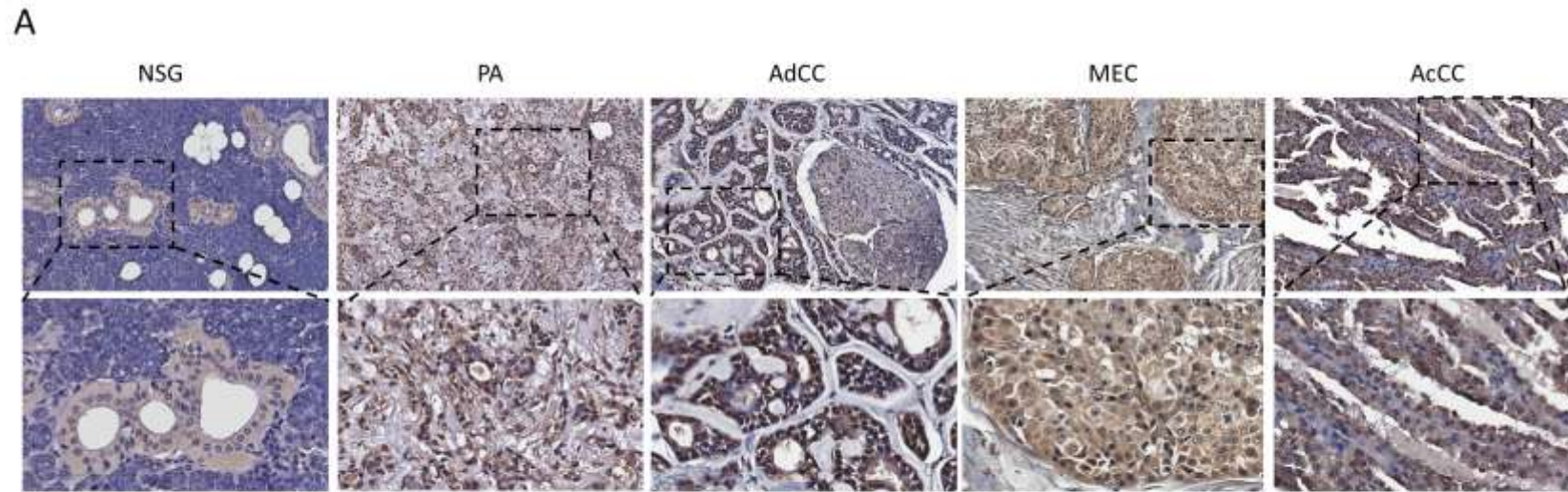


Figure 2. Higher expression of p-Met in malignant SGT. (A) Representative examples of p-Met expression in normal salivary glands and in SGT. (B) Analysis of p-Met positive cases in SGT. (C) Malignant SGT presented higher expression of p-Met compared to benign tumors (Mann-Whitney test, $p=0.03$).

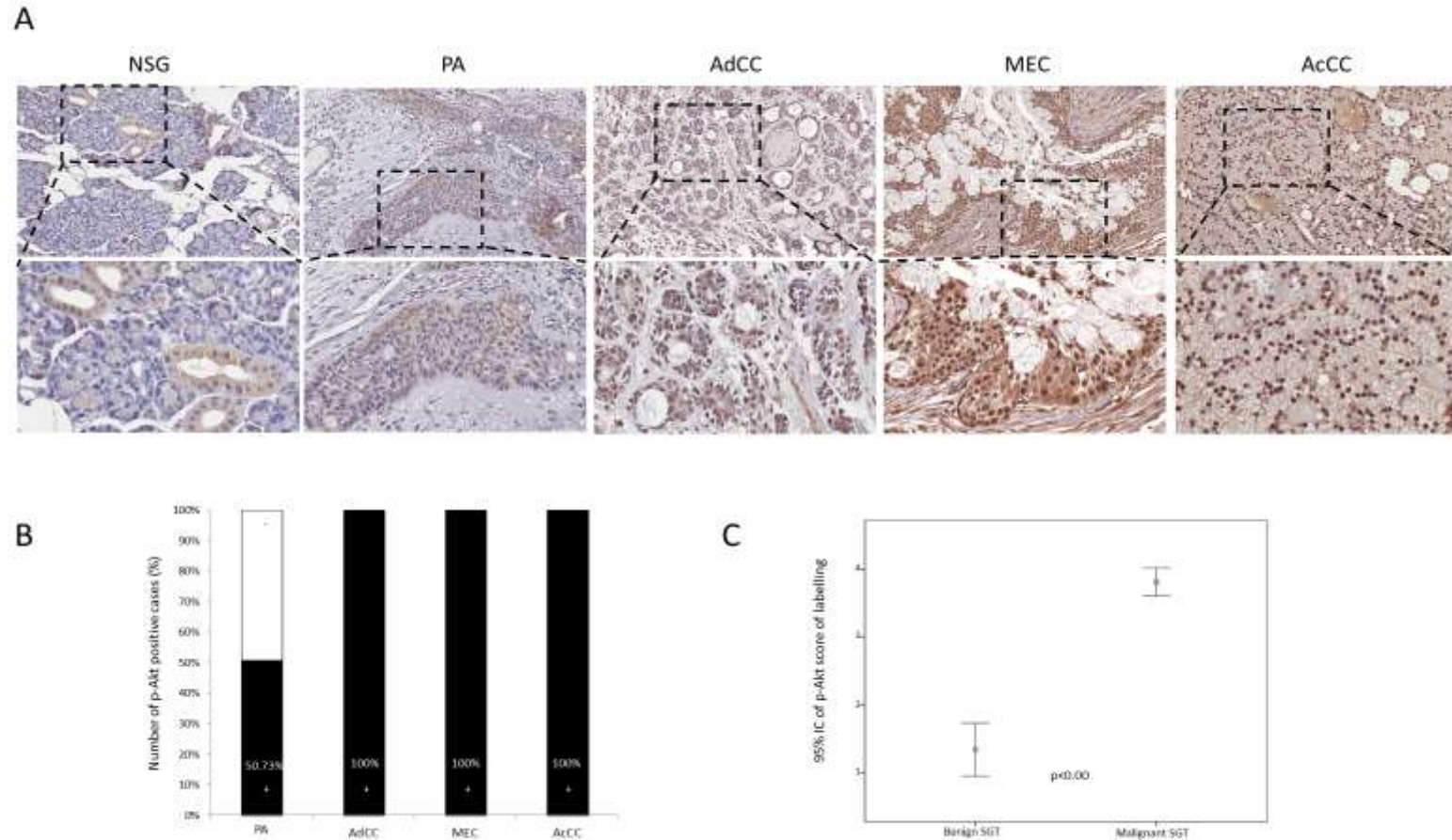


Figure 3. Higher expression of p-Akt in malignant SGT. (A) Representative examples of p-Akt expression in normal salivary glands and in SGT. (B) Analysis of p-Akt positive cases in SGT. Note that malignant tumors presented the higher percentage of positive cases compared to PA (Pearson chi-square test, $p < 0.00$). (C) Malignant SGT presented higher expression of p-Akt compared to benign tumors (Mann-Whitney test, $p < 0.00$)

Proliferative index (Ki67 expression) is higher in malignant SGT and associated with p-Akt expression

Data of Ki67 expression are summarised in Figure 4. The mean proliferative index was 0.5 (\pm 0.7) in PA, 6.33 (\pm 6.49) in AdCC, 16.6 (\pm 10.04) in MEC and 3.97 (\pm 4.27) in AcCC. Mann-Whitney test revealed a significant difference among benign and malignant tumors, where malignant SGT presented a higher proliferative profile compared to benign SGT (Figure 4A).

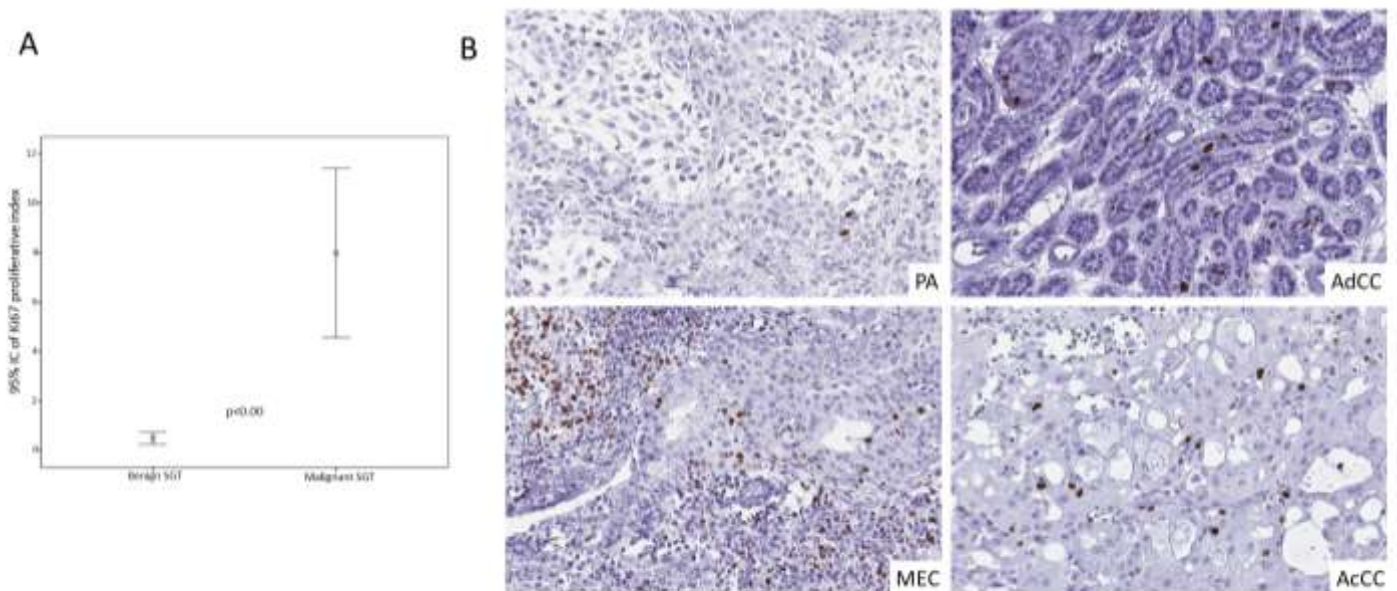


Figure 4. Higher proliferative profile of malignant SGT. (A) Malignant salivary gland tumors exhibited higher value of Ki-67 expression compared to benign tumors (Mann-Whitney test, $p < 0.00$) (B) Representative examples of Ki67 expression in SGT

Higher percentage of p-Met positive cells is associated with advanced clinical stage

All cases of salivary gland carcinomas presented high percentage of p-Akt positive cells despite the clinical stage, thus no difference was found concerning this protein. A significant difference was found regarding p-Met expression among less advanced clinical stages (I/II) and more advanced stages (III/IV) ($p=0.04$). Salivary gland carcinomas in more advanced stages (III/IV) presented higher expression of this protein. The statistical analysis association of all proteins analyzed with poor prognosis (recurrence and death) was not performed based in fact that only 4 cases exhibited recurrence and 3 patients died.

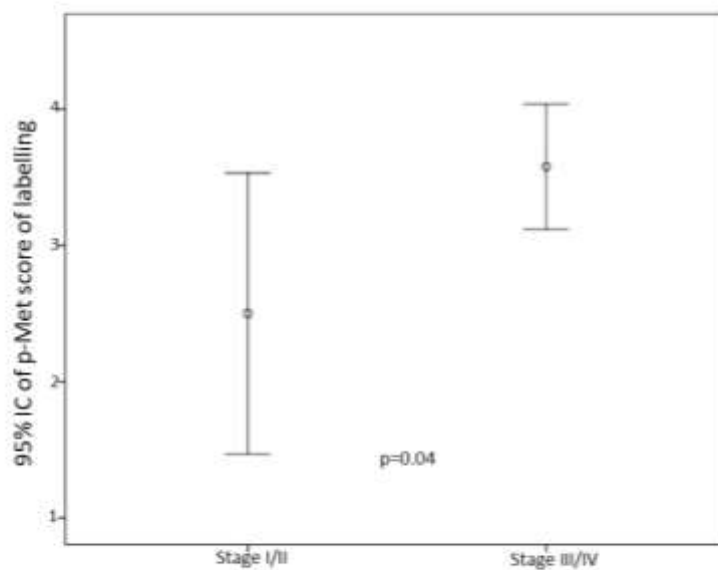


Figure 5: Association between of p-Met expression and clinical stages of malignant SGT. Salivary gland carcinomas in more advanced clinical stages presented higher expression of p-Met (Mann-Whitney test, $p=0.04$)

Correlation between HGF, p-Met , p-Akt and proliferative index

Spearman's correlation coefficients were calculated to determine whether there is association among the different proteins that belong to HGF/c-Met pathway and if these proteins correlate with the proliferative profile in benign and malignant SGT. The results of benign SGT are expressed in Table 2. In PA, a positive correlation was found between HGF and p-Akt/Ki67 expression, whereas a negative correlation was found between p-Akt and Ki67 expression. These results imply that in benign SGT an increase in HGF expression is associated with an increase in p-Akt expression, while an increase of these two proteins is associated with a decrease of tumor's proliferative profile. Data related to Spearman's correlation coefficients in malignant SGT is expressed in Table 3. The results revealed that in the present study, regarding salivary carcinomas, there was no significant correlation among the proteins studied.

Table 2. Spearman's correlation coefficients in benign SGT

		p-Met	p-Akt	Ki67
HGF	Correlation	0.00	0.50	0.70
	Significance	1.00	0.00	0.00
p-Met	Correlation		-0.01	0.32
	Significance		0.94	0.06
p-Akt	Correlation			-0.49
	Significance			0.00

Table 3. Spearman's correlation coefficients in malignant SGT

		p-Met	p-Akt	Ki67
HGF	Correlation	0.98	-0.22	0.14
	Significance	0.64	0.29	0.49
p-Met	Correlation		0.22	0.15
	Significance		0.29	0.48
p-Akt	Correlation			0.06
	Significance			0.78

Discussion

Salivary gland neoplasms are uncommon lesions that exhibit a diverse phenotypic features and unpredictable clinical outcomes.¹⁻³ The molecular events associated with their development and clinicopathological heterogeneity remain unknown.²¹ There are few studies that provide a comprehensive picture of the expression or activation status of HGF/c-Met and PI3K/Akt pathway in human salivary gland tumors.^{15-18, 22} Our results offer insight into the role of HGF/c-Met and PI3K/Akt mediating signaling in benign and malignant SGTs. The understanding of this pathway signaling through Akt will help the development of rational clinical strategies.

HGF is a pleiotropic polypeptide growth factor that has been considered a key driver of oncogenic transformation. It elicits several biological effects as cell proliferation, migration, survival, angiogenesis and invasion by binding to c-Met, a trans-membrane tyrosine kinases receptor.^{18,23} In salivary glands, HGF have been described in developing and adult tissues with its expression in the luminal cells, while there is no marking on acinar cells and myoepithelial.^{8,10,15,24} In similar way, the adult salivary glands include in our study revealed positive immunolabeling to HGF/c-MET. These results confirmed that this pathway has function in some tissue development and regeneration process, especially associated with morphogenesis of ducts.^{8,10,15,23,25}

The analysis of SGT in our study revealed that benign tumor analyzed had higher levels of HGF than malignant. However, they showed lower levels of p-AKT and Ki-67 expression. Perhaps, in benign SGT the HGF/c-MET pathway activates other pathways than PI3K, which are involved in regulate duct structures formations. Some authors have also observed higher HGF expression in benign SGT and associate this characteristic to its function as modulator of luminal cell growth and differentiation, three-dimensional organization, and ductal structures formation.^{15,22,26,27}

On the other hand, malignant SGT showed an overexpression of HGF/c-MET pathway detected by the higher levels of c-Met receptor phosphorylation, as well as, the higher activation of PI3K pathway through AKT phosphorylation. In parallel, the salivary glands carcinomas also showed more pronounced proliferative profile analyzed by KI-67 labelling index. These signaling cascade induced by the c-Met plays an important role in the growth and survival of several cancers.²⁸⁻³¹ Expression of HGF and its receptor c-Met in culture of AdCC cells were described by Suzuki et al. that enforce that this pathway play a role in inducing scattering and increasing the invasiveness of tumor cells.¹⁶ Due to HGF/c-MET strong involvement in human cancer they are considered one of the most attractive drug targets for cancer therapy. In addition, the activation of HGF/c-MET pathway has been associated with a functional cross-talk with EGFR family causing adaptive cellular response that may contribute to drug resistance.^{31,32}

One important downstream signal of HGF/c-Met includes PI3K/AKT that has been frequently altered in human cancers. AKT, also called protein kinase B (PKB), a serine/threonine protein kinase, is a downstream mediator of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) activated by dual phosphorylation on Tyr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³. Once it is activated Akt modulates the function of numerous substrates involved in the regulation of cell survival, cell cycle progression and cellular growth.^{33,34} Our findings showed that malignant SGT showed more activation of PI3K pathway through AKT phosphorylation that results in more proliferative behavior when compared to benign SGT. Similarly, Ettl et al.⁴ analyzed 272 salivary glands carcinomas and observed that cytoplasmic p-AKT labeling was observed frequently in more aggressive salivary gland tumors and was associated to worse survival. Likewise, p-AKT expression is reported as a poor prognosis factor in oral squamous cell carcinoma³⁵ and associate to higher tumor relapse in AdCC.³⁶ Using cell culture of salivary gland cancer Hara et al.⁶ observed that HGF/c-Met signaling promotes the tumor invasive

growth by activating the PI3K/AKT pathway. Based on these findings downstream effector molecules of HGF/c-Met and PI3K/AKT pathway are promising candidates as targets of effective therapies for malignant SGT. There are now only one phase II clinical trial using tivantinib (dephosphorylated MET kinase) associated to cetuximab in patients with recurrent/metastatic head and neck including SGT.

In benign SGT we detected that the overexpression of p-AKT was correlated with low proliferative index. These characteristics was previously appointed by Marques et al ³⁷ that observed high levels of p-AKT expression in benign SGT lead to an increased capability of MDM2 to enter the nuclei of the cells and inactive p53 functions reducing the cellular proliferation.

In conclusion, HGF/c-Met/PI3K signaling pathway appears to be active in SGT carcinogenesis regulating the proliferation especially in malignant tumors. New treatment strategies to salivary gland carcinomas involving the inhibitors of these pathways alone or in combination with other treatment need further investigations.

Acknowledgments

The authors thank Flavia Rejane Giusti for technical support. This study was supported by the Postgraduate Research Group of the Porto Alegre University Hospital (GPPG/FIPE: 12- 0339) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- process n. 485823/2012-8). Luise Meurer, Lelia Batista de Souza, Pablo Agustin Vargas and Manoela Domingues Martins are research fellows at CNPq, Brazil.

References

1. Saghravanian N, Ghazi N, Saba M. Clinicopathologic evaluation of salivary gland neoplasms: a 38-year retrospective study in Iran. *Ann Diagn Pathol* 2013;**17**:522-5.
2. Lawal AO, Adisa AO, Kolude B, Adeyemi BF, Olajide MA. A review of 413 salivary gland tumours in the head and neck region. *J Clin Exp Dent* 2013; **5**:e218-22.
3. Adams A, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. *Oral Oncol* 2013; **49**:845-53.
4. Ettl T, Schwarz-Furlan S, Gosau M, Reichert TE. Salivary gland carcinomas. *Oral Maxillofac Surg* 2012; **16**:267-83.
5. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon IARC Press 2005: 209-282.
6. Hara S, Nakashiro K, Goda H, Hamakawa H. Role of Akt isoforms in HGF-induced invasive growth of human salivary gland cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **370**:123-8.
7. Knowles LM, Stabile LP, Egloff AM, Rothstein ME, Thomas SM, Gubish CT, Lerner EC, Seethala RR, Suzuki S, Quesnelle KM, Morgan S, Ferris RL, Grandis JR, Siegfried JM. HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**:3740-50.
8. Ikari T, Hiraki A, Seki K, Sugiura T, Matsumoto K, Shirasuna K. Involvement of hepatocyte growth factor in branching morphogenesis of murine salivary gland. *Dev Dyn* 2003; **228**:173-84.
9. Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* 2003; **88**:408-17.

10. Loreto C, Caltabiano R, Musumeci G, Caltabiano C, Greco MG, Leonardi R. Hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in human embryo salivary glands. An immunohistochemical study. *Anat Histol Embryol* 2010; **39**:173-7.
11. Mizuno S, Nakamura T. HGF-MET Cascade, a Key Target for Inhibiting Cancer Metastasis: The Impact of NK4 Discovery on Cancer Biology and Therapeutics. *Int J Mol Sci* 2013; **14**:888-919.
12. De Herdt MJ, Baatenburg de Jong RJ. HGF and c-MET as potential orchestrators of invasive growth in head and neck squamous cell carcinoma. *Front Biosci* 2008; **13**:2516-26.
13. Wen PY, Schiff D, Cloughesy TF, Raizer JJ, Laterra J, Smitt M, Wolf M, Oliner KS, Anderson A, Zhu M, Loh E, Reardon DA. A phase II study evaluating the efficacy and safety of AMG 102 (rilotumumab) in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 2011; **13**:437-46.
14. Seiwert T, Sarantopoulos J, Kallender H, McCallum S, Keer HN, Blumenschein G Jr. Phase II trial of single-agent foretinib (GSK1363089) in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Invest New Drugs* 2013; **31**:417-24.
15. Tsukinoki K, Yasuda M, Asano S, Karakida K, Ota Y, Osamura RY, Watanabe Y. Association of hepatocyte growth factor expression with salivary gland tumor differentiation. *Pathol Int.* 2003; **53**: 815-22.
16. Suzuki K, Cheng J, Watanabe Y. Hepatocyte growth factor and c-Met (HGF/c-Met) in adenoid cystic carcinoma of the human salivary gland. *J Oral Pathol Med* 2003; **32**: 84-9.

17. Hara S, Nakashiro K, Klosek SK, Ishikawa T, Shintani S, Hamakawa H. Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating HIF-1alpha in human salivary gland cancer cells. *Oral Oncol.* 2006; **42**:593-8.
18. Ach T, Zeitler K, Schwarz-Furlan S, Baader K, Agaimy A, Rohrmeier C, Zenk J, Gosau M, Reichert TE, Brockhoff G, Ettl T. Aberrations of MET are associated with copy number gain of EGFR and loss of PTEN and predict poor outcome in patients with salivary gland cancer. *Virchows Arch* 2013; **462**:65-72.
19. Fonseca FP, de Andrade BA, Rangel AL, Della Coletta R, Lopes MA, de Almeida OP, Vargas PA. Tissue microarray is a reliable method for immunohistochemical analysis of pleomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;**117**:81-8.
20. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; **33**:159-74.
21. Maruya S, Kim HW, Weber RS, Lee JJ, Kies M, Luna MA, Batsakis JG, El-Naggar AK. Gene expression screening of salivary gland neoplasms: molecular markers of potential histogenetic and clinical significance. *J Mol Diagn* 2004; **6**:180-90.
22. Aoki T, Tsukinoki K, Kurabayashi H, Sasaki M, Yasuda M, Ota Y, Watanabe Y, Kaneko A. Hepatocyte growth factor expression correlates with cyclooxygenase-2 pathway in human salivary gland tumors. *Oral Oncol* 2006; **42**:51-6.
23. Lau PC, Chan AT. Novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma: HGF-MET signaling pathway. *Anticancer Drugs* 2011; **22**:665-73.
24. Wolf HK, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Localization of hepatocyte growth factor in human and rat tissues: an immunohistochemical study. *Hepatology* 1991; **14**:488-94.
25. Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* 2003; **88**:408-17.

26. Furuse C, Miguita L, Rosa AC, Soares AB, Martinez EF, Altemani A, de Araújo VC. Study of growth factors and receptors in carcinoma ex pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med* 2010; **39**:540-7.
27. To CT, Tsao MS. The roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor in human cancers (Review). *Oncol Rep* 1998; **5**:1013-24.
28. Koo BS, Kim JM, Seo ST, Yoon YH, Kwon KR, Kim SH, Kwon HW, Bae WJ, Lim YC. Upregulation of HGF and c-MET is Associated with Subclinical Central Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2014; **21**:2310-7.
29. Samamé Pérez-Vargas JC, Biondani P, Maggi C, Gariboldi M, Gloghini A, Inno A, Volpi CC, Gualeni AV, di Bartolomeo M, de Braud F, Castano A, Bossi I, Pietrantonio F. Role of cMET in the development and progression of colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2013; **14**:18056-77.
30. Ozasa H, Oguri T, Maeno K, Takakuwa O, Kunii E, Yagi Y, Uemura T, Kasai D, Miyazaki M, Niimi A. Significance of c-MET Overexpression in Cytotoxic Anticancer Drug Resistant Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Sci* 2014 May 14. doi: 10.1111/cas.12447
31. Knowles LM, Stabile LP, Egloff AM, Rothstein ME, Thomas SM, Gubish CT, Lerner EC, Seethala RR, Suzuki S, Quesnelle KM, Morgan S, Ferris RL, Grandis JR, Siegfried JM. HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**:3740-50.
32. Lee YY1, Kim HP, Kang MJ, Cho BK, Han SW, Kim TY, Yi EC. Phosphoproteomic analysis identifies activated MET-axis PI3K/AKT and MAPK/ERK in lapatinib-resistant cancer cell line. *Exp Mol Med* 2013; **45**:e64.
33. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T,

- Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;**316**:1039-43.
34. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000; **19**:5582-9.
35. Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, Hong SP. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005; **58**:1199-205.
36. Völker HU, Scheich M, Berndt A, Haubitz I, Metzger A, Müller-Hermelink HK, Kämmerer U, Schmidt M. Expression of p-AKT characterizes adenoid cystic carcinomas of head and neck with a higher risk for tumor relapses. *Diagn Pathol* 2009; **19**:4-18.
37. Marques YM, de Lima Mde D, de Melo Alves Sde M Jr, Soares FA, de Araújo VC, Pinto Ddos S Jr, Mantesso A. Mdm2, p53, p21 and pAKT protein pathways in benign neoplasms of the salivary gland. *Oral Oncol* 2008;**44**:903-8.
38. de Lima M de D, Marques YM, Alves Sde M Jr, Freitas VM, Soares FA, de Araújo VC, Pinto Ddos S Jr, Mantesso A. MDM2, P53, P21WAF1 and pAKT protein levels in genesis and behaviour of adenoid cystic carcinoma. *Cancer Epidemiol* 2009;**33**:142-6.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As NGS, embora raras, representam um amplo e desafiador grupo de lesões. Isto se deve a sua grande variedade histopatológica, sendo esta determinante no perfil de comportamento destes tumores. Estudos epidemiológicos podem servir como uma importante ferramenta na identificação dos grupos de riscos assim como de parâmetros clínico-patológicos que possam apresentar caráter prognóstico. Sabe-se que podem haver variações no perfil epidemiológicos das NGS baseado na localização geográfica estudada, justificando o primeiro objetivo desta tese que foi avaliar o perfil demográfico, os aspectos clinicopatológicos e prognóstico das NGS diagnosticadas em um centro de atenção à saúde de nível terciário.

O levantamento epidemiológico realizado compreendeu a análise de dados demográficos, características clínicas e histopatológicas das lesões, tratamento e evolução. Além disso, foi feita uma correlação com demais estudos epidemiológicos conduzidos em outras localidades. Foi possível identificar que o perfil dos pacientes acometidos por NGS assim como o perfil clínico e histopatológico da amostra do presente estudo está de acordo com outros levantamentos epidemiológicos encontrados na literatura. Vale ressaltar, entretanto, que algumas características demográficas, como idade e gênero, assim como a predominância histopatológica, pode variar de acordo com a localidade. O desenvolvimento de estratégias de ações de saúde pública voltadas para a prevenção e promoção de saúde estão baseadas na realização de estudos como este, entretanto é fundamental que estas estratégias estejam baseadas no perfil da população alvo.

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na formação e progressão tumoral representa outro ponto de extrema importância, principalmente no que diz respeito a

identificação de marcadores biológicos prognósticos assim como estratégias terapêuticas que atuem na regulação dessas vias. A desregulação de fatores de crescimento, de seus receptores e das diversas vias de sinalização tem sido relacionadas com a aquisição do fenótipo maligno, capacidade de invasão e metástase de tumores malignos. A via de sinalização do HGF e seu receptor c-Met tem sido relacionada a diversos desfechos oncogênicos, seja pela super-produção de HGF, ou pela mutação do gene MET que codifica o receptor desta via. Estudos prévios em tumores sólidos já demonstraram que a desregulação desta via está associada a dissociação de células, EMT, invasão da MEC, motilidade, angiogênese e sobrevivência.

Baseado nos conhecimentos prévios relacionados a via de sinalização HGF/c-Met/PI3k, associada aos resultados contraditórios encontrados em relação as NGS, o objetivo da segunda parte desta tese foi verificar se esta via de sinalização está ativa nas NGS e correlacionar os dados obtidos com o perfil proliferativo e comportamento clínico das lesões. Para que seja possível identificar alterações relacionadas com a aquisição do fenótipo maligno nestes tumores é imprescindível que a amostra estudada compreenda tecido glandular normal, NGS benignas e NGS malignas, permitindo que seja estabelecida uma correlação da expressão destas proteínas nestes diferentes tecidos. Além disso, é importante que se identifique se os componentes da via estão ativos e não apenas expressos, por esta razão a avaliação das proteínas na sua forma fosforilada contribuem para que o resultado obtido pelo presente estudo respondam de forma adequada a questão proposta pelos pesquisadores.

Através da análise dos resultados foi possível concluir que a via do HGF/c-Met está de fato mais expressa nos tumores malignos, apresentando relação com perfil de proliferação aumentado destes tumores. Em razão da amostra de tumores malignos ser relativamente pequena e poucos tumores apresentarem desfecho desfavorável não foi

possível concluir se a maior expressão das proteínas estudadas representa um marcador prognóstico. Vale ressaltar que a expressão do fator de crescimento isoladamente não pode ser vista como um fator determinante para a ativação da via de sinalização, uma vez que os tumores benignos apresentaram maior expressão de HGF. Acredita-se que esta maior expressão de HGF esteja relacionada com o desenvolvimento de estruturas tubulares frequentemente encontradas no adenoma pleomórfico.

Drogas que tem como alvo a via de sinalização HGF/c-Met têm demonstrado resultados promissores em ensaios clínicos em fase III em tumores de pulmão e tireóide, e em ensaios clínicos em fase II em tumores de cabeça e pescoço. Entretanto, não há trabalhos que avaliem especificamente inibidores desta via em carcinomas de glândulas salivares. Os resultados do presente estudo, associados a demais resultados já descritos na literatura, demonstram que esta via pode representar um possível alvo terapêutico nas NGS, sendo necessário que se realizem estudos *in vitro* e futuramente *in vivo* para confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACH, T. et al. Aberrations of MET are associated with copy number gain of EGFR and loss of PTEN and predict poor outcome in patients with salivary gland cancer. **Virchows Arch.**, v. 462, n. 1, p.62-75, Jan. 2013

ADAMS, A.; WARNER, K.; NÖR. J.E. Salivary gland cancer stem cells. **Oral Oncol.**, v.49, n. 9, p. 845-853, Sept. 2013.

ADELSTEIN, D.J. et al. Biology and management of salivary gland cancers. **Semin Radiat Oncol.** v. 22, n. 3, p. 245-253, July 2012.

AGARWAL, J.P. et al. Intraoral adenoid cystic carcinoma: prognostic factors and outcome. **Oral Oncol.** v. 44, n. 10, p. 986-993, Oct. 2008.

AGULNIK, M.; SIU, L.L. An update on the systemic therapy of malignant salivary gland cancers: role of chemotherapy and molecular targeted agents. **Curr Med Chem Anticancer Agents.** v. 4, n. 6, p. 543-551, Nov. 2004.

ALVES, F.A. et al. Pleomorphic adenoma of the submandibular gland: clinicopathological and immunohistochemical features of 60 cases in Brazil. **Arch Otolaryngol.** v. 128, n. 12, p.1400-1403, Dec. 2002 .

ALYASIRI, N.S. et al. PTEN-mediated AKT activation contributes to the reduced apoptosis among Indian oral squamous cell carcinoma patients. **J Cancer Res Clin Oncol.** v. 138, n.1, p. 103-109, Jan. 2012.

AL-ZAHER, N. et al. Acinic cell carcinoma of the salivary glands: a literature review. **Hematol Oncol Stem Cell Ther.** v. 2, n.1, p. 259-264,2009.

AMANO, O.T. et al., Expression and localization of hepatocyte growth factor in rat submandibular gland. **Growth Factors.** v. 10, n.2, p. 145-151, 1994.

AMEMIYA, H.; MENOLASCINO, F.; PEÑA, A. Role of the expression of c-Met receptor in the progression of gastric cancer. **Invest Clin.** v. 51, n. 3, p. 369-380, Sep. 2010.

AMEMIYA, H. et al.. [Increased expression of the c-Met receptor mRNA in gastric cancer]. **Invest Clin.** v. 54, n. 3, p. 284-298, Sep. 2013.

AMORNPHEMOLTHAM, P. et al. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. **Clin Cancer Res.** v. 15, n.10, p, 4029-4037, June 2004.

ANTONY, J. et al. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a comprehensive review of clinical, pathological and molecular data. **Head Neck Pathol.** v. 6, n.1, p. 1-9, Mar. 2012.

ARAKAWA, Y. et al. Mucoepidermoid carcinoma of the liver: report of a rare case and review of the literature. **Hepatol Res.** v. 38. n.7, p. 736-742, July 2008.

ASHKAVANDI, Z.J. et al. MCM3 as a novel diagnostic marker in benign and malignant salivary gland tumors. **Asian Pac J Cancer Prev.** v.14, n.16, p. 3479-3482, 2013.

AUCLAIR, P.L.; ELLIS, G.L. Atypical features in salivary gland mixed tumors: their relationship to malignant transformation. **Mod Pathol.** v. 9, n. 6, p. 652-657, June 1996.

BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. Pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon IARC Press 2005: 209-282.

BATSAKIS, J.G.; LUNA, M.A.; EL-NAGGAR, A. Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: III. Adenoid cystic carcinomas. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** v. 99, n.12, p. 1007-1009, Dec. 1990.

BATSAKIS, J.G. Salivary gland neoplasia: an outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 49, n. 3, p. 229-232, Mar. 1980.

BELL, D.; EL-NAGGAR, A.K. Molecular heterogeneity in mucoepidermoid carcinoma: conceptual and practical implications. **Head Neck Pathol.** v. 7, n.3 p. 23-27, Mar. 2013.

BELL, D.; HANNA, E.Y. Salivary gland cancers: biology and molecular targets for therapy. **Curr Oncol Rep.** v. 14, n. 2, p. 166-174, Apr. 2012.

BELLO, I.O. et al. Epithelial salivary gland tumors in two distant geographical locations, Finland (Helsinki and Oulu) and Israel (Tel Aviv): a 10-year retrospective comparative study of 2,218 cases. **Head Neck Pathol.** v. 6, n. 2, p. 224-231, June 2012.

BELLO, I.O.; SOINI, Y.; SALO T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). **Oral Oncol.** v. 46, n.9, p. 630-635, Sep. 2010.

BHAYANI, M.K. Prognosis and risk factors for early-stage adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. **Cancer.** v. 118, n. 11, p. 2872-2878 June 2012.

BIANCHI, B. Adenoid cystic carcinoma of intraoral minor salivary glands. **Oral Oncol.** v. 44, n.11, p. 1026- 1031, Nov. 2008.

BIRCHMEIER, C. et al.. Met, metastasis, motility and more. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 4, n.12, p. 915-925, Dec. 2003.

BJØRNDAL, K. Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: outcome and prognostic factors. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). **Oral Oncol.** v.48, n. 2, p. 179-185, Feb. 2012.

BLADT, F. et al. Essential role for the *c-met* receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. **Nature.** v. 31, n. 376 p. 768-771, Aug. 1995.

BRANDWEIN, M.S. et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. **Am J Surg Pathol.** v. 25, n. 7, p. 835- 845, July 2001.

BRENNER, H.; HAKULINEN, T. Implications of incomplete registration of deaths on long-term survival estimates from population-based cancer registries. **Int J Cancer.** v. 125, n. 2, p. 432-437, July 2009.

BRUSEVOLD, I.J. et al. Nuclear and cytoplasmic expression of Met in oral squamous cell carcinoma and in an organotypic oral cancer model. **Eur J Oral Sci.** v. 118, n. 4, p. 342-349, 2010.

CHANG, K.Y. ET AL. Dissecting the EGFR-PI3K-AKT pathway in oral cancer highlights the role of the EGFR variant III and its clinical relevance. **J Biomed Sci.** v. 27, p. 20-43, June 2013.

CHAU, M.N.; RADDEN, B.G. A clinical-pathological study of 53 intra-oral pleomorphic adenomas. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v.18, n.3, p. 158-62, June 1989.

- CHAUDHRY, A.P. et al. Ultrastructural study of the histogenesis of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. **J Oral Pathol Med**. v. 18, n. 7, p. 400- 409, Aug. 1989.
- CHAUDHRY, A.P. et al. Histogenesis of acinic cell carcinoma of the major and minor salivary glands. An ultrastructural study. **J Pathol**. v. 148, n. 4, p. 307-308, Apr. 1986.
- CHEN, M.K. et al. Expression of p53 protein and primary tumour volume in patients with nasopharyngeal carcinoma. **J Otolaryngol**. v. 33, n. 5, p. 304- 307, Oct. 2004.
- CLEVELAND, D. et al. Solid adenoid cystic carcinoma of the maxilla. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. v. 69, n. 4, p. 470-478, Apr.1990.
- COHEN, Y. et al. Mutational analysis of PTEN/PIK3CA/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**. v. 47, n. 10, p. 946- 950, Oct. 2011.
- COOPER, C.S. The met oncogene: from detection by transfection to transmembrane receptor for hepatocyte growth factor. **Oncogene**. v. 7, n. 1, p. 3-7, Jan. 1992.
- COTRAN, R. S. et al. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6d. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2000. p. 1049.
- da CRUZ PEREZ, D.E. et al. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**. v. 68, n. 7, p. 895-902, July 2004.
- da CRUZ PEREZ, D.E. et al. Adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma of the maxillary sinus: report of a 44-year experience of 25 cases from a single institution. **J Oral Maxillofac Surg**. v.64, n.11, p. 1592 - 1597, Nov. 2006.
- da CRUZ PEREZ, D.E. et al. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol**. v. 42, n, 2, p. 139-146, Feb. 2006.
- DARDICK, I. et al. Mucoepidermoid carcinoma: ultrastructural and histogenetic aspects. **J Oral Pathol**. v. 13, n. 4, p. 342-358, Aug. 1984.
- DARDICK, I. et al. A Comparative histogenesis and morphogenesis of mucoepidermoid carcinoma and pleomorphic adenoma. An ultrastructural study. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**. v. 417, n. 5, p. 405- 4017, 1990.

DARDICK, I. **Color atlas/text of salivary gland tumor pathology**. New York: Igaku-Shoin Medical Publisher. 1996. 274 p.

DATTA, S.R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev.** v. 13, n. 22, p. 2905-2927, Nov. 1999.

De HERDT, M.J.; BAATENBURG de JONG, R.J. HGF and c-MET as potential orchestrators of invasive growth in head and neck squamous cell carcinoma. **Front Biosci.** v. 1, n. 13, p. 2516- 2526, 2008.

de LIMA MDE D, et al. MDM2, P53, P21WAF1 and pAKT protein levels in genesis and behaviour of adenoid cystic carcinoma. **Cancer Epidemiol.** v. 33, n. 2, p. 142- 146, Aug. 2009.

DEAN M, et al. The human *met* oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. **Nature.** v.318, n. 6044, p. 385-388, Dec. 1985.

DECLERCQ, J. et al. Adenomyoepitheliomatous lesions of the mammary glands in transgenic mice with targeted PLAG1 overexpression. **Int J Cancer.** v. 123, n. 7, p. 1593-600, Oct. 2008.

DRUT, R.; GIMÉNEZ, P.O. Acinic cell carcinoma of salivary gland with massive deposits of globular amyloid. **Int J Surg Pathol.** v. 16, n.2, p. 202-207, Apr. 2008.

DURAND, N. et al. Synchronous bilateral acinic cell carcinoma of the parotid: when a tumor reveals another one. **Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.** v. 130, n.1, p. 22-25, Feb. 2013.

ELLIS, G.L.; CORIO, R.L. Acinic cell adenocarcinoma. A clinicopathologic analysis of 294 cases. **Cancer.** v. 52, n,3, p. 542-549, Aug. 1983.

ETTL, T. et al. The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localisation. **Oral Oncol.** v. 48, n. 9, p. 822-830, Sep. 2012.

EVERSOLE, L.R. Histogenic classification of salivary tumors. **Arch Pathol.** v. 92, n. 6, p. 433-443, Dec. 1971.

EVESON, J.W.; CAWSON, R.A.. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. **J Pathol.** v. 146, n. 1, p. 51-58, May. 1985.

FINGAR, D.C. et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. **Mol Cell Biol.** v. 24, n.1, p. 200-216, Jan. 2004.

FONSECA, F.P. et al. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** v. 114, n. 2, p. 230-290, Aug. 2012.

FORESTA, E. et al. Pleomorphic adenoma and benign parotid tumors: extracapsular dissection vs superficial parotidectomy-review of literature and meta-analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** v. 116, n. 6, p. 663-676, p. 663-676, June 2014.

FREITAS, L.L. et al. Biomarker analysis in carcinoma ex pleomorphic adenoma at an early phase of carcinomatous transformation. **Int J Surg Pathol.** v. 13, n. 4, p. 337-342, Oct. 2005.

FURUSE, C. et al. Study of growth factors and receptors in carcinoma ex pleomorphic adenoma. **J Oral Pathol Med.** v. 39, n. 7, p. 540- 547, Aug. 2010.

FRESNO VARA, J.A. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treat Rev.** v. 30, n. 2, p. 193-204, Apr. 2004.

FUJITA, S., IKEDA, T. Cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: relationship with morphogenesis of histological variants. **J Oral Pathol Med.** v. 41, n. 3, p. 207-213, Mar. 2012.

FURGE, K.A.; ZHANG, Y.W.; VANDE WOUDE, G.F. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. **Oncogene.** v. 19, n. 49, p. 5582-5589, 2000.

GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer.** v. 31, n.1, p. 13-20, Jan.1983.

- GHERARDI, E. et al. Targeting MET in cancer: rationale and progress. **Nat Rev Cancer**. v. 12, n.2, p. 89-103, Jan. 2012.
- GOMES, C.C. et al. Anti-apoptotic gene transcription signature of salivary gland neoplasms. **BMC Cancer**. v. 7, n. 61, p. 1-6, 2012.
- GOMES, C.C. et al. Assessment of TP53 mutations in benign and malignant salivary gland neoplasms. **PLoS One**. v. 7, n, 7, p. 41261, 2012.
- GONÇALVES, C.F. et al. Expression Of Ki-67 and MUC1 In mucoepidermoid carcinomas of young and adult patients: prognostic implications. **Exp Mol Pathol**. v. 90, n. 3, p. 271-275, June 2011.
- GOODE, R.K.; AUCLAIR, P.L.; ELLIS, G.L. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. **Cancer**. v. 82, n. 7, p. 1217-1224, Apr. 1998.
- GRAZIANO, F. et al. Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. **Clin Oncol**. v. 29, n. 36, p. 4789-4795, 2011.
- GUIMARAES, D.S. et al. Acinic cell carcinoma of salivary glands: 16 cases with clinicopathologic correlation. **J Oral Pathol Med**. v. 18, n. 7, p. 396, 399, Aug.1989.
- HARA, S. et al. Role of Akt isoforms in HGF-induced invasive growth of human salivary gland cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 370, n. 1, p. 123-128, May. 2008.
- HARA, S. et al. Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating HIF-1alpha in human salivary gland cancer cells. **Oral Oncol**. v. 42, n. 6, p. 593-598, 2006.
- HASSANIN, M.B. et al. Immunohistochemical and fluorescent microscopic study of histogenesis of salivary mucoepidermoid carcinoma. **J Oral Pathol Med**. v. 18, n. 5, p. 291-298, May 1989.
- HICKS, J.; FLAITSZ, C. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescents: assessment of proliferation markers. **Oral Oncol**. v. 36, n. 5, p. 454- 460, Sep. 2000.

HOFFMAN, H.T. et al. National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck: acinic cell carcinoma. **Head Neck**. v. 21, n.4, p. 297-309, July 1999.

IHLER, S et al. Differential diagnosis of salivary acinic cell carcinoma and adenocarcinoma (NOS). A comparison of (immuno-)histochemical markers. **Pathol Res Pract.**, v. 198, n. 12, p. 777-783, 2002.

IKARI, T. et al. Involvement of hepatocyte growth factor in branching morphogenesis of murine salivary gland. **Dev Dyn**, v. 228, n. 2, p. 173-184, Oct. 2003.

INOUE, T. et al. Acinic cell carcinoma arising in the glossopalatine glands: a report of two cases with electron microscopic observations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. v. 57, n. 4, p. 398-407, Apr. 1984.

ISOLA, J. ET AL. Steroid receptors and Ki-67 reactivity in ovarian cancer and in normal ovary: correlation with DNA flow cytometry, biochemical receptor assay, and patient survival. **J Pathol**. v. 162, n. 4, p. 295-301, Dec. 1990

ITO FA, et al. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v. 34, n.5, p. 533-536, July 2005.

JAHAN-PARWAR, B. et al. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. **Am J Surg Pathol**. v. 23, n.5, p. 523-529, May.1999.

JANJUA, O.S. et al. Bcl-2 protein expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a single institution experience. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**. v. 5, n.2, p. 96-100, 2012.

JIA, Y.L. et al. Synchronous bilateral multifocal acinic cell carcinoma of parotid gland: case report and review of the literature. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 70, n.10, p. 574-580, Oct. 2012.

JOYCE, D. et al. Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. **J Biol Chem**. v. 274, n. 36, p. 25245-25246, Sep. 1999.

KNAG, J.Y. et al Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator

inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. **Cancer Res.** v. 63, n. 5, p. 1101-1105, Mar. 2003.

KATAYAMA, R. et al. Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition. **Cancer Res.** v. 73, n. 10, p. 3087-3096, May. 2013.

KIM L, KING T, AGULNIK M. Head and neck cancer: changing epidemiology and public health implications. **Oncology**, v. 24, n. 10, p.915-919, 2010.

KLOSEK, S.K. et al. CD151 forms a functional complex with c-Met in human salivary gland cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 336, n. 2, p. 408-416, Oct. 2005.

KO, Y.H. et al. Prognostic factors affecting the clinical outcome of adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Jpn J Clin Oncol.** v. 37, n. 11, p. 805-811, Nov. 2007.

KOKEMUELLER, H. et al. Epithelial malignancies of the salivary glands: clinical experience of a single institution-a review.**Int J Oral Maxillofac Surg.** v. 33, n. 5, p. 423-432, July 2004.

KOO, B.S. et al. Upregulation of HGF and c-MET is Associated with Subclinical Central Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Microcarcinoma. **Ann Surg Oncol.** v. 21, n. 7, p.2310-2317, Feb. 2014.

KRISHNANAND, G. et al. Oncocytic variant of mucoepidermoid carcinoma of submandibular gland: an unusual clinical and morphological entity. **Indian J Pathol Microbiol.** v. 50, n.3, p.538-540, July 2007 .

LARSEN, S.R. et al. Prognostic significance of Ki-67 in salivary gland carcinomas. **A.J Oral Pathol Med.** v. 41, n.8, p.598-602 Sep. 2012;.

LAUXEN, I.S. et al. Immunoprofiling of oral squamous cell carcinomas reveals high p63 and survivin expression. **Oral Dis.** v. 20, n.3, p.76-80, Apr. 2014.

LEIVO, I. et al. Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation. **Cancer Genet Cytogenet.** v.156, n. 2, p.104-13, Jan. 2005.

LESKO, E.; MAJKA, M. The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis. **Front Biosci.** v. 1, n. 13, p. 1271-1280, 2008.

LEWIS, J.E.; OLSEN, K.D.; WEILAND, L.H. Acinic cell carcinoma. Clinicopathologic review. **Cancer.** v. 67, n. 1, p. 172-179, Jan. 1991.

LI, J. et al. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. **Cancer Res.** v. 58, n. 24, p. 5667-5672, Dec. 1998.

LIANG, J.; SLINGERLAND, J.M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. **Cell Cycle.** v. 2, n. 4, p. 339-345, Jul-Aug. 2003.

LIM, Y.S. et al. Growth Inhibitory Effect of Palatine Tonsil-derived DCIS and adjacent Mesenchymal Stem Cells on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. **Clin Exp Otorhinolaryngol.** v. 5, n. 2, p.86-93, June 2012.

LIN, Y.C. et al. Clinicopathological features of salivary and non-salivary adenoid cystic carcinomas. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v. 41, n. 3, p. 354-60, Mar. 2012.

LINDEMANN, K. et al. Differential expression of c-Met, its ligand HGF/SF and HER2/neu in normal breast tissue. **Histopathology.** v. 51, n. 1, p.54-62, July 2007.

LUJAN, B. et al. Activation of the EGFR/ERK pathway in high-grade mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. **Br J Cancer.** v. 103, n. 4, p.510-6, Aug. 2010.

LOCATELLI, A. et al. Mechanisms of HGF/Met signaling to Brk and Sam68 in breast cancer progression. **Horm Cancer.** v. 3, n. 1-2, p. 14-25, Apr. 2012..

LOYOLA, A. M. et al. Minor salivary gland tumours. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. **Eur J Cancer B Oral Oncol.** n. 31B, v. 3, p. 197-201, May. 1995.

LOYOLA, A.M. et al. Study of minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma differentiation based on immunohistochemical expression of cytokeratins, vimentin and muscle-specific actin. **Oral Oncol.** v. 34, n. 2, p. 112-118, 1998.

LUKŠIĆ, I. et al. Salivary gland tumours: 25 years of experience from a single institution in Croatia. **Craniomaxillofac Surg.** v. 40, n. 3, p. 75-81, Apr. 2012.

LUNA, M. A. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. **Adv Anat Pathol**. v. 13, n. 6, p. 293-307, Nov. 2006.

MALHOTRA, K.P.; AGRAWAL, V.; PANDEY, R. High grade transformation in adenoid cystic carcinoma of the parotid: report of a case with cytologic, histologic and immunohistochemical study. **Head Neck Pathol**. v. 3, n. 4, p. 31031-31034, Dec. 2009.

MARCINOW, A. et al. Clinicopathologic predictors of recurrence and overall survival in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: A single institutional experience at a tertiary care center. **Head Neck**. Oct. 2013.

MARQUES, Y.M. et al. Mdm2, p53, p21 and pAKT protein pathways in benign neoplasms of the salivary gland. **Oral Oncol**. v. 44, n. 9, p. 903-8, Sep. 2008.

MARQUES, Y.M.F.S. **Análise da Via do Akt em Neoplasias Benignas e Malignas de Glândulas Salivares**. 2007. 84 F. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARSHALL, D.D., KORNBERG, L.J. Overexpression of scatter factor and its receptor (c-met) in oral squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**. v. 108, n. 9, p. 1413-1417, Sep. 1998.

MATSUBA, H.M. et al. Adenoid cystic salivary gland carcinoma. A histopathologic review of treatment failure patterns. **Cancer**. v. 57, n. 3, p.519-24, Feb.1986.

MATSUI, S. et al. Clinical significance of aggressive hepatectomy for colorectal liver metastasis, evaluated from the HGF/c-Met pathway. **Int J Oncol**. v. 37, n. 2, p. 289-297, Aug. 2010.

MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. NK4 gene therapy targeting HGF-Met and angiogenesis. **Front Biosci**. v. 1, n. 13: p. 1943-1951, Jan. 2008.

MATSUMURA, A. et al. E.HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells. **Int J Oncol**. v. 42, n. 2, p. 535-42, Feb. 2013.

- MCFALL, M.R.; IRVINE, G.H.; EVESON, J.W. Adenoid cystic carcinoma of the sublingual salivary gland in a 16-year-old female--report of a case and review of the literature. **J Laryngol Otol.** v. 111, n. 5, p. 485-8, May. 1997.
- MEDEMA, R.H. et al. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. **Nature.** v. 404, n. 6779, p. 782-787, Apr. 2000.
- MENDENHALL, W.M. et al. Salivary gland pleomorphic adenoma. **Am J Clin Oncol.** v. 31, n. 1, p. 95-99, Feb. 2008.
- MIZUNO, S.; NAKAMURA, T. HGF-MET Cascade, a Key Target for Inhibiting Cancer Metastasis: The Impact of NK4 Discovery on Cancer Biology and Therapeutics. **Int J Mol Sci.** v. 14, n. 1, p.888-919, Jan. 2013.
- MOLINOLO, A. A. et al. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. **Clin Cancer Res.** v. 13, n. 17, p. 4964-4973, Sep. 2007.
- MOORE, A. E. et al. HGF/Met signalling promotes PGE(2) biogenesis via regulation of COX-2 and 15-PGDH expression in colorectal cancer cells. Paraskeva C. **Carcinogenesis.** v. 30, n. 10, p. 1796-1804, Oct. 2009.
- MOUKARBEL, R.V. et al. Adenoid cystic carcinoma of the larynx: a 40-year experience. **Head Neck.** v. 30, n. 7, p. 919-924, July 2008.
- MUNTEANU, M.C. et al. Acinic cell carcinoma of the salivary glands: a retrospective clinicopathologic study of 12 cases. **Rom J Morphol Embryol.** v. 53, n. 2, p. 313-20, 2012.
- MURUGAN, A.K. et al. Genetic deregulation of the PIK3CA oncogene in oral cancer. **Cancer Lett.** v. 338, n. 2, p. 193-203, Sep. 2013.
- NAKAMURA, T.; NAWA, K.; ICHIHARA, A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 122, n. 3, p.1450-1459, Aug. 1984.

NANCE, M. A. et al. Treatment and survival outcomes based on histologic grading in patients with head and neck mucoepidermoid carcinoma. **Cancer**. v. 113, n. 8, p. 2082-2089, Oct. 2008.

NAPIER, S.S.; HERRON, B.T.; HERRON, B.M. Acinic cell carcinoma in Northern Ireland: a 10-year review. **Br J Oral Maxillofac Surg**. v. 33, n.3, p. 145-148, June 1995.

NASCIMENTO AG, et al. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a clinicopathologic study of 46 cases. **Head Neck Surg**. v. 8, n. 6, p. 409-17, Jul-Aug.1986.

NAVAB, R. et al. Co-overexpression of Met and hepatocyte growth factor promotes systemic metastasis in NCI-H460 non-small cell lung carcinoma cells. **Neoplasia**. v. 11, n. 12, p. 1292-300, Dec. 2009.

NESKEY, D.M. et al. Prognostic factors associated with decreased survival in patients with acinic cell carcinoma. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg**. v. 139, n.11, p. 1195-1202, 2013.

NGUYEN, L.H. et al. HER2/neu and Ki-67 as prognostic indicators in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. **J Otolaryngol**. v. 32, n. 5, p. 328-31, Oct. 2003.

NICHOLSON, K.M.; ANDERSON, N.G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cell Signal**. v. 14, n. 5, p. 381-95, May. 2002.

NORBERG-SPAACK, L.; DARDICK, I.; LEDIN, T. Adenoid cystic carcinoma: use of cell proliferation, BCL-2 expression, histologic grade, and clinical stage as predictors of clinical outcome. **Head Neck**. v. 22, n. 5, p. 489-497, Aug. 2000.

NORDGÅRD, S. et al. Ki-67 as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma assessed with the monoclonal antibody MIB1 in paraffin sections. **Laryngoscope**. v. 107, n. 4, p. 531-6, Apr.1997.

OLSEN KD, LEWIS JE. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a clinicopathologic review. **Head Neck**. v. 23, n. 9, p. 705-12, Sep. 2001.

ORVIDAS, L.J. et al. Pediatric parotid masses. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. v. 126, n. 2, p.177-84, Feb. 2000.

OTOH, E. C. et al. Salivary gland neoplasms in Maiduguri, north-eastern Nigeria. **Oral Dis.** v. 11, n.6, p. 386-91, Nov. 2005.

Ozasa, H. et al. Significance of c-MET Overexpression in Cytotoxic Anticancer Drug Resistant Small Cell Lung Cancer Cells. **Cancer Sci.** v. 350, n. 21, p. 2129-2139, Nov. 2005.

PESCHARD, P.; PARK, M. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. **Oncogene.** v. 26, n.9, p.1276-1285, Feb. 2007.

PIRES, F.R. et al. Estrogen receptor expression in salivary gland mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma. **Pathol Oncol Res.** v. 10, n. 3, p. 166-8, 2004.

PIRES, F.R. et al. Intra-oral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 546 cases. **Oral Oncol.** v. 43, n. 5, p. 463-70, May. 2007.

PIRKER, R.; POPPER, H. H. **New concepts in pulmonary oncology.** European Respiratory Monograph, Sheffield, v. 39, p.63–84, 2007. Disponível em: < <http://www.ers-education.org/publications/ers-monograph/archive/pathology-of-the-lung.aspx> >. Acesso em: 22 jun 2014.

PONZETTO, C. et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. **Cell.** v. 77, n. 2, p. 261-71, Apr. 1994.

QING, J. et al. Prognostic analysis of adenoid cystic carcinoma of major salivary glands of 64 cases. **Ai Zheng.** v. 25, n.9, p. 1138-43, Sep. 2006.

RABENHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHMITT, F.C.L . Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Rev. bras. cancerol,** v. 40, n.3, p. 141-147, July 1994.

RAPIDIS, A. D. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. **Oral Oncol.** v. 41, n. 3, p. 328-335, Mar. 2005.

RAPIDIS, A.D. et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. **Oral Oncol.** v. 43, n. 2, p. 130-136, 2007.

RIVERA-BASTIDAS, H.; OCANTO, R.A.; ACEVEDO, A.M. Intraoral minor salivary gland tumors: a retrospective study of 62 cases in a Venezuelan population. **J Oral Pathol Med.** v. 25, n. 1, p. 1-4, Jan. 1996.

RODRÍGUEZ TOJO, M.J. et al. Immunoexpression of p53, Ki-67 and E-cadherin in basaloid squamous cell carcinoma of the larynx. **Clin Transl Oncol.** v. 7, n. 3, p. 110-4, Apr. 2005.

RUGGERI, R.M. et al. The tyrosine kinase receptor c-met, its cognate ligand HGF and the tyrosine kinase receptor trasducers STAT3, PI3K and RHO in thyroid nodules associated with Hashimoto's thyroiditis: an immunohistochemical characterization. **Eur J Histochem.** v. 54, n. 2, p. 24, June 2010.

RUGGERI, R. M. et al. HGF/C-MET system pathways in benign and malignant histotypes of thyroid nodules: an immunohistochemical characterization. **Histol Histopathol.** v. 27, n. 1, p.113-21, Jan. 2012.

Sachs, M. et al. Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. **Cell Biol.** v. 150, n. 6, p. 1375-1384, Sep. 2000.

SAGHRAVANI, N.; GHAZI, N.; SABA, M. Clinicopathologic evaluation of salivary gland neoplasms: a 38-year retrospective study in Iran. **Ann Diagn Pathol.** v. 17, n.6, p. 522-525, 2013.

SAITO, K.; MACHI, K.; TACHIKAWA, A. Acinic cell carcinoma in salivary gland of the palate. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v. 18, n.3, p.168-169, June 1989.

SAMAMÉ PÉREZ-VARGAS, J.C. ET AL. Role of cMET in the development and progression of colorectal cancer. **Int J Mol Sci.** v.14, n. 9, p.18056-18077, Sep. 2013.

SCAGLIOTTI, G.V.; NOVELLO, S.; VON PAWEL, J. The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology. **Cancer Treat Rev.** v. 39, n. 7, p.793-780, Nov. 2013.

SCHLÜTER, C. et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **J Cell Biol.** v. 123, n. 3, p. 513-22, Nov. 1993.

SCHMIDT, C. et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. **Nature.** v. 23, n. 373, p. 699 – 702, Feb. 1995.

SEETHALA, R.R. et al. Adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation: a report of 11 cases and a review of the literature. **Am J Surg Pathol.** v. 31, n.11, p. 1683-1694, Nov.2007.

SEIFERT G, DONATH K. Classification of the pathohistology of diseases of the salivary glands - review of 2,600 cases in the Salivary Gland Register. **Beitr Pathol.** v. 159, n. 1, p. 1-32, Oct. 1976.

SEIWERT, T. et al. Phase II trial of single-agent foretinib (GSK1363089) in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Invest New Drugs.** v.31, n.2, p. 417-24, Apr. 2013.

SHOJAEI, F. et al. HGF/c-Met pathway is one of the mediators of sunitinib-induced tumor cell type-dependent metastasis. **Cancer Lett.** v. 320, n. 1, p. 48-55, July 2012.

SILVA, S.D. et al. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. **Oral Oncol.** v. 40, n.7, p. 688-96, Aug. 2004.

SKALOVA, A. et al. Analysis of collagen isotypes in crystalloid structures of salivary gland tumors. **Hum. Pathol.** v. 23, n. 7, p.748-54, July 1992.

SKALOVA, A. et al. Cell proliferation correlates with prognosis in acinic cell carcinomas of salivary gland origin. Immunohistochemical study of 30 cases using the MIB 1 antibody in formalin-fixed paraffin sections. **J Pathol.** v. 173, n. 1, p. 13-21, May. 1994.

SKÁLOVÁ, A.; LEIVO, I. Cell proliferation in salivary gland tumors. **Gen Diagn Pathol.** v.142, n. 1, p. 7-16, June 1996.

SNIETURA, M. et al. PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. **PLoS One.** v. 7, n.3, p.33396, 2012.

SOBRAL, A.P. et al. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **J Oral Sci.** v. 52, n. 1, p. 49-54, Mar. 2010.

SONG, M. et al Study of the differentially expressed genes in pleomorphic adenoma using cDNA microarrays. **Pathol Oncol Res.** v. 17, n.3 p. 765-769, Sep. 2011.

SPIRO, R.H. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. **Head Neck Surg.** v. 8, n.3, p. 177-184, Jan-Feb. 1986.

STARBORG, M. et al. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. **J Cell Sci.** v. 109 , p.143-153, Jan. 1996.

SUN, Z.J. et al. Activation of PI3K/Akt/IKK-alpha/NF-kappaB signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma: its inhibition by quercetin. **Apoptosis.** v. 15, n. 7, p. 850-863, July 2010.

SUZUKI, K.; CHENG, J.; WATANABE Y. Hepatocyte growth factor and c-Met (HGF/c-Met) in adenoid cystic carcinoma of the human salivary gland. **J Oral Pathol Med.** v. 32, n. 2, p. 84-89, Feb. 2003.

TADBIR, A. A. et al. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 13, n.10, p. 5155-5159, 2012.

TAKAHAMA, A. Jr. et al. Giant pleomorphic adenoma of the parotid gland. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v. 13, n. 1, p.58-60, Jan. 2008.

TANG, Q. L. et al. Expression of Cyr61 in primary salivary adenoid cystic carcinoma and its relation to Ki-67 and prognosis. **Oral Oncol.** v. 47, n. 5, p. 365-70, May. 2011.

TARAKJI, B. et al Extensive review in the detection of the malignant transformation of pleomorphic adenoma. **Gulf J Oncolog.** v. 1, n. 13, p. 67-82, Jan. 2013.

TESTA, J.R.; BELLACOSA, A. AKT plays a central role in tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 98, n. 20, p.10983-10985, Sep. 2001.

THANT, A.A. et. al. Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells. **Clin Exp Metastasis**. v. 18, n. 5, p. 423-8, 2000.

TOIDA, M. et al. Intraoral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 82 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v. 34, n. 5, p. 528-32, July 2005.

TOIYAMA, Y. et al. Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer. **Int J Cancer**. v. 130, n.12, p. 2912-2921, June 2012.

TRETIAKOVA, M. et al. MET and phosphorylated MET as potential biomarkers in lung cancer. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**. v. 30, n. 4, p.341-54, 2011.

TRANTAFILLIDOU, K. et al. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. **Oral Dis**. v.12, n. 4, p 364-370, July 2006.

TRANTAFILLIDOU, K. et al. Acinic cell carcinoma of minor salivary glands: a clinical and immunohistochemical study. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 68, n.10, p.2489-2496, Oct. 2010.

TRUSOLINO, L.; COMOGLIO, P.M. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. **Nat Rev Cancer**. Apr. 2002, v. 2, n.4, p.289-300.

TSUKINOKI, K. et al. Association of hepatocyte growth factor expression with salivary gland tumor differentiation. **Pathol Int**. v. 53, n. 12 p. 815-822, Dec. 2003.

UEHARA, Y. et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. **Nature**. v. 23, n. 373, p.702-705, Feb.1995.

VACCHI-SUZZI, M. et al. Ki-67 proliferation rate as a prognostic marker in major salivary gland carcinomas. **Ann Otol Rhinol Laryngol**. v. 119, n. 10, p. 677-683, Oct. 2010.

- VAN DER WAL, J.E. et al. Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up. **Head Neck**. v. 24, n.8, p.779-83, Aug. 2002.
- VARGAS, P.A. et al. Expression of Mcm-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours. **J Oral Pathol Med**. v.37, n.5, p.309-318, May. 2008.
- VARGAS, P. A. et al. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**. v.57, n. 6, p. 271-276, Nov-Dec. 2002.
- VARGAS, P.A. et al. Expression of PLUNC family members in benign and malignant salivary gland tumours. **Oral Dis**. v. 14, n.7, p. 613-619, Oct. 2008..
- VÉDRINE, P.O. et al. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in the pediatric age group: 18 clinical cases, including 11 second malignant neoplasms. **Head Neck**. v. 28, n. 9, p. 827-833, Sep. 2006.
- VEGARI, S. et al. Pleomorphic adenoma of the cervical heterotopic salivary gland: a case report. **Case Rep Otolaryngol**. v. 2012, p. 1 -3, Oct. 2012.
- VELICKOVIĆ, L.J. et al. Stromal reaction and prognosis in acinic cell carcinoma of the salivary gland. **Vojnosanit Pregl**. v. 70, n.12, p. 1155-1158, Dec. 2013.
- VERHEIJEN, R. et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. **J Cell Sci**. v. 92, n. 1, p.123-30, Jan.1989.
- VERHEIJEN, R. et al Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. **J Cell Sci**. v. 92 n. 4, p. 531-540, Apr. 1989.
- VÖLKER, H.U. et al Expression of p-AKT characterizes adenoid cystic carcinomas of head and neck with a higher risk for tumor relapses. **Diagn Pathol**. v. 19 n. 4, p.18, June 2009.
- WANG, Y.L. et al. Predictive index for lymph node management of major salivary gland cancer. **Laryngoscope**. v. 122, n. 7, p. 1497-1506, July 2012.

WEBB, A.J.; EVESON, J.W. Pleomorphic adenomas of the major salivary glands: a study of the capsular form in relation to surgical management. **Clin Otolaryngol Allied Sci.** v. 26, n. 2, p.134-142, Apr. 2001.

WEIDNER, K.M. et al. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. **Nature.** v. 14, n. 384, p. 173-176, Nov. 1996.

WORLEY, N.K.; DAROCA, P.J. JR. Lymphoepithelial carcinoma of the minor salivary gland. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** v. 123, n.6, p. 638-640, June 1997.

XIN, W.; PAULINO, A.F. Prognostic factors in malignant mixed tumors of the salivary gland: correlation of immunohistochemical markers with histologic classification. **Ann Diagn Pathol.** v. 6, n. 4, p. 205-210, Aug. 2002.

YURUT-CALOGLU, V. et. al. Lung, bone, skeletal muscles and cutaneous metastases from adenoid cystic carcinoma of the parotid gland: a case report and review of the literature. **Med Oncol.** v. 24, n. 4, p. 458-462, 2007.

ZHANG, N.N. et al. Functional regeneration of irradiated salivary glands with human amniotic epithelial cells transplantation. **Int J Clin Exp Pathol.** v. 6, n. 10, p. 2039-2047, Sep. 2013.

ANEXO I

Aprovação do Comitê de Ética

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO HGF (FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITOS)/c-MET EM NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Pesquisador: Manoela Domingues Martins

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 11739012.1.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 201.848

Data da Relatoria: 20/02/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto de doutorado intitulado Avaliação da Via de Sinalização HGF (Fator de Crescimento de Hepatócitos)/c-MET em Neoplasias Benignas e Malignas de Glândulas Salivares é um estudo observacional analítico que pretende estudar vários componentes da via de sinalização HGF/c-MET em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares correlacionando esses resultados com os dados clínicos e histopatológicos dos tumores. Serão selecionados prontuários médicos de pacientes com adenoma pleomórfico, tumor de Warthin, carcinoma adenóide cístico, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma de células acinares diagnosticados no período de Janeiro de 1994 a dezembro de 2010 no Serviço de Patologia do HCPA.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Estudar a via de sinalização HGF/c-MET em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

Objetivos Específicos

- Avaliar individualmente a imunomarcagem de HGF, do receptor de HGF/c-MET, do c-MET

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

fosforilado, da AKT fosforilada (mTor) e da caspase-9 em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

- Avaliar se há relação entre a imunomarcação das proteínas celulares envolvidas na via de sinalização HGF/c-MET (HGF, receptor de HGF/c-MET, c-MET fosforilado, AKT fosforilada e caspase-9) entre si nas neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

- Verificar se há correlação entre a imunomarcação das proteínas celulares envolvidas na via de sinalização HGF/c-MET (HGF, receptor de HGF/c-MET, c-MET fosforilado, AKT fosforilada e caspase-9) com a graduação histológica dos casos de neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

- Verificar se há correlação entre a imunomarcação das proteínas celulares envolvidas na via de sinalização HGF/c-MET (HGF, receptor de HGF/c-MET, c-MET fosforilado, AKT fosforilada e caspase-9) com a evolução dos casos de neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não haverá riscos aos pacientes, pois as amostras incluídas no estudo serão provenientes de materiais clínicos existentes no Serviço de Patologia do HCPA.

Benefícios: A realização deste estudo não trará benefício direto aos pacientes, pois os pacientes já foram tratados. O possível benefício indireto poderá ser um maior conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no aparecimento dos fenótipos estudados, o qual poderá permitir a compreensão do desenvolvimento neoplásico e de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As proteínas da via de sinalização HGF/c-MET têm sido consideradas como um possível alvo terapêutico promissor para as neoplasias, uma vez que a ligação HGF/c-MET desempenha papel importante na formação, progressão, e disseminação de vários tipos de neoplasias malignas epiteliais. Entretanto, a expressão de HGF/c-MET e de membros de suas vias de sinalização foi pouco estudada em neoplasias de glândulas salivares. Por isso o projeto possui relevância para a área estudada porque através dele novas informações sobre as neoplasias das glândulas salivares poderão ser descobertas e utilizadas para o diagnóstico correto bem como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Fundamentação teórica atualizada, justificativa compatível com a hipótese proposta, objetivos e metodologia de análise concordantes com o estudo. Apresenta o termo de compromisso para utilização de material biológico e informações associadas, a análise estatística, o cronograma, o orçamento e o termo de concordância em participação no estudo de uma das instituições co-participantes.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (513)359-7640 Fax: (513)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências a corrigir:

- incluir mês e ano no Cronograma do projeto, assim como foi feito nas informações incluídas na Plataforma Brasil;

PENDÊNCIA ATENDIDA. Foi encaminhada a nova versão do projeto com a alteração descrita acima.

- revisar Lista de Referências Bibliográficas do projeto porque algumas não possuem o ano de publicação;

PENDÊNCIA ATENDIDA. Foi encaminhada a nova versão do projeto com as alterações descrita acima.

- incluir termo de concordância em participação no estudo da instituição co-participante Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (Projeto versão 11/02/2013) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deverá ser cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras. O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica. Qualquer alteração nestes documentos deve ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

ANEXO II

Aprovação da COMPEsq Odontologia

alexhaas@gmail.com por cpd.ufrgs.br
para mim

30/03/13

Prezado Pesquisador MANOELA DOMINGUES MARTINS, Informamos que o projeto de pesquisa **AValiação DA VIA DE SINALIZAÇÃO HGF (FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITOS)/C-MET EM NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE GLÂNDULAS SALIVARES** encaminhado para análise em 06/03/2013 foi **aprovado** pela Comissão de Pesquisa de Odontologia **com** o seguinte parecer: A via de sinalização HGF/c-MET possui múltiplas ações biológicas e tem sido identificada como uma via importante na regulação da proliferação, invasão e sobrevivência de células neoplásicas malignas. Estratégias terapêuticas que tem como alvo esta via tem mostrado resultado promissor em algumas neoplasias epiteliais. Poucos estudos foram realizados pesquisando as proteínas desta via em neoplasias de glândulas salivares e correlacionando **com** o comportamento clínico das lesões, bem como, avaliando simultaneamente seus componentes. Desta forma, o objetivo desse estudo observacional analítico é **avaliar** a via de sinalização HGF/c-MET pela imunomarcagem de HGF, do receptor de HGF/c-MET, do c-MET fosforilado, da AKT fosforilada (mTor) e da caspase-9 em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares e correlacioná-los **com** aspectos clínicos, morfológicos e prognósticos. Serão selecionados prontuários médicos de pacientes **com** adenoma pleomórfico (n=100), tumor de Warthin (n=20), carcinoma adenóide cístico (n=17), carcinoma mucoepidermóide (n=22) e carcinoma de células acinares (n=6) diagnosticados no período de Janeiro de 1994 a dezembro de 2010 no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Também serão incluídos 10 casos de glândulas salivares normais adultas sem alteração constituindo o grupo controle. Os prontuários serão avaliados manualmente e serão coletadas informações quanto aos dados demográficos, características clínicas e histopatológicas, bem como o tratamento e acompanhamento dos pacientes. As características clínicas a serem observadas ~~serão a localização da lesão, lesão~~ ~~fundamental principal,~~ presença de sintomatologia dolorosa e o estadiamento clínico TNM. Informações sobre o tratamento, história de recidiva e evolução também serão coletadas. As lâminas de cada caso coradas em H&E serão revisadas por dois patologistas experientes calibrados e classificadas de acordo **com** a OMS. Áreas tumorais representativas serão selecionadas e marcadas nas lâminas coradas por H & E. Serão construídos arranjos em matriz de amostras teciduais, ou tissue microarray (TMA) utilizando um array de tecido manual. Três cilindros de tecido **com** um diâmetro de 2 mm serão retirados de cada bloco de tecido original (doador) e depois serão colocadas sequencialmente em um bloco de parafina receptor. Cortes histológicos dos TMAs serão submetidos a técnica imunohistoquímica para detecção das proteínas HGF, receptor de HGF/c-MET, c-MET fosforilado, Akt fosforilada e caspase 9. Os cortes imunomarcados **com** cada anticorpo serão submetidos à análise quantitativa utilizando o escaner da Aperio e softwares para fazer contagem de reações imunohistoquímicas em TMAs, este instrumento foi projetado para criar slides virtuais a partir de lâminas de microscópio de vidro convencionais, a varredura da lâmina de microscópio ocorre em 20X, 40X ou 63X (**com** lente de imersão em óleo) e também possui produção de um ficheiro digital **com** uma resolução de 0,5, 0,25, 0,17 micron / pixel. Será realizada inicialmente uma análise descritiva para as variáveis consideradas, calculando-se média, desvio padrão, máximo, mínimo e mediana para as variáveis quantitativas e freqüências e porcentagens para as variáveis qualitativas. O projeto encontra-se bem descrito e possui mérito científico. Atenciosamente, Comissão de Pesquisa de Odontologia