

Expresión de mucinas y moléculas relacionadas en los carcinomas mucoepidermoides de glándulas salivales: implicaciones diagnósticas y pronósticas

Blanca Noemí Luján

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Departament d'Anatomia Patològica,
Farmacologia i Microbiologia
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona**

**Expresión de mucinas y moléculas
relacionadas en los carcinomas
mucoepidermoides de glándulas salivales:
implicaciones diagnósticas y pronósticas**

Tesis doctoral

Blanca Noemí Luján

*A la memoria de mi madre,
a Alejandra, a mi padre, a mis hermanos,
y a mis profesores Lúcia y Antonio.*

**Departament d'Anatomia Patològica,
Farmacologia i Microbiologia
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona**

**Expresión de mucinas y moléculas
relacionadas en los carcinomas
mucoepidermoides de glándulas salivales:
implicaciones diagnósticas y pronósticas**

*Tesis presentada por
Blanca Noemí Luján*

*Para optar al grado de
Doctor en Medicina*

*Directores de Tesis
Dra. Llúcia Alòs Hernández
Prof. Dr. Antonio Cardesa García*

Barcelona 2011

AGRADECIMIENTOS

A la *Dra. Llúcia Alòs Hernández*, Profesora Asociada de Anatomía Patológica de la Universitat de Barcelona, Consultor del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona y Directora de esta tesis, por enseñarme la Anatomía Patológica desde todos sus ángulos, más ampliamente en el conocimiento científico, donde demuestra hoy su excelencia académica, y por transmitirme con sincero afecto la pasión y el tesón necesarios para llevar a cabo y culminar esta tesis.

Al Prof. *Dr. Antonio Cardesa García*, Profesor Emérito de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona, ex-Jefe de Servicio del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona y Director de esta tesis, por abrirme las puertas de mi segunda casa y brindarme la oportunidad de conocer y aprender, más profundamente, esta querida especialidad.

Al *Dr. Josep Ramírez Ruz*, Profesor Titular de Anatomía Patológica de la Universitat de Barcelona y Jefe del Servicio del Departamento de Anatomía Patológica, por sus buenos consejos en el momento justo, cuanto más se necesita.

Al Dr. Josep Antoni Bombí Latorre, Profesor Catedrático de Anatomía Patológica de la Universitat de Barcelona, Consultor Senior de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona, por su reconocimiento y sus consejos que han aportado una enorme riqueza en mi desarrollo profesional.

Al Dr. Pedro Luis Fernández, Profesor Titular de Anatomía Patológica de la Universitat de Barcelona, Consultor Senior de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona, por su apoyo y valoración.

Al Dr. Elías Campo Güerri, Profesor Catedrático de Anatomía Patológica de la Universitat de Barcelona, Director Clínico del Centro de Diagnóstico Biomédico del Hospital Clínic de Barcelona, Jefe de Sección de Hematopatología del Hospital Clínic de Barcelona y ex-jefe del Servicio del Departamento de Anatomía Patológica, por integrarme en el distinguido equipo de profesionales que preside, contribuyendo con todos los partícipes de esta tesis al óptimo desarrollo de la misma.

A todos los *Patólogos, Médicos Residentes, Biólogos, Técnicos y Secretarios* del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic, *Dra. Mireia Castillo, Dr. Alfons Nadal, Susana Moyano, Alexandra Valera, Alba Díaz, Sofía Hakim, Elena Gonzalvo, Margarita Mainar, Gemma Laguna y Teresa Roch*; al *Dr. Miguel Caballero* del Servicio

de Otorrinolaringología del Hospital Clinic; a la *Dra. Marta Carreras* del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Bellvitge y a la *Dra. Carme De Bolós*, de la Unidad de Biología Celular y Molecular del IMIM, que han contribuido a la realización de los trabajos que forman parte de esta tesis.

A mi querida *madre* eternamente, por su gran amor y sacrificio, infinita preocupación y depósito de fe en mí, ya que ha hecho posible que llegara a donde estoy.

A mi *padre*, a mis *hermanos*, y a *Alejandra Lezcano*, *Joan Playà* y *Juan Loustau* por su incondicional apoyo y ayuda en todos los momentos de esta vida.

A mi hermano *Luis* por su invaluable trabajo de diseño gráfico realizado en esta tesis y por su sentido de la estética y del arte que ayudan a mi analítica persona a expresarse con un estilo más elegante.

A mis queridas *Alejandra*, las “*More*” y a *Oscar García Ortega* por su estímulo permanente y por hacer más amenos los intervalos durante la confección de esta tesis y por siempre.

A mis *compañeros* de Medicina Nuclear del Hospital Joan XXIII de Tarragona por su interés y estímulo para la finalización de esta tesis.

Índice

Abreviaturas	1
I - Introducción	5
1 - Las glándulas salivales. Características generales	7
1.1. Aspectos funcionales y anatómicos	7
1.2. Histología de las glándulas salivales	10
1.3. Los tumores de glándulas salivales. Epidemiología y tipos histológicos	12
2 - El carcinoma mucoepidermoide de glándula salival	17
2.1. Datos epidemiológicos	17
2.2. Características clínicas	18
2.3. Histogénesis, morfología y citogenética	18
2.4. Los grados histológicos	20
2.5. Pronóstico y tratamiento	25
3 - Las mucinas epiteliales. Expresión en tejidos normales y en procesos neoplásicos	27
3.1. Las vacunas terapéuticas contra MUC1	30
4 - El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las vías de transducción de la señal mitogénica	32
4.1. Los tratamientos oncológicos dirigidos contra dianas terapéuticas	35

II - Hipótesis de trabajo	39
III – Objetivos	45
IV - Estudios realizados. Material y métodos. Resultados.	49
Estudio N° 1	51
Estudio N° 2	78
V - Discusión	93
Discusión Estudio N° 1	95
Discusión Estudio N° 2	107
VI - Conclusiones	115
VII - Bibliografía	121

Abreviaturas

AFIP: Armed Forces Institute of Pathology.

ANOVA: (del inglés *Análisis Of VAriance*).

CISH: Hibridación in situ cromogénica (del inglés *Chromogenic In Situ Hybridization*).

CME: Carcinoma mucoepidermoide.

ERK 1/2: Serina/treonina quinasas (del inglés *extracellular-regulated kinases 1 y 2*), perteneciente a la familia MAPKs.

FISH: Hibridación in situ fluorescente (del inglés *Fluorescent In Situ Hybridization*).

H-Ras: Gen H-Ras, oncogen producto de la mutación de la familia del protooncogén *RAS*.

K-RAS: Gen K-Ras, (del inglés *Kirsten rat sarcoma viral*) oncogen homologo a Ras, producto de la mutación de la familia del protooncogén *RAS*.

MAML2: Gen traslocado (del inglés *mastermind-like gene family*) en la región 11q21.

MAPKs: proteínas quinasas monoméricas activadas por mitógenos (del inglés *mitogen-activated protein kinases*).

MEC: Mucoepidermoid carcinoma.

MECTL-1: Gen traslocado en la región 19p13, en los carcinomas mucoepidermoides (del inglés *mucoepidermoid carcinoma translocated gene-1*).

MEK: Quinasa que fosforila y activa MAPK (del inglés *Mitogen-activated Protein/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase*).

MIB-1: Marcador inmunohistoquímico del índice proliferativo (Ki-67) (del inglés *Mitotic Index*).

MG1: Glicoproteína 1 (del inglés *Mucous Glycoprotein 1*), mucina de alto peso molecular: MUC5B.

MG2: Glicoproteína 2 (del inglés *Mucous Glycoprotein 2*), mucina de alto peso molecular: MUC7.

MUC: Mucina. MUC1, MUC3, MUC4, MUC11 y MUC12 glucoproteínas de membrana y MUC2, MUC5B, MUC5AC, MUC6 y MUC7 glucoproteínas secretoras.

PAS: Ácido periódico de Schiff (del inglés *Periodic Acid Schiff*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*).

Raf: Serina/treonina quinasa.

Ras: Proteína G monomérica periférica (del inglés *rats sarcoma*), con función GTPasa, con unión covalente a la superficie interna de la membrana plasmática. Ras-GDP: Ras unida a GDP (del inglés *GDP guanosine diphosphate*), forma inactiva y Ras-GTP: Ras unida a GTP (del inglés *GTP guanosine triphosphate*), forma activa.

I

Introducción

1 - Las glándulas salivales. Características generales

1.1. Aspectos funcionales y anatómicos

Las glándulas anexas a la cavidad bucal son las glándulas salivales propiamente dichas, que según su tamaño, se diferencian en glándulas salivales menores y glándulas salivales mayores. La función principal de las mismas es secretar saliva, con el fin de preparar el bolo alimentario al ser estimuladas específicamente (glándulas salivales mayores), además de lubricar las partes duras de la boca y mucosas del tracto aerodigestivo superior, y controlar la flora bacteriana de estas cavidades de forma permanente (glándulas salivales menores) (Gésime et al. 2009, Martínez-Madrigal et al. 1997).

Las *glándulas salivales menores* se distribuyen, de forma no uniforme, por todo el tracto aerodigestivo superior: *cavidad oral* (*paladar* excepto la región anterior del paladar duro, cara posterior de los *labios*, *mejillas*, encía únicamente en el *trígono retromolar*, *pilares amigdalinos*, *suelo de la boca y lengua*) (Ellis y Auclair 1996), *cavidad nasal*, *senos paranasales*, *farínge*, *adyacentes a la amígdala faríngea* (Ellis y Auclair 1996, Martínez-Madrigal et al. 2007), *laringe y bronquios* (Martínez-Madrigal et al. 1997).

Las *glándulas salivales mayores* se disponen en la boca siguiendo una curva concéntrica paramandibular y bilateral. Las glándulas salivales mayores son tres, en sentido posteroanterior y volumen decreciente,

la *parótida*, la *submandibular o submaxilar*, y la *sublingual*, alojadas en sus respectivas celdas. (Rouvière-Delmas 2005).

La *glándula parótida* se localiza en la celda parotídea, revestida por la aponeurosis parotídea, un desdoblamiento de la aponeurosis cervical superficial. La glándula se divide desde su espesor longitudinalmente y hacia adelante en dos lóbulos, uno profundo y otro superficial, con una prolongación anterior para-maseterina por donde sale el conducto excretor de la glándula, el conducto de Stenon, que cruza por delante a este músculo en dirección a la mucosa yugal. Entre ambos lóbulos pasan la arteria carótida externa, vena yugular externa, nervio facial, vasos linfáticos y ganglios intraparotídeos internos. Está irrigada por la arteria auricular posterior y por la arteria temporal superficial. La vena yugular externa recibe el drenaje venoso parotídeo. Los vasos linfáticos aferentes drenan a la cadena yugular externa del cuello y a los ganglios cervicales profundos (Testut-Latarjet 1995).

La *glándula sublingual* se sitúa en la celda sublingual, limitada hacia arriba por la mucosa del surco alveololingual, el conducto de Warthon y carúncula sublingual, hacia abajo por el músculo milohioideo. Se extiende, a ambos lados, desde la mandíbula (anterior y lateral) y ganglios linfáticos linguales y sublinguales, hasta la raíz de la lengua, nervio lingual, hipogloso mayor y vasos sulinguales. El extremo posterior se comunica con la celda submaxilar (Rouvière-Delmas 2005). La glándula sublingual en su interior, posee un conducto excretor principal, el conducto de Bartholin, que desemboca en el

conducto de Warthon, a pocos milímetros antes de su desembocadura a la carúncula sublingual. Además, y a diferencia de la glándula parótida y submaxilar, presenta múltiples ductos excretores cortos individuales, los conductos de Rivinus, que se abren directamente en el suelo de la boca (Ellis y Auclair 1996). El drenaje venoso se efectúa hacia la vena lingual. La irrigación procede de ramas colaterales de la arteria lingual. Los vasos linfáticos drenan a los ganglios submaxilares y a los ganglios de la región cervical lateral profunda superior (Rouvière-Delmas 2005).

La *glándula submaxilar* se encuentra en la celda submaxilar, y su conducto excretor principal, el conducto de Wharton, transcurre hacia adelante junto con el nervio lingual y los vasos sublinguales, entre el borde superointerno de la glándula sublingual por abajo, y las terminales nerviosas del hipogloso mayor por arriba, para desembocar a cada lado del frenillo de la lengua en el ostium umbilical. La celda submaxilar consta de 2 caras formadas por un desdoblamiento de la aponeurosis cervical superficial. En la cara superoexterna ósea, se encuentra la fosita submaxilar mandibular, entre la línea de inserción del milohioideo por arriba y el borde libre de la mandíbula por abajo. El extremo anterior se abre al espacio sublingual, y el posteroinferior contacta con la celda parotídea, a través de un tabique fibroso intermaxiloparotídeo, y el posterosuperior se abre al espacio maxilofaríngeo de la región amigdalina, por donde pasa la arteria facial (Testut-Latarjet 1995, Ellis y Auclair 1996).

La irrigación arterial proviene de ramas colaterales de la arteria facial. El drenaje venoso se dirige hacia la vena facial. Y los vasos linfáticos drenan a los ganglios submaxilares y a los ganglios de la región cervical lateral profunda superior (Rouvière-Delmas 2005).

1.2. Histología de las glándulas salivales

Las glándulas salivales son glándulas exocrinas. Están compuestas por una parte secretora o adenómero y por una ductal excretora que conduce el producto de secreción a la superficie (Geneser 1988).

Se clasifican según el tipo de unidad funcional secretora o forma del adenómero. Existen tres clases de unidades secretoras, según el tipo de células secretora del acino: serosa, mucosa y mixta (células mucosas centrales y serosas periféricas) (Martínez-Madrigal et al. 2007).

Las terminales secretoras forman lobulillos agrupados en lóbulos, con un sistema ductal ramificado que transcurre por tabiques de tejido conectivo intralobulillar, que separa las unidades funcionales entre sí, e interlobulillar que los separa en lobulillos. Este tejido conectivo trabecular interlobulillar formará una cápsula fibrosa, únicamente en las glándulas salivales mayores. Los conductos excretores principales, se localizan fuera del tejido glandular.

El sistema ductal intralobulillar, ducto intercalar y ducto estriado, en dirección a la periferia del lobulillo, se considera secretor debido

a su actividad metabólica: regula la concentración de agua y electrolitos de producto de secreción acinar. El sistema ductal interlobulillar o excretor, aumenta progresivamente de diámetro para desembocar en el conducto principal terminal.

El acino está tapizado por células piramidales secretoras, con un núcleo basal y abundante citoplasma luminal claro en las células mucosas (mucinas ácidas: positivas para la tinción de azul alcian), granular en las células serosas (zimógenos basófilos: PAS positivos, PAS-díastasa resistente, y negativos para mucicarmín), o mucosas centrales con células serosas en su periferia, a modo de “semiluna”, según se trate de un acino mucoso, seroso o mixto, respectivamente. Al igual que en la periferia del acino, en ductos intercalares y en la unión de los estos con los ductos estriados, pueden encontrarse aisladamente, células mioepiteliales entre las células ductales y la membrana basal.

El epitelio de los conductos intercalares es cúbico simple rodeado de membrana basal, pudiendo encontrarse células sebáceas intercaladas aisladamente o en acúmulos formando una glándula sebácea. Entre las células cúbicas ductales y la membrana basal pueden encontrarse ocasionalmente, células mioepiteliales periféricas aplanadas con prolongaciones citoplasmáticas. El epitelio de los conductos estriados es columnar simple (células estriadas por múltiples por invaginaciones citoplasmáticas basales con abundantes mitocondrias) y eosinófilo. Los conductos excretores tienen epitelio columnar pseudoestratificado,

pequeñas células basales pluripotenciales a lo largo de la membrana basal y alguna célula tipo-mucosa caliciforme en los de pequeño calibre. En su porción más distal suele estar revestido por un epitelio plano estratificado (Ellis y Auclair 1996).

1.3. Los tumores de glándulas salivales. Epidemiología y tipos histológicos.

Los tumores de glándulas salivales, registran una incidencia anual de 0,4 a 13,5 casos por cada 100.000 habitantes en el mundo (Ellis y Auclair 2008). Estas neoplasias representan el 2-6,5% de los tumores de cabeza y cuello (Abiose et al. 1990, Leegaard et al. 1969, Spiro et al. 1986, Spiro et al. 1973, Kelude et al. 2001, Masanja et al. 2003). La incidencia anual de tumores malignos de glándulas salivales es de 0.4-2.6 casos por cada 100,000 habitantes (Koivunen et al. 2002, Ostman et al. 1997, Pinkston et al. 1999, Sun et al. 1999). Las neoplasias benignas y las malignas de glándulas salivales, según series largas documentadas, representan globalmente, entre un 54-79% y 21-46%, respectivamente, siendo relativamente más frecuentes los tumores malignos en glándulas salivales menores (50%) que en cada una de las glándulas mayores. El 90% de los tumores malignos de las glándulas salivales menores se originan en la lengua, suelo de boca y trígono retromolar. Los tumores malignos desarrollados en las

glándulas salivales mayores, muestran un porcentaje relativo mayor en la glándula sublingual, seguido por la submaxilar y por último la parótida. Sin embargo, la frecuencia de aparición de tumores epiteliales malignos es mayor en parótida, seguido por las glándulas salivales menores, glándula submaxilar y por último la glándula sublingual (Ellis y Auclair 2008).

El pico de edad de mayor incidencia de los tumores de glándulas salivales se encuentra entre los 50-70 años (Eveson et al. 1985, Auclair et al. 1991).

La neoplasia benigna más frecuente es el denominado adenoma pleomorfo o tumor mixto (Eveson et al. 1985, Seifert et al. 1986, Spiro et al. 1986, Eneroth et al. 1971, Auclair et al. 1991) siendo además el tumor más frecuente de glándulas salivales. La neoplasia maligna más frecuente es el carcinoma mucoepidermoide, tanto en adultos como en niños (Eneroth et al. 1971, Spiro 1986, Pires et al. 2004, Auclair et al. 1991).

En niños, los tumores malignos de glándulas salivales son poco comunes. Sin embargo, la proporción de neoplasias malignas es relativamente más alta que en los adultos (Pires et al. 2004).

Malignant epithelial tumours	
Acinic cell carcinoma	8550/3
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3
Adenoid cystic carcinoma	8200/3
Polymorphous low-grade adenocarcinoma	8525/3
Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3
Clear cell carcinoma, not otherwise specified	8310/3
Basal cell adenocarcinoma	8147/3
Sebaceous carcinoma	8410/3
Sebaceous lymphadenocarcinoma	8410/3
Cystadenocarcinoma	8440/3
Low grade cribriform cystadenocarcinoma	
Mucinous adenocarcinoma	8480/3
Oncocytic carcinoma	8290/3
Salivary duct carcinoma	8500/3
Adenocarcinoma, not otherwise specified	8140/3
Myoepithelial carcinoma	8982/3
Carcinoma ex pleomorphic adenoma	8941/1
Carcinosarcoma	8980/3
Metastasizing pleomorphic adenoma	8940/1
Squamous cell carcinoma	8070/3
Small cell carcinoma	8041/3
Large cell carcinoma	8012/3
Lymphoepithelial carcinoma	8082/3
Sialoblastoma	8974/1
Benign epithelial tumours	
Pleomorphic adenoma	8940/0
Myoepithelioma	8982/0
Basal cell adenoma	8147/0
Warthin tumour	8561/0
Oncocytoma	8290/0
Canalicular adenoma	8149/0
Sebaceous adenoma	8410/0
Lymphadenoma	
Sebaceous	8410/0
Non-sebaceous	8410/0
Ductal papillomas	
Inverted ductal papilloma	8503/0
Intraductal papilloma	8503/0
Sialadenoma papilliferum	8406/0
Cystadenoma	8440/0
Soft tissue tumours	
Haemangioma	9120/0
Haematolymphoid tumours	
Hodgkin lymphoma	
Diffuse large B-cell lymphoma	9680/3
Extranodal marginal zone B-cell lymphoma	9699/3
Secondary tumours	
Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) {821} and the Systematized Nomenclature of Medicine. Behaviour is coded /0 for benign tumours, /3 for malignant tumours, and /1 for borderline or uncertain behaviour.	

Figura 1: Clasificación de los tumores de glándula salival según la última edición editada por la OMS (WHO Classifications of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon, 2005).

2 - El carcinoma mucoepidermoide de glándula salival

2.1. Datos epidemiológicos

El carcinoma mucoepidermoide (CME), representa, en los adultos, menos del 10% de las neoplasias malignas de cabeza y cuello, y un 10-15% de las neoplasias de glándulas salivales. Tal como ya hemos indicado, es el tumor maligno más frecuente de glándulas salivales, sin distinción de edades, representando un 30% de los tumores malignos en los adultos (Cawson et al. 1997, Ellis y Auclair 1996, Speight et al. 2002, Locati et al. 2002) y un 33% en los niños (Pires et al. 2004, Callender et al. 1992, Kessler et al. 1994, Boahene et al. 2004, Ellies et al. 2006).

Se desarrollan con mayor frecuencia entre la tercera y la séptima década en los adultos (Ellis y Auclair 2008) y en el segundo decenio de la vida en los pacientes pediátricos (Loy et al. 1989, Ellis y Auclair 2008).

El CME tiene una mayor incidencia en mujeres (Melrose et al. 1973, Spiro et al. 1978, Olsen et al. 1981, Accetta et al. 1984, Evans et al. 1984, Eveson et al. 1985, Spiro 1986, Nascimento et al. 1986, Auclair et al. 1991).

El 50% de estos tumores se origina en las glándulas salivales mayores, con una frecuencia relativa del 80% en la parótida, 8-13% en la submaxilar y 2-4% en la sublingual (Brandwein et al. 2001).

El otro 50% en las glándulas salivales menores, con mayor frecuencia relativa en el paladar, seguido por el triángulo retromolar, suelo de la boca, mucosa oral, labio y lengua (Wedell et al. 1997, Brandwein et al. 2001).

2.2. Características clínicas

Las características clínicas de estos tumores, dependen si crecen hacia la superficie exterior o lo hacen hacia la cavidad oral. Los primeros asientan en la parótida y en la submaxilar, presentándose, la mayoría, como masa indolora de larga evolución, meses o años (Spiro RH et al. 1978, Accetta et al. 1984, Auclair et al.1991), pudiendo, los parotídeos llegar a manifestarse clínicamente con otorrea, trismus o incluso parálisis del facial ipsilateral. Lo contrario ocurre cuando asientan en el resto de las glándulas salivales, presentándose como tumoraciones en la cavidad oral, lisas, rojizas o violáceas, con aspecto inflamatorio o infeccioso (absceso) o fluctuantes, semejando una lesión benigna (mucocele), sensibles o dolorosas. Pueden acompañarse de parestesias, disfagia, ulceración e incluso hemorragia (Ellis y Auclair 2008).

2.3. Histogénesis, morfología y citogenética

El estudio de la histogénesis de este tumor, evidencia un origen a partir de células ductales estriadas transformadas, ya que el 100% de estos tumores son difusamente inmunorreactivos al anticuerpo antimitocondrial, en la células de la periferia de los nidos y quistes neoplásicos. Su positividad al microscopio óptico indica células

ricas en mitocondrias, similar a la de los ductos estriados normales. Lo mismo ocurre con el resto del perfil inmunohistoquímico: expresión de citoqueratina 7 en las células luminales y en las lesiones neoplásicas quísticas, y expresión de citoqueratina 14 principalmente en la periferia de los nidos y quistes neoplásicos o en células basales (Foschini et al. 2002). En la evaluación macroscópica, se muestran como una tumoración o masa, de uno a varios centímetros, firme, gris-amarillenta, lobulada, parcialmente encapsulada, sólida, quística o solidoquística, cuyo contenido viscoso mucoide, puede verse claro, sanguinolento o hemorrágico.

Histológicamente se compone, en general, por lagos de mucina de diferente tamaño y áreas sólidas celulares, formando ductos, cordones, láminas, nidos o simplemente aisladas, en un estroma fibroso usualmente abundante y en algunos casos hialinizado.

La mucina está contenida en espacios quísticos tapizados, por una capa o varias, incluso a veces con crecimiento papilar, de células secretoras de mucinas, columnares, caliciformes o aplanadas (PAS-diafasi, Mucicarmín y Azul Alcian positivas), y también por células intermedias, basaloides o epitelioides (Ellis y Auclair 2008). Si la mucina escapa directamente en el tejido intersticial se rodea de células inflamatorias (Rosai 1996).

El componente sólido está compuesto por células epidermoides (raramente queratinizadas o con presencia de perlas córneas en tumores inflamatorios), células intermedias, células basaloides, células

mucinosas y de forma variable células claras, que contienen mínima cantidad de sialomucina y glucógeno, siendo PAS-díastasa positivas (Ellis y Auclair 1998). Rara vez, contiene escasas células sebáceas y alguna oncocítica en tumores inflamatorios (Rosai 1996).

Estudios de citogenética han detectado una anomalía frecuente en los CMEs, que además es bastante específica. Se trata de la translocación t(11;19) (q21;p13). Como resultado de esta translocación se ha identificado un transcrito de fusión, debido a la unión del exon-1 de un gen con función desconocida, el gen MECTL-1 (del inglés, mucoepidermoid carcinoma translocated gene-1), en la región 19p13, con exones 2-5 del gen MAML2 (del inglés, mastermind-like gene family) en la región 11q21. Esta translocación está presente en el 38% de los CMEs, y es más frecuente en los tumores de bajo grado histológico (Okabe et al. 2006).

2.4. Los grados histológicos

Los CMEs se clasifican en bajo grado, grado intermedio y alto grado según las características histológicas de los tumores (**Figura 2**). El sistema de graduación propuesto por Auclair et al. en 1992, es la clasificación vigente en la última edición de la OMS (Eveson et al. 2005). Éste ha sido corroborado por dos estudios retrospectivos valorando un número significativo de casos, uno de los estudios incluyó 143 casos en glándulas salivales menores (Auclair et al. 1992) y el otro

estudio incluyó 234 casos en glándulas salivales mayores (Goode et al. 1998). En los CME de bajo grado de la glándula submaxilar, el sistema de graduación histológica no predice su comportamiento biológico, puesto que son más agresivos que los originados en el resto de las glándulas salivales (Goode et al. 1998).

Se trata de un sistema de puntuación con un valor asignado a cada una de las características histopatológicas, cuya suma determina el grado histológico. Se tienen en cuenta la proporción del componente quístico del tumor, la anaplasia, índice mitótico, necrosis e invasión de espacios perineurales. Brandwein et al. en 2001, han propuesto un sistema de graduación, que amplía las características histológicas de la antigua clasificación evitando una infragraduación. Para ello, han tenido en cuenta la invasión vascular y/o linfática, la invasión ósea y el patrón de infiltración en pequeños nidos, y además han modificado el porcentaje del componente intraquístico de menos de 20% a menos del 25%. Con este sistema de graduación se consigue mayores valor pronóstico y reproducibilidad.

La mayoría de los CME de bajo grado tienen numerosos espacios quísticos, con unos núcleos usualmente regulares, y rara vez, se encuentran mitosis. En los de grado intermedio, los espacios quísticos suelen ser menores y suelen ser tumores sólidos. Los CME de alto grado, en general son sólidos, pueden presentar anaplasia, y más de 4 mitosis por cada 10 campos de gran aumento; la necrosis y la invasión perineural son menos frecuentes.

CME GRADOS HISTOLÓGICOS			
PARÁMETROS	PUNTOS	PARÁMETROS	PUNTOS
COMPONENTE INTRAQUÍSTICO <20%	2	COMPONENTE INTRAQUÍSTICO <25%	2
		PEQUEÑOS NIDOS INFILTRANTES	2
ANAPLASIA	4	ANAPLASIA	2
MITOSIS >10 / HPF	3	MITOSIS >10 / HPF	3
NECROSIS	3	NECROSIS	3
INVASIÓN PERINEURAL	3	INVASIÓN PERINEURAL	3
		INVASIÓN VASCULAR y/o LINFÁTICA	3
		INVASIÓN ÓSEA	3
GRADO I	0-4	GRADO I	0
GRADO II	5-6	GRADO II	2-3
GRADO III	≥7	GRADO III	≥4
<i>Auclair et al. Cancer 69:2021-2030, 1992</i>		<i>Brandwein et al. Am J Surg Pathol 25:835-845, 2001</i>	

Figura 2: Graduación del CME, propuesta por Auclair et al. en el año 1992 y vigente en la última edición de la OMS (WHO Classifications of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon, 2005) y graduación propuesta por Brandwein et al. en 2001.

2.5. Pronóstico y tratamiento

Los CMEs de glándulas salivales, pueden presentar comportamientos biológicos diversos y por tanto conllevar pronósticos distintos para los pacientes, según el grado histológico de los tumores (Auclair et al. 1992, Brandwein et al. 2001, Goode et al. 1998). Los CMEs de bajo grado por lo general no recidivan, la mayoría de los pacientes se curan después de la cirugía, y la tasa de supervivencia a los 5 años es del 76-95%. Por el contrario, los CMEs de alto grado son neoplasias agresivas, que con frecuencia tienen un patrón de crecimiento infiltrante, recidivan e incluso metastatizan por vía linfática a los ganglios regionales de cabeza y cuello, y por vía sanguínea a pulmón, hígado, hueso y cerebro. La tasa de supervivencia de los CMEs de alto grado a los 5 años es del 30-50% (Goode et al. 1998, Nance et al. 2008). Los CMEs de grado histológico intermedio tienen un pronóstico variable entre los de bajo y alto grado. Cabe señalar la utilidad de la expresión inmunohistoquímica de Ki-67 (MIB-1), ya que un índice superior al 10% se correlaciona con un alto grado histológico, incremento de recidivas tumorales, metástasis y disminución de la supervivencia (Skalova et al. 1994, Zhu et al. 1999).

Las decisiones sobre el tratamiento de estas neoplasias actualmente se basan en los métodos de clasificación histológica. La resección quirúrgica es el tratamiento estándar para todos los grados del

CME. La radioterapia se recomienda en el CME de alto grado tras la extirpación quirúrgica amplia del tumor. La linfadenectomía y radioterapia externa adyuvante se indican cuando el tumor presenta metástasis a ganglios linfáticos regionales, de las cadenas cervicales. La quimioterapia está indicada en el tratamiento de la enfermedad metastásica, en el tratamiento paliativo en la enfermedad locorregional no susceptible de cirugía de rescate o de radioterapia (Agulnik y Siu 2004, Nance et al. 2008).

3 - Las mucinas epiteliales. Expresión en tejidos normales y en procesos neoplásicos

Las mucinas epiteliales (MUCs) son los principales componentes de la glicoproteína del moco y en condiciones normales juegan un papel protector en los tejidos epiteliales. Además, se ha propuesto también su participación en la renovación y diferenciación del epitelio, en la modulación de la adhesión celular, así como en la señalización celular (Braga et al. 1992, Hilkens et al. 1992, Komatsu et al. 2000, Singh et al. 2004). Desde el punto de vista molecular, todas las MUCs comparten una característica en común: están constituidas por un gran número de secuencias repetidas en grupo, que son diferentes en cada una de ellas (Gendler et al. 1995). Hasta el momento se han descrito casi una veintena de genes que codifican las MUCs, y algunos de ellos están bien caracterizados, como son MUC1 a MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC 7, MUC11 y MUC12. (Gendler et al. 1995, Moniaux et al. 2001). Las MUCs pueden clasificarse en dos principales familias: MUCs de membrana y MUCs secretoras. MUC1, MUC3, MUC4, MUC11 y MUC12 son MUCs de membrana (Moniaux et al. 2001). MUC2, MUC5AB, MUC5B, MUC6 y MUC7 son MUCs secretoras. La expresión de cada gen MUC es específica de los órganos, tejidos y tipos celulares. Además, se han reportado alteraciones cuantitativas y cualitativas en la estructura y en la expresión de las MUCs en lesiones neoplásicas. Estos cambios se han propuesto como marcadores

moleculares de transformación maligna en diversos órganos y tejidos. Además, su expresión se ha relacionado con el pronóstico de algunas neoplasias (Komatsu et al. 2000, McGuckin et al. 1995, Nakamori et al. 1994, Singh et al. 2004).

MUC1 es detectado en la mayoría de de los tejidos epiteliales (Ho et al. 1993). La sobreexpresión de MUC1 se observa en una variedad de cánceres, como son el carcinoma de mama, de páncreas y colorrectal (Ho et al. 1993, Monges et al 1999, Nakamori et al. 1994). La sobreexpresión y glicosilación aberrante que producen las células neoplásicas se ha relacionado con alteración en la polaridad de las células y pérdida de adhesión de las mismas, facilitando la invasión tumoral y las metástasis a distancia. Por tanto, la sobreexpresión de MUC1 se ha relacionado con una mayor agresividad tumoral en diversos carcinomas (Leroy et el. 2006, Yonezawa et al. 2008). Se ha demostrado en experimentos in vitro, que la unión de MUC1 a EGFR inhibe la degradación del EGFR, inhibiendo la ubiquitinación del mismo, reciclándose de esta forma a la membrana plasmática perpetuando la respuesta al ligando (Pochampalli et al. 2007).

Además, la mucina MUC1 actúa como un protooncogen que interactúa con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se correlaciona con la activación de MAPK en modelos animales (Schroeder et al. 2001). Se ha descubierto recientemente, en líneas celulares de cáncer de mama, un nuevo mecanismo de transformación celular resultante del desplazamiento y localización aberrante del EFGR,

atribuida a MUC1, con la función de regular a EGFR como cofactor transcripcional, con la expresión aberrante ciclina-D1. Este hecho conduce a una mayor proliferación celular e inestabilidad genética (Bitler et al. 2010), tanto en modelos in vivo como en modelos in vitro del carcinoma de mama (Aggarwal et al. 2007, Gillett et al. 1994).

MUC4 se expresa en varios tejidos, incluyendo la mucosa traqueobronquial, colon, estómago, cérvix y pulmón (Audie et al. 1993). La expresión anormal de MUC4 ha sido reportada en varios cánceres, como son el carcinoma pancreático, colónico, pulmonar y gástrico (Andrianifahanana et al. 2001, Copin et al. 2000, McGuckin et al. 1995, Ogata et al. 1992).

MUC2 es una MUC de tipo intestinal, y se expresa principalmente en las células caliciformes intestinales. Los carcinomas mucinosos de diferentes órganos, como son los de colon, mama, páncreas, ovario y estómago tienen alta expresión de MUC2 (Hanski et al. 1997, Lopez-Ferrer et al. 2000, Reis et al. 2000).

MUC5AC y MUC6 son MUCs secretoras de tipo gástrico. MUC5AC es detectada principalmente en la superficie epitelial y en las células del cuello de las glándulas mucosas, mientras que MUC6 se expresa en el fondo glandular (De Bolos et al. 1995). Además, MUC5AC se expresa en la mucosa traqueobronquial y MUC6 en la vesícula biliar, colon y endocérvix (Copin et al. 2000, De Bolos et al. 1995). En condiciones neoplásicas, ambos MUC5AB y MUC6 se expresan en un subgrupo de carcinomas gástricos (Lopez-Ferrer et al. 2000, Reis et al. 2000);

MUC5AC en carcinomas mucinosos de ovario (Giuntoli et al. 1998); y MUC6 en carcinomas ductales de la mama (De Bolos et al. 1998). MUC5B y MUC7 pueden ser detectados en diferentes tipos celulares del acino secretor de las glándulas salivales (Nielsen et al. 1996). Algunos carcinomas de pulmón expresan MUC5B (Yu et al. 1996), y la expresión aberrante de MUC7 ha sido observada en carcinomas uroteliales (Retz et al. 1998).

3.1. Las vacunas terapéuticas contra MUC1

La mucina MUC1 sobreexpresada por las células neoplásicas actúa como un antígeno en el organismo, ya que induce una reacción inmunitaria de tipo humoral y celular, favoreciendo la producción de anticuerpos anti-MUC1. Este hecho es la base para considerar MUC1 como diana terapéutica, mediante la elaboración de vacunas para estimular la inmunidad del paciente contra las células tumorales. Diversos estudios avalan la eficacia de este tratamiento en adenocarcinomas como el cáncer de mama (Von Mensdorff-Pouilly et al. 2000). MUC1 promueve a través de su acción sobre EFGR la expresión aberrante de ciclina D1, en líneas celulares de cáncer de mama (Bitler et al. 2010), conllevando a la progresión tumoral. La sobreexpresión de ciclina-D1 se ha correlacionado con la resistencia a gefitinib en carcinomas de cabeza y cuello (Kalish et al. 2004), abriendo una luz a nuevas terapias alternativas que inhiban esta acción de MUC1. Actualmente la terapia antitumoral con péptidos inhibidores de

MUC1, se encuentra en fase experimental arrojando resultados significativos en células de cáncer de mama in vitro y en modelos animales, cuyo mecanismo de acción sería bloquear las interacciones intracelulares entre MUC1/ β -catenina, impidiendo la entrada de EGFR al núcleo, y MUC1/EGFR. Estos efectos se corresponden con una reducción significativa de la proliferación, migración e invasión de las células metastásicas del cáncer de mama in vitro y en la inhibición del crecimiento tumoral y recidiva, en ratones (Bitler et al. 2011).

4 - El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las vías de transducción de la señal mitogénica

La familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés Epidermal Growth Factor Receptor) incluye cuatro receptores distintos: EGFR/ErbB1, HER2/CerbB2, HER3/CerbB3 y HER4/ErbB4.

El EGFR/ErbB1 es un gen localizado en el cromosoma 7p12 y se le ha atribuido un papel significativo en el desarrollo y crecimiento de muchos tipos de cáncer, ya que juega un papel importante en la proliferación de células cancerosas, en la angiogénesis y en las metástasis.

Este gen codifica una glicoproteína de membrana de 170 kDa, que puede ser activada por fosforilación, induciendo consecuentemente la cascada de transducción de la señal mitogénica (**Figura 3**). La principal vía de señalización del EGFR es la vía Ras-Raf-MAPK (Klapper et al. 2000). La activación de Ras inicia una cascada de fosforilación, de múltiples pasos, que conduce a la activación de MAPK. Las MAPKs extracelulares ERK tipos 1 y 2 son las mejor caracterizadas y que tienen mayor asociación con el cáncer humano. Las ERK1 y 2 se activan por fosforilación dual, por cinasas de doble especificidad, en tirosina y treonina y, posteriormente regulan la transcripción celular. Han sido vinculadas a la proliferación, supervivencia y transformación neoplásica (Lewis et al. 1998).

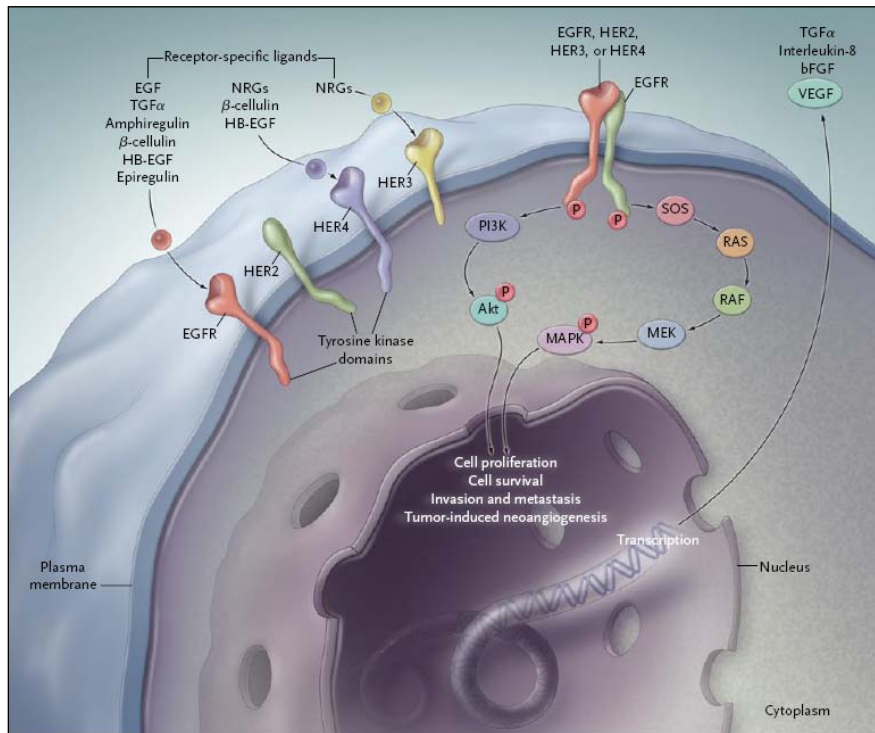


Figura 3. Vías de transducción de señales controlada por activación de EGFR.

Tres pasos pueden ser definidos de forma esquemática en la activación de EGFR.

En primer lugar, la unión de un ligando a un receptor específico de EGFR a uno de los receptores EGFR relacionados (HER2, HER3 o HER4) se produce en la porción extracelular.

En segundo lugar, la formación de un dímero funcionalmente activo EGFR-EGFR (homodímero) o EGFR-HER2, EGFR-HER3, EGFR-HER4 (heterodímeros) provoca la fosforilación dependiente de ATP de los residuos de tirosina en el dominio intracelular del EGFR.

En tercer lugar, esta fosforilación desencadena un programa complejo de señales intracelulares en el citoplasma y en el núcleo. Las dos principales vías efectoras intracelulares por activación del EGFR son: vía efectora RAS-RAF-MEK-MAPK, que controlan la transcripción de genes, la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S, y la proliferación celular; vía efectora PI3K-Akt, que activa una cascada de señales anti-apoptóticas y pro-supervivencia celular.

Ciardello F, Tortora G. N Engl J Med 2008;358:1160-1174.

4.1. Los tratamientos oncológicos dirigidos contra dianas terapéuticas

En los últimos años, las estrategias contra la familia del EGFR y la vía de señalización MAPK, han recibido una atención especial en el tratamiento del cáncer. La familia del EGFR, con inclusión de los cuatro receptores EGFR/ErbB1, HER2/CerbB2, HER3/CerbB3 y HER4/ErbB4, ha sido identificada como un efectivo blanco terapéutico en tumores sólidos.

Los tratamientos contra el EGFR incluyen anticuerpos monoclonales que se unen al dominio extracelular del receptor, como el cetuximab, o pequeñas moléculas ATP-competitivas, inhibidoras de la tirosín-quinasa (TKIs), como gefitinib y erlotinib.

Los antagonistas del EGFR están incluidos en los protocolos de tratamiento de carcinoma de células no pequeñas de pulmón, cáncer colorrectal y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en estadios avanzados (Ciardello y Tortora, 2008). En tumores de cabeza y cuello, el EGFR puede estar anormalmente activado en las células neoplásicas y la sobreexpresión de la proteína, es detectada frecuentemente por inmunohistoquímica (Nicholson et al. 2001, Grandis y Sok 2004). Sin embargo, las amplificaciones del EGFR no son frecuentes y la activación de las mutaciones de EGFR son muy

raras (Kalyankrishna y Grandis, 2006). La sobreexpresión de la proteína del EGFR se ha correlacionado con mal pronóstico en cáncer de cabeza y cuello (Kalyankrishna y Grandis, 2006). Hasta la fecha, se han llevado a cabo varios ensayos clínicos para identificar las características moleculares de los tumores en la predicción de respuesta a los antagonistas del EGFR. La activación del EGFR mediante mutaciones y el aumento de número de copias del gen EGFR, identifica a la población más sensible a estos tratamientos específicos. (Cappuzzo et al. 2005, Hirsch et al. 2005, Tsao et al. 2005, Sartore-Bianchi et al. 2007). En la mayoría de CMEs de la glándula salival, la proteína EGFR está sobreexpresada (Gibbons et al. 2001; Shang et al. 2007), pero las mutaciones activadoras de EGFR son muy raras (Han et al. 2008, Dahse y Kosmehl 2008, Dahse et al. 2009). Sin embargo, los estudios sobre el número de copias del gen EGFR, no se han realizado previamente en una serie de CME de glándulas salivales.

Hasta la fecha, los ensayos clínicos en tumores de las glándulas salivales con tratamientos oncológicos dirigidos contra dianas terapéuticas son escasos, probablemente debido al bajo número de estos casos en cada institución. Sólo se ha publicado un estudio en fase II de Herceptin (Trastuzumab) con resultados decepcionantes en los pacientes con tumores de glándulas salivales y sobreexpresión de HER2/neu (Haddad et al. 2003).

Los ensayos clínicos utilizando los antagonistas del EGFR en pacientes con cáncer de glándula salival son hasta la fecha escasos e incompletos.

II

Hipótesis de trabajo

El carcinoma mucoepidermoide (CME) de glándula salival es una neoplasia distintiva, compuesta por diferentes tipos celulares y patrones histológicos. Esta gran variabilidad morfológica se corresponde con diferentes comportamientos biológicos de los tumores, conllevando pronósticos muy diversos. Si bien los CMEs de bajo grado histológico se caracterizan por un pronóstico excelente, requiriendo tan sólo la extirpación quirúrgica del tumor, los CMEs de alto grado son agresivos, infiltran, tienden a metastatizar y pueden conllevar la muerte del paciente.

A pesar de que el CME es la neoplasia maligna de glándulas salivales más frecuente, hasta la fecha escasos estudios han relacionado las características moleculares subyacentes en estas neoplasias con el comportamiento biológico de los tumores y el pronóstico para los pacientes.

Las mucinas son glicoproteínas que normalmente forman parte de los tejidos y tienen un papel protector en los mismos. Se ha estudiado su expresión diferencial en estructuras glandulares de diversas localizaciones, especialmente en el tracto gastro-intestinal y páncreas. Interesantemente se ha observado que en las neoplasias originadas en estos órganos, así como en otras localizaciones, tienen un patrón de expresión distintivo y se correlaciona con el pronóstico de estos tumores.

Además, la mucina MUC1 actúa como un protooncogen que interactúa con el receptor del factor de crecimiento epidérmico

(EGFR) y se correlaciona con la activación de MAPK en modelos animales e inhibe la degradación del EGFR en experimentos in vitro. EGFR tiene un papel importante en el desarrollo y crecimiento en gran variedad de neoplasias malignas ya que se ha asociado a la proliferación de células cancerosas, la angiogénesis y al desarrollo de metástasis. Este gen codifica una glicoproteína que puede ser activada por fosforilación, induciendo consecuentemente la cascada de transducción de la señal mitogénica a través principalmente de la vía de señalización Ras-Raf-MAPK. Dentro de las MAPKs son de gran relevancia las ERK1/2, ya que su activación por fosforilación regula la transcripción celular y desencadena la proliferación, la supervivencia celular y el crecimiento neoplásico.

Teniendo en cuenta estas premisas, esta tesis se plantea de acuerdo con las siguientes hipótesis:

- 1** Los CMEs, al igual que otras neoplasias derivadas de tejidos glandulares, podrían tener un patrón de expresión de mucinas distintivo. (primer estudio)

- 2** La expresión de mucinas podría estar relacionada con el comportamiento biológico y pronóstico de los tumores. (primer estudio)

- 3** Los CMEs podrían tener activada la vía efectora EGFR/ERK, relacionada con la oncogénesis y progresión neoplásica. (segundo estudio)

- 4** La activación de esta vía de transducción podría estar relacionada con el comportamiento biológico y el pronóstico de los tumores. (segundo estudio)

- 5** La exploración de la expresión de mucinas (especialmente MUC1) y de la vía de transducción de la señal mitogénica EGFR/ERK podría segregar un grupo de tumores candidatos a tratamientos dirigidos contra dianas terapéuticas. (primer y segundo estudio)

III

Objetivos

- 1** Estudiar el patrón de expresión inmunohistoquímica de mucinas epiteliales de membrana (MUC1, MUC4) y secretoras (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC 7) en las glándulas salivales normales y en una serie de CMEs de glándula salival. (primer estudio)

- 2** Relacionar dicha expresión con el grado histológico de los tumores, el comportamiento biológico de los mismos y la evolución de los pacientes. (primer estudio)

- 3** Estudiar el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante hibridación in situ cromogénica (CISH) y mediante la expresión inmunohistoquímica de la proteína, en una serie de CMEs de glándula salival. (segundo estudio)

- 4** Estudiar la expresión inmunohistoquímica de las MAPKs ERKs 1 y 2 en su forma fosforilada (activa) (pERK1/2) en la misma serie de CMEs de glándula salival. (segundo estudio)

- 5** Correlacionar el estado del gen EGFR con las expresiones inmunohistoquímicas de la proteína del EGFR y pERK1/2, el grado histológico de los tumores, el comportamiento biológico de los mismos y la evolución de los pacientes. (segundo estudio)

IV

**Estudios realizados.
Material y métodos.
Resultados.**

Estudio N° 1

Expression of Membrane-Bound Mucins (MUC1 and MUC4) and Secreted Mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in Mucoepidermoid Carcinomas of Salivary Glands.

*Llucia Alos, MD, PhD; Blanca Lujan, MD;
Mireia Castillo, MD; Alfons Nadal, MD, PhD;
Marta Carreras, MD; Miguel Caballero, MD, PhD;
Carme de Bolos, PhD and Antonio Cardesa, MD, PhD.*

**American Journal of Surgical Pathology
2005 Jun;29(6):806-813.**

*Factor de impacto: 4,716
Ranking: 11/71 (1º cuartil – Anatomía Patológica)*

Expresión de Mucinas de Membrana (MUC1 y MUC4) y Mucinas Secretoras (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 y MUC7) en Carcinomas Mucoepidermoides de Glándulas Salivales

Las mucinas son glucoproteínas normalmente sintetizadas por células epiteliales. El objetivo de este estudio ha sido investigar la expresión de mucinas (MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC MUC5B, MUC6, MUC7) en los carcinomas mucoepidermoides, el tumor maligno más frecuente de las glándulas salivales. Se han estudiado 40 carcinomas mucoepidermoides y 22 glándulas salivales normales mediante técnicas de inmunohistoquímica para estas mucinas en material fijado en formol e incluido en parafina. Las mayor parte de las glándulas salivales normales expresaron MUC1 y MUC4, principalmente en las células ductales; MUC5B y MUC7 fueron positivas en los acinos mucosos y serosos, respectivamente, de la glándula submandibular y glándulas salivales menores; y MUC5AC y MUC2 se detectaron pobremente en los conductos excretores. Todos los carcinomas mucoepidermoides expresaron MUC1, y 38/40 tumores expresaron MUC4. Ambas mucinas de membrana marcaron membranas y citoplasma de todos los tipos celulares (epidermoides, intermedias, mucosas, claras y columnares). MUC5AC y MUC5B fueron positivas en las células con diferenciación glandular en la mayoría de los tumores (29/40 y 33/40 casos, respectivamente). MUC6 fue positivo en 13/40 tumores, y ambos MUC2 y MUC7 en

sólo 2 de los 40 tumores. La expresión alta de MUC1 se correlacionó con el alto grado histológico, una alta tasa de recurrencia tumoral y de metástasis y con un intervalo libre de enfermedad más corto ($p < 0.05$). Por el contrario, la expresión alta de MUC4 se correlacionó principalmente con tumores de bajo grado, menores tasas de recurrencia y mayor intervalo libre de enfermedad ($p < 0.05$). En conclusión, los carcinomas mucoepidermoides de glándulas salivales por lo general expresan MUC1, MUC4, MUC5AC y MUC5B; con menos frecuencia MUC6, y rara vez MUC2 y MUC7. Este patrón de expresión de mucinas puede ser útil para fines diagnósticos. Además, la expresión de MUC1 se relaciona con la progresión tumoral y un peor pronóstico, mientras que la expresión de MUC4 se relaciona con un mejor pronóstico.

Expression of Membrane-Bound Mucins (MUC1 and MUC4) and Secreted Mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in Mucoepidermoid Carcinomas of Salivary Glands

Lucia Alos, MD, PhD,* Blanca Lujan, MD,* Mireia Castillo, MD,*
Alfons Nadal, MD, PhD,* Marta Carreras, MD,† Miguel Caballero, MD, PhD,‡
Carme de Bolos, PhD,§ and Antonio Cardesa, MD, PhD*

Abstract: Mucins are glycoproteins normally synthesized by a variety of secretory epithelial cells. The aim of this study was to investigate the expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC6, MUC7) in mucoepidermoid carcinomas, the most frequent malignant tumor of salivary glands. Forty mucoepidermoid carcinomas and twenty-two normal salivary glands were studied for these mucins by immunohistochemistry from formalin-fixed and paraffin-embedded material. Normal salivary glands frequently expressed MUC1 and MUC4, mainly in ductal cells; MUC5B and MUC7 stained mucous and serous acini respectively of submandibular and minor salivary glands; and MUC5AC and MUC2 were poorly detected in excretory ducts. All mucoepidermoid carcinomas expressed MUC1, and 38/40 tumors expressed MUC4. Both membrane-bound mucins stained membranes and cytoplasm of all cell types (epidermoid, intermediate, mucous, clear and columnar). MUC5AC and MUC5B stained glandular differentiated cells in most tumors (29/40 and 33/40 cases, respectively). MUC6 was positive in 13/40 tumors, and both MUC2 and MUC7 in only 2/40 tumors. The high expression of MUC1 was related to high histologic grades, high recurrence and metastasis rates and a shorter disease-free interval ($P < 0.05$). Conversely, MUC4 high expression was mainly related to low-grade tumors, lower recurrence rates and a longer disease-free interval ($P < 0.05$). In conclusion, mucoepidermoid carcinomas of salivary glands usually express MUC1, MUC4, MUC5AC and MUC5B; less frequently MUC6; and rarely MUC2 and MUC7. This mucin expression pattern can be useful for diagnostic purposes. Therefore, MUC1 expression is related to tumor progression and worse prognosis, whereas MUC4 expression is related to a better prognosis.

Key Words: Mucin, MUC, immunohistochemistry, mucoepidermoid carcinoma, salivary gland carcinoma

(*Am J Surg Pathol* 2005;29:806–813)

From the Departments of *Pathology and †Otolaryngology, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ‡Department of Pathology of Hospital Prínceps d'Espanya, Bellvitge, Barcelona, Spain; and §Unitat de Biologia Celular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain.

Reprints: Lucia Alos MD, Hospital Clínic, Dept. Pathology, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain (e-mail: lalos@clinic.ub.es).

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most frequent malignant tumor that originates in major and minor salivary glands, and represents about one third of all malignant salivary glands tumors.^{12,43} Although it is a tumor which presents more commonly in women in the fifth decade of life, it is also the most frequent malignant salivary gland neoplasm in young people. MEC is a heterogeneous tumor composed of different types of cells: epidermoid, intermediate, mucous, clear and columnar,^{12,39} whose histogenesis is still unclear. Moreover, there are few studies addressing to the molecular mechanisms underlying the oncogenesis of salivary gland MECs.^{18,36,44,49} MECs of salivary glands often have a long natural history, but can present widely diverse biologic behaviors.^{3,5,16} Nowadays, prognostic information and treatment decisions are based on histologic grading methods, in spite of the fact that sometimes the clinical course is not the expected for the histopathological characteristics.^{3,5,6}

Epithelial mucins (MUCs) are the major glycoprotein components of mucus and under normal circumstances, are known to play a protective role in epithelial tissues. In addition, their involvement in the renewal and differentiation of the epithelium, modulation of cell adhesion, as well as cell signaling has also been proposed.^{6,20,25,41} All the MUCs share a common characteristic: the elevated number of sequences repeated in tandem that are different for each MUC.¹⁴ So far almost twenty MUC-encoding genes have been described, and some of them are now well characterized, such as MUC1 to MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 MUC 7, MUC11 and MUC12.^{14,30} The expression of each MUC gene is specific to the organ, tissue and cell type. Moreover, quantitative and qualitative alterations in the structure and in the expression of MUCs have been reported in neoplastic lesions. These changes have been proposed as molecular markers of malignant transformation in several organs and tissues; furthermore, their expression has been related to the prognosis of some neoplasias.^{25,28,31,41}

The MUCs can be classified into two main families: membrane-bound MUCs and secreted MUCs. MUC1, MUC3, MUC4, MUC11 and MUC12 are membrane-bound MUCs.³⁰ MUC1 is detected in most epithelial tissues.²² Its expression is up-regulated in a variety of cancers, as breast, pancreas and colorectal carcinomas.^{22,29,31} MUC4 is expressed in various

epithelial tissues, including tracheobronchial mucosa, colon, stomach, cervix and lung.⁴ Abnormal expression of MUC4 has been reported in various cancers such as pancreatic, colonic, pulmonary and gastric carcinomas.^{2,9,28,33} MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 are secreted MUCs. MUC2 is an intestinal-type MUC, and is expressed mainly in intestinal goblet cells. Mucinous carcinomas of different organs, such as colon, breast, pancreas, ovary and stomach highly express MUC2.^{19,27,37} MUC5AC and MUC6 are gastric-type secretory MUCs. MUC5AC is detected mainly in the superficial epithelium and neck cells, whereas MUC6 is expressed in deep mucous glands.¹⁰ Moreover, MUC5AC is expressed in tracheobronchial mucosa, and MUC6 in gallbladder, colon and endocervix.^{9,10} In neoplastic conditions, both MUC5AC and MUC6 are expressed in a subset of gastric carcinomas^{27,37}; MUC5AC, in mucinous carcinoma of the ovary¹⁵; and MUC6 in ductal breast carcinomas.¹¹ MUC5B and MUC7 can be detected in different cell types in the secretory acini of salivary glands.³² Some lung carcinomas express MUC5B,⁵⁰ and an aberrant expression of MUC7 has been observed in urothelial carcinomas.³⁸

To date, little is known about the expression of human MUCs in the normal salivary glands and mucoepidermoid carcinomas. The aim of the study was to determine the expression pattern of membrane-bound MUC1 and MUC4 and secreted MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7 in normal salivary glands and MECs, to increase knowledge about the histogenesis of this neoplasm, as well as to find out the prognostic implications of this expression.

MATERIALS AND METHODS

Selection of Cases

Forty MECs diagnosed at the Departments of Pathology of the Hospital Clinic, and Hospital Princeps d'Espanya, Bellvitge, University of Barcelona, from 1987 until 2000, were reviewed. The medical records were obtained from patients' files in the Departments of Otorhinolaryngology and Maxillofacial Surgery. At diagnosis, the tumors were staged according to the American Joint Committee on Cancer.⁴² All patients received primary surgery as standard treatment; radiotherapy was applied when close margins or lymph node metastases were assessed. Chemotherapy was added in patients with advanced stages (T3 and/or stage IV).

Histologic Grading of Mucoepidermoid Carcinomas

Hematoxylin-eosin and alcian blue stained slides and paraffin wax embedded material were available for all cases. MECs were classified following both the classifications proposed by AFIP^{3,16} and by Brandwein et al.⁵

Immunohistochemistry of MUCs

Representative paraffin wax blocks were selected from each of the 40 cases for immunohistochemistry, which included normal salivary gland adjacent to the neoplasia in 22 cases (14 parotid glands, 2 submandibular glands and 6 minor salivary glands). The characteristics of MUC antibodies used in the study are shown in Table 1.

TABLE 1. Characteristics of MUC Antibodies Used in the Study

Antigen	Antibody	Dilution
MUC1	NCL-clone Ma695	1:50
MUC2	NCL-clone Ccp58	1:100
MUC4	anti-MUC4 ²⁷	1:80
MUC5AC	NCL-clone CLH2	1:50
MUC5B	LUM5B ⁴⁸	1:3000
MUC6	NCL-clone CLH5	1:50
MUC7	LUM7.1 ⁴⁷	1:5000

Note: NCL, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK.

Immunohistochemical studies were carried out using both the automated immunohistochemical system TechMate 500 (Dako, Carpinteria, CA, USA), and the EnVision system (Dako). Briefly, 4 μ m sections were deparaffinized and hydrated using graded alcohols and water. For antigen retrieval, an autoclave pre-treatment at 120°C for 5 minutes was performed. Peroxidase was blocked for 7.5 minutes in ChemMate peroxidase-blocking solution (Dako). Then the slides were incubated with the primary antibodies for 30 minutes and washed in ChemMate buffer solution (Dako). The peroxidase labeled polymer was then applied for 30 minutes. After being washed in ChemMate buffer solution, the slides were incubated with diaminobenzidine substrate chromogen solution, washed in water, counterstained with hematoxylin, washed, dehydrated and mounted. Appropriate positive controls were used: pancreatic parenchyma for MUC1; colonic mucosa for MUC2, MUC4 and MUC5B; gastric mucosa for MUC5AC and MUC6; and submandibular salivary gland for MUC7.

The immunohistochemical results were evaluated by counting the percentage of positive neoplastic cells by two independent observers (L.A. and B.L.). The tumors were considered positive when showing 5% or more positive neoplastic cells.

Statistical Analysis

Fisher exact test was used for comparison between qualitative variables and Student *t* test and ANOVA were applied for quantitative variables according to application conditions.

Recurrence development was analyzed by the Kaplan-Meier method. Differences were analyzed by the Log-Rank method. Multivariate analysis was done according to Cox's regression method. Differences were considered of statistical significance with a α -risk of 0.05.

RESULTS

Clinicopathological Characteristics of the Patients

The clinicopathological characteristics of the patients with MECs at diagnosis are summarized in Table 2.

Follow-up was available for 39 cases. Fifteen tumors (38%) recurred after a median time of 15 months (range 6–134 months). Regional lymph node metastases presented in 5 cases (12%), after a median time of 15 months (range 3–60 months)

TABLE 2. Clinicopathological Characteristics of the Patients at Diagnosis

Characteristics	Cases (%)
Patient number	40
Age	
Median (Range)	53 (4–82)
Gender	
Female	22 (55%)
Male	18 (45%)
Tumor location	
Parotid	20 (50%)
Minor salivary gland	15 (38%)
Submandibular gland	5 (12%)
Stage	
I	18 (45%)
II	4 (10%)
III	1 (2%)
IV	17 (43%)

from diagnosis. The median of the disease-free interval was 96 months (range 0–159 months). Five patients died of disease after a median time of 18 months (range 15–60 months).

Histologic grade of MECs

According to the AFIP classification, 25 MECs were grade 1 (63%); 4 grade 2 (10%); and 11 grade 3 (27%). According to Brandwein's criteria, 11 MECs were grade 1 (27%); 12, grade 2 (30%); and 17, grade 3 (43%). There was a statistical relationship between the histologic grade according both classifications and recurrence, metastasis rates and disease-free interval. However, tumor grade according to Brandwein's classification was the only prognostic-associated feature that retained significance in the multivariate analysis ($P = 0.003$, Cox regression).

MUCs Expression

The results of the immunohistochemical study of the MUCs in normal salivary glands and MECs are summarized in Table 3.

MUC 1

MUC 1 expression was restricted to the apical cell membranes in 13/22 cases (59%) of normal salivary glands irrespective of histologic types (serous, mucous and seromucous) in ductal cells, and also in acinar cells in 5 cases (Fig. 1A).

All MECs were positive for MUC1. It stained the cellular membranes and the cytoplasm of all kinds of cells: epidermoid, intermediate, clear, mucous and columnar. MUC 1 expression was associated with histologic grade, according to both classifications. Histologic grade 1 tumors had the lowest levels of expression whereas grade 3 had the highest ($P < 0.001$, ANOVA, Table 4) (Figs. 2B and 3B). Furthermore, MUC1 expression was associated with progression of disease. Cases with more than 50% of positive cells had a disease-free interval shorter than those with 50% or less of positive cells (median of 28 months vs. 134 months) ($P = 0.0104$, Log-Rank test) (Fig. 4). A statistically significant relationship between the expression of MUC1 and the development of lymph node metastases was also observed ($P = 0.031$ Fisher exact test). Most of the tumors with metastases (75%) had more than 50% of MUC1-positive cells.

MUC 2

MUC2 was focally positive in 3/22 normal salivary glands (13%). Positivity was restricted to excretory ducts whereas acini were negative.

This MUC stained the cytoplasm of some mucous cells in 2/40 MECs (5%), with 5 and 10% of positive cells respectively. No relationship between positivity of MUC2 and histologic grade or outcome of the patients was found.

MUC4

Cytoplasmic expression (namely supranuclear or apical) was found in duct cells in 19/22 normal salivary glands (86%) regardless histologic type (Fig. 1B). In 3 cases also acinar cells were focal and weakly positive. MUC4 was positive in 38/40 MECs (95%). It stained cellular membranes and cytoplasm of all kinds of cells: epidermoid, intermediate, clear, mucous and columnar. An inverse statistical relationship between the expression of MUC4 and MUC1 was found ($P = 0.002$, Fisher exact test), as well as with the histologic grade of the MECs according to both classifications ($P < 0.001$, ANOVA, Table 4)

TABLE 3. Mucin Expression in Normal Salivary Glands and Mucoepidermoid Carcinomas

Structure/Cell	MUC1	MUC2	MUC4	MUC5AC	MUC5B	MUC6	MUC7
Normal salivary glands							
Ducts	+	+/-	+	+/-	-	-	-
Mucous acini	+/-	-	+/-	-	+	-	-
Serous acini	+/-	-	+/-	-	-	-	+
Mucoepidermoid carcinomas							
Epidermoid	+	-	+	-	-	+/-	-
Intermediate	+	-	+	-	-	-	-
Mucous	+	+/-	+	+	+	+	+/-
Clear	+	-	+	-	-	+/-	-
Columnar	+	-	+	+/-	+/-	+	-

Note: +, frequently positive; +/-, occasionally positive; -, negative.

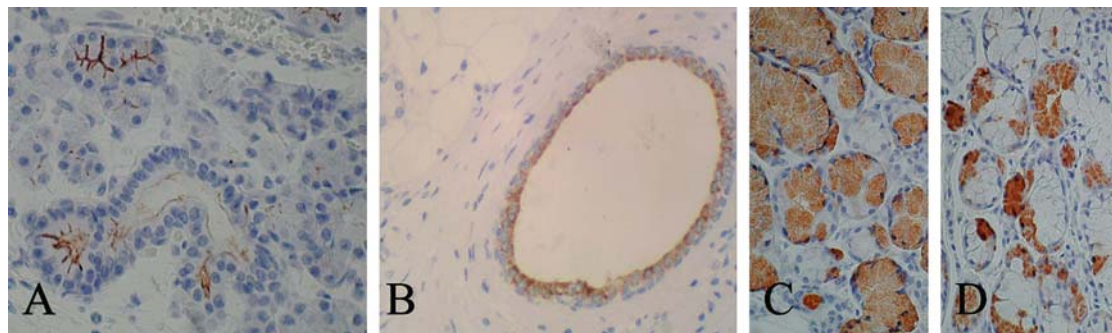


FIGURE 1. Expression of mucins in normal salivary gland. A, MUC1 stains apical membranes of ductal cells and some acinar structures ($\times 400$). B, MUC4 expression in excretory salivary gland duct: positivity is restricted to the apical zone ($\times 400$). C, MUC5B expression in minor salivary glands: it is detected in mucous acini, and serous acini are negative ($\times 200$). D, MUC7 stains serous acini in minor salivary glands, arranged as crescent-shaped caps at the periphery of mucous acini ($\times 200$).

(Figs. 2C and 3C). Furthermore, we found an inverse correlation between the MUC4 expression and the progression of the MECs. There was a statistically significant correlation between the expression of MUC4 and the disease-free interval ($P = 0.0255$, Log-Rank test). MECs that expressed MUC4 in more than 50% of cells had a low rate of recurrences (20% of these cases recurred) and a long disease-free interval (median 96 months). Most of the MECs with 50% or less MUC4-positive cells recurred (66% of these cases) and had a shorter disease-free interval (median of 28 months) (Fig. 5).

In spite of a statistically significant relationship between both MUC1 and MUC4 expression and tumor behavior was found, this significance was not retained in the multivariate analysis.

MUC5AC

MUC5AC was focally positive in 7/22 normal salivary glands (32%), in the excretory ducts. Salivary gland acini were negative.

TABLE 4. Relationship Between Percentage of MUC1 and MUC4 Positive Cells and Histological Grade

Histological Grade*	N	Mean Value	SD	Lowest	Highest
MUC1					
1	11	20%	8.94	10%	40%
2	12	30%	14.77	10%	50%
3	17	63.53%	18.69	10%	80%
Total	40	41.5%	24.66	10%	80%
MUC4					
1	11	64.09%	22.89	25%	90%
2	12	78.75%	14.48	60%	95%
3	17	36.59%	24.42	1%	80%
Total	40	56.8%	27.92	1%	95%

*Histological grade according Brandwein's classification.
ANOVA test $P < 0.001$ for both MUCs.
Similar results were obtained according AFIP classification.

In MECs, MUC5AC stained the cytoplasm of mucous cells (Fig. 6A and 6B), and scattered columnar cells were also positive. It was expressed by 29/40 MECs (72%), usually in less than 50% of the neoplastic cells. Most of the tumors that expressed MUC5AC were low-grade MECs, whereas most negative cases were high-grade MECs. However, no statistically significant relationship between the positivity for MUC5AC and the histologic grade of the tumors, the tumoral progression, or the outcome of the patients was found.

MUC5B

This MUC was intensely positive in the cytoplasm of mucous acini of all normal submandibular and minor salivary glands tested (Fig. 1C).

In MECs, MUC5B had a staining pattern similar to MUC5AC, and it was positive in the cytoplasm of the mucous cells (Fig. 6C), although some columnar cells were also positive. MUC5B was expressed in 33/40 MECs (82%), most of them in less than 50% of cells. Similarly to MUC5AC, MUC5B was also positive in most low-grade tumors, whereas most negative cases for this MUC were high-grade MECs. However, this finding was not statistically significant, neither for tumoral progression nor the outcome of the patients.

MUC6

This MUC was negative in all tested normal salivary glands.

In MECs, MUC6 was detected predominantly in the cytoplasm of mucous cells, but columnar, clear and epidermoid cells were also positive in some cases. MUC6 was positive in 13/40 cases (32%), most of them in less than 50% of cells. No relationship between MUC6 expression and the histologic grade of the tumors, the tumoral progression or the outcome of the patients was found.

MUC7

MUC7 was positive in the cytoplasm of the serous acini of all normal submandibular and minor salivary glands, where they were arranged as crescent-shaped caps at the periphery of mucous acini (Fig. 1D). In parotid glands scattered cells of

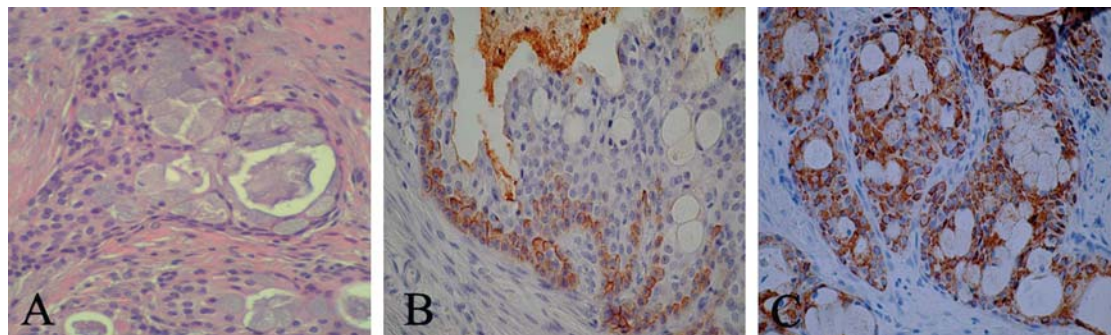


FIGURE 2. Low-grade mucoepidermoid carcinoma. A, The tumor has a cystic architecture and it is mainly composed of numerous mucous cells and epidermoid cells (HE \times 200). B, MUC1 is low expressed in this tumor, less than 50% of the tumoral cells are positive (\times 200). C, MUC4 is highly expressed and stains all the cell types (\times 100).

serous acini were positive for this MUC in 5 out of 14 cases tested. Only 2/40 MECs (5%) expressed MUC7, in less than 50% of cells. This MUC was detected in the cytoplasm of mucous cells, in these cases. No relationship between the expression of MUC7 and the histologic grade of the tumors, the tumoral progression, or the outcome of the patients was found.

DISCUSSION

MEC is the most frequent malignant neoplasm originated in salivary glands.¹² MECs are composed of different cell types, and can show different growth patterns, thus presenting different histologic morphologies, depending on the predominant cell type and pattern. Behavior of tumors can be predicted by histologic grade, defined as low, intermediate and high. However some low-grade MECs can show an aggressive course.^{3,16} Histologically, the low-grade MECs often have a predominantly cystic architecture with numerous mucous cells, minimal cytologic atypia, and scarce mitoses (Figs. 2A and 6A). High grade tumors are predominantly solid, with a preponderance of intermediate and epidermoid cells and scarce mucous cells (Fig. 3A). Anaplasia, neural invasion and necrosis are features of high grade tumors.^{3,16,39} Brandwein et al recently

added other histologic characteristics for grading these tumors, such as the infiltrating margins, vascular and osseous invasion, to improve reproducibility and predictability.⁵ In our series the clinical characteristics of the patients, the tumoral grading and the outcome of the patients were consistent with data reported by these authors.^{3,5,16}

To date, there has been little information about the expression of MUCs in normal and neoplastic major and minor salivary glands, compared with studies on the gastrointestinal tract, breast, pancreas and lung in normal and pathologic conditions.

MUC1, and MUC4 are transmembrane or membrane-bound MUCs. Under normal conditions, these MUCs are likely to act as a barrier to the apical surface of epithelial cells, and play a protective and a regulatory role.^{14,20} In our study, normal salivary glands of all types (parotid, submandibular and minor salivary glands) expressed membrane-bound MUC1 and MUC4 in excretory, striated and intercalated ducts, and occasionally in acinar structures. MUC1 stained mainly the apical cellular membranes, whereas MUC4 showed a cytoplasmic positivity in these structures, mainly in the apical or supranuclear zone. These results are consistent with other reported data.^{22,26} In our study, MECs presented an overexpression of both membrane-bound

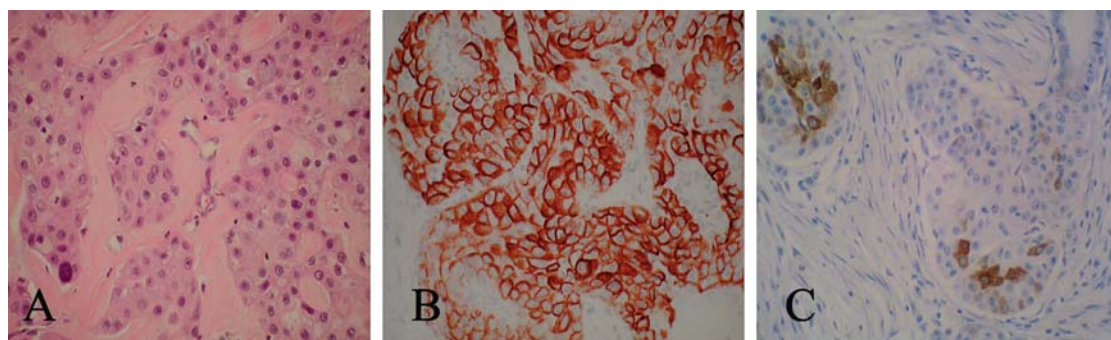


FIGURE 3. High-grade mucoepidermoid carcinoma. A, the tumor has a solid growth and focal cellular atypia (HE \times 200). B, MUC1 is highly expressed, and stains cellular membranes and cytoplasm of all cell types (\times 200). C, MUC4 is only focally positive (\times 100).

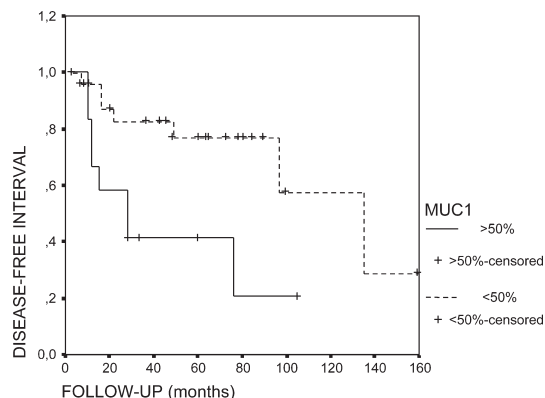


FIGURE 4. Actuarial disease-free interval according to MUC1 expression.

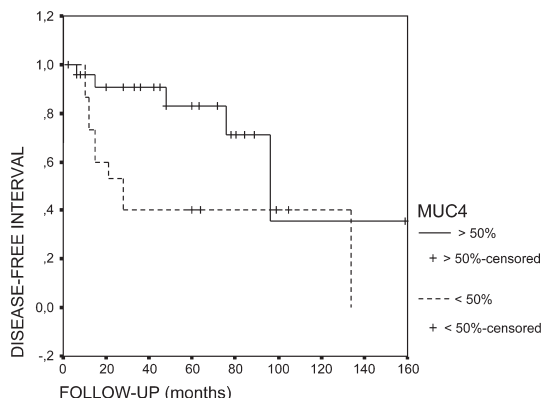


FIGURE 5. Actuarial disease-free interval according to MUC4 expression.

mucins. All kinds of cells (mucous, epidermoid, intermediate, clear and columnar) showed cytoplasmic staining of MUC1 and MUC4, in addition to cellular membranes. This indicates that in the development of the neoplastic process there are post-transcriptional alterations that produce aberrantly glycosylated MUC1.⁷ This finding has been described in other neoplasias, such as pancreatic adenocarcinomas.²⁹ This change in the staining pattern can be useful as a diagnostic tool in small biopsies, to perform the differential diagnosis between MEC and reactive processes of salivary glands. The frequent overexpression of both membrane-bound MUCs favor the origin of MECs in ductal structures of salivary glands, as was suggested before with immunohistochemical studies for cytokeratins.¹³ Furthermore, we have related the expression of both membrane-bound MUCs with the prognosis of the MECs. We found a significant correlation between the histologic grade of the tumors and the expression of MUC1, as histologic high grade MECs highly expressed MUC1. Tumors with a high positivity of MUC1 had a worse prognosis, with a shorter disease-free interval, higher rate of recurrences and metastases. MUC1 expression reduces cell-matrix and cell-cell adhesion,²⁰ favoring invasion of tumor cells

into the underlying stroma, lymph and blood vessels.²¹ The relationship of the high expression of MUC1 with tumor aggressiveness has been observed in other tumors, such as adenocarcinomas of colon³¹ and breast.²⁸ As MUC1 is a cancer-associated circulating antigen, it could be used in patients with high-grade MEC to monitor therapy and, during follow-up, for early detection of recurrences or metastases, as has been proposed for patients with carcinoma of the breast.¹⁷ Moreover, in the future, the patients with high-grade MECs could benefit from new strategies for therapy, as MUC1 has been already introduced as a target for immunotherapy for the treatment of some carcinomas.⁴⁵

In our study, the expression of MUC4 gave opposite results regarding its prognostic value. In fact, the expression of MUC1 correlated inversely to the MUC4 expression. Histologic low-grade MECs highly expressed MUC4. Moreover, MUC4 correlated inversely with the tumor progression, and MECs with high expression of MUC4 had a better prognosis, with a longer disease-free interval and lower rate of recurrences and metastases. MUC4 is a marker of well-differentiated epithelia²³ and it is overexpressed in some well-differentiated neoplasias, such as

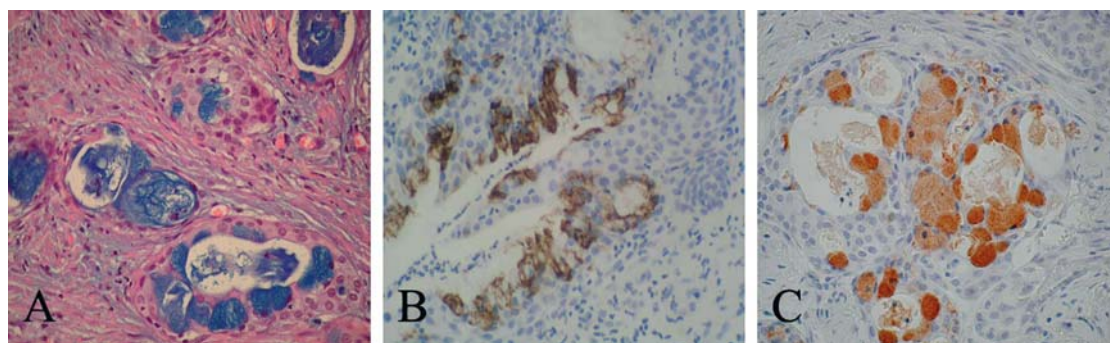


FIGURE 6. Low-grade mucoepidermoid carcinoma in which mucous cells predominate. A, Mucous cells are highlighted with alcian blue stain ($\times 100$). B, MUC5AC stains glandular differentiated cells, most of them corresponding to mucous cells ($\times 200$). C, MUC5B shows a similar staining pattern to MUC5AC, and a strong cytoplasmic positivity is detected in mucous cells ($\times 200$).

the ovarian tumors,¹⁵ and it is not expressed in poorly differentiated or undifferentiated carcinoma cell lines.²⁴ Conversely, in other neoplasias of several organs, such as adenocarcinomas of pancreas and breast, the high MUC4 expression has been related to the tumor aggressiveness.^{25,41} MUC4 has two EGF-like domains, one of which acts as an intramembrane ligand and phosphorylates and activates the receptor tyrosine kinase ErbB2.⁸ The unfavorable prognosis that is attributed to MUC4 is due to several mechanisms, such as an increase in the action of ErbB2, a change in the signaling pathways leading to a decrease of apoptosis, and an alteration in tumor cell adhesion.^{23,25,41} Approximately 25–38% of mucoepidermoid carcinomas express ErbB2, and this expression is related to tumor progression, leading to an unfavorable prognosis.^{36,46} Thus, MUC4 expression in human tumors may be an indicator of tumor cell differentiation or else a marker and mediator of tumor growth and progression. Taking into account these roles of MUC4, it is understandable that MUC4 can be a marker of good or bad prognosis, depending on the tumor type. We confirm that in MECs of salivary glands well differentiated low-grade MECs highly express MUC4 and, in this neoplasia, MUC4 is an indicator of good prognosis. These findings are consistent with a recently published study.⁴⁶ According to our results, prognostic value of MUC1 and MUC4 expression appears related to histologic grade, as they are mainly related to it.

MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 are secreted gel-forming MUCs, encoded by four genes located on chromosome 11 in the region p15.5.³⁴ In normal salivary glands of our study, MUC2 and MUC5AC were focally positive in few cases, and stained scarce cells of excretory ducts, whereas both MUCs were negative in acinar structures. Other studies using PCR methods have observed a heterogeneous MUC2 gene expression on ductal structures of salivary glands.²² Both MUC5B, also named MG1 (mucous glycoprotein 1), and MUC7, also named MG2 (mucous glycoprotein 2), have been detected in salivary glands secretions. These MUCs play an important role in the maintenance of the viscoelastic and rheological properties of saliva and for binding and facilitating clearance of oral microorganisms. The origin of MUC5B and MUC7 from acini of salivary glands have been proposed before,³² but our observations confirm that MUC5B is found constantly in mucous acini whereas MUC7 in serous acini of submandibular and minor salivary glands. However, serous acini of parotid gland were only focally positive in few cases for MUC7. Recent studies using immunoelectron microscopy have found similar results.³⁵

The expression of secreted MUCs in MECs gave diverse results. MUC2 was positive in more than 5% of the neoplastic cells in only 2 cases, and stained mucous cells. MUC2 gene expression has been linked to a “mucinous pathway of carcinogenesis,”¹ since it has been described as being constantly positive in mucinous carcinomas of different organs, such as colon, pancreas, breast, ovary and stomach, but rarely in non-mucinous carcinomas.^{1,19,27,37} Our results suggest that mucoepidermoid carcinomas develop along a different pathway from that described for mucinous tumors. Although MUC6 was always negative in normal salivary glands, MECs showed an aberrant expression in approximately a third of the

tumors, staining mainly glandular differentiated cells, but also epidermoid cells in some cases. The expression of MUC2 and MUC6 has been related to a good prognosis in mucinous carcinomas, as it has been suggested that these MUCs can act as a barrier to cancerous extension.¹ In salivary gland tumors, MUC2 and MUC6, have been little tested, but both are expressed in salivary gland duct carcinomas of colloid type, a very aggressive tumor.⁴⁰ In MECs we could not find relationship between the MUC2 and MUC6 expression and the biologic behavior of the tumors.

In our study, MUC5AC and MUC5B showed a similar staining pattern in MECs, and they were positive in most mucous cells and in some columnar cells. Both MUCs were positive in most MECs, but mainly in low-grade tumors, often composed predominantly of mucous and columnar cells. Conversely, acinar MUC7 was negative in most tumors.

In conclusion, malignant transformation of salivary gland into MEC is associated with changes in the MUCs expression patterns that can be used for diagnostic purposes. MUC1 and MUC4 are overexpressed mainly in the membrane and cytoplasm of the neoplastic cells. MUC5AC, MUC5B and MUC6 are often expressed, predominantly in glandular differentiated cells; whereas MUC2 and MUC7 are rarely expressed. Tumor differentiation modulates differentially MUC1 and MUC4 expression. High MUC1 and low MUC4 expression are characteristic of poor differentiated and aggressive tumors, whereas low grade tumors have low MUC1 expression and high MUC4 expression.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Marta Garrido for preparing MUC antibodies; Elena Gonzalvo and Margarita Mainar for performing the immunohistochemical techniques; and Gemma Laguna for secretarial assistance.

REFERENCES

1. Adsay NV, Merati K, Andea A, et al. The dichotomy in the preinvasive neoplasia to invasive carcinoma sequence in the pancreas: differential expression of MUC1 and MUC2 supports the existence of two separate pathways of carcinogenesis. *Mod Pathol.* 2002;15:1087–1095.
2. Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmiech MB, et al. Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4033–4040.
3. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer.* 1992;69:2021–2030.
4. Audié JP, Janin A, Porchet N, et al. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridisation. *J Histochem Cytochem.* 1993;41:1479–1485.
5. Brandwein M, Ivanov K, Wallace B, et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:835–845.
6. Braga VMM, Pemberton LF, Duhig T, et al. Spatial and temporal expression of an epithelial mucin, MUC1, during mouse development. *Development.* 1992;115:427–437.
7. Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, et al. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem.* 1995;233:607–618.
8. Carraway KL, Rossi EA, Komatsu M, et al. An intramembrane modulator of the ErbB2 receptor tyrosine kinase that potentiates neuregulin signaling. *J Biol Chem.* 1999;274:5263–5266.

9. Copin MC, Devisme L, Buisine MP, et al. From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int J Cancer*. 2000;86:162–168.
10. De Bolos C, Garrido M, Real FX. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology*. 1995;109:723–734.
11. De Bolos C, Guma M, Barranco C, et al. MUC6 expression in breast tissues and cultured cells: abnormal expression in tumors and regulation by steroid hormones. *Int J Cancer*. 1998;77:193–199.
12. Ellis GL, Auclair PL. Mucoepidermoid carcinoma. In: *Tumors of the Salivary Glands*. Atlas of Tumor Pathology, Third Series, Fascicle 17. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1996:155–172.
13. Foschini MP, Marucci G, Eusebi V. Low-grade mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: characteristic immunohistochemical profile and evidence of striated duct differentiation. *Virchows Arch*. 2002;440:536–542.
14. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:607–634.
15. Giuntoli RL, Rodriguez GC, Whitaker RS, et al. Mucin gene expression in ovarian cancers. *Cancer Res*. 1998;58:5546–5550.
16. Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands. Clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer*. 1998;82:1217–1224.
17. Graves R, Hilgers J, Fritsche H, et al. MUC-1 mucin assays for monitoring therapy in metastatic breast cancer. *Breast*. 1998;7:181–186.
18. Handra-Luca A, Bilal H, Bertrand JC, et al. Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. Association to aggressive tumor behavior and tumor cell proliferation. *Am J Pathol*. 2003;163:957–967.
19. Hanski C, Hofmeier M, Schmitt-Gräff A, et al. Overexpression or ectopic expression of MUC2 is the common property of mucinous carcinomas of the colon, pancreas, breast and ovary. *J Pathol*. 1997;182:385–391.
20. Hilkens J, Ligtenberg JL, Vos HL, et al. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci*. 1992;17:359–363.
21. Hiraga Y, Tanaka S, Haruma K, et al. Immunoreactive MUC1 expression at the deepest invasive portion correlates with prognosis of colorectal cancer. *Oncology*. 1998;55:307–319.
22. Ho SB, Niehans GA, Lyfthogt C, et al. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*. 1993;53:641–651.
23. Jepson S, Komatsu M, Haq B, et al. MUC4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27^{kip}, but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinase B/Akt pathways. *Oncogene*. 2002;21:7524–7532.
24. Jonckheere N, Perrais M, Mariette C, et al. A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as a target of TGF- β in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene*. 2004;23:5729–5738.
25. Komatsu M, Tatum L, Altman NH, et al. Potentiation of metastasis by cell surface sialomucin complex (MUC4), a multifunctional anti-adhesive glycoprotein. *Int J Cancer*. 2000;87:480–486.
26. Liu B, Lague JR, Nunes DP, et al. Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands. *J Histochem Cytochem*. 2002;50:811–820.
27. Lopez-Ferrer A, de Bolos C, Barranco C, et al. Role of fucosyltransferases in the association between apomucin and Lewis antigen expression in normal and malignant gastric epithelium. *Gut*. 2000;47:349–356.
28. McGuckin MA, Walsh MD, Hohn BG, et al. Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Hum Pathol*. 1995;26:432–439.
29. Monges GM, Mathoulin-Portier MPA, Acres RB, et al. Differential MUC1 expression in normal and neoplastic human pancreatic tissue. An immunohistochemical study of 60 samples. *Am J Clin Pathol*. 1999;112:635–640.
30. Moniaux N, Escande F, Porchet N, et al. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci*. 2001;6:D1192–D1206.
31. Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, et al. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 1994;106:353–361.
32. Nielsen PA, Mandel U, Therkildsen MH, et al. Differential expression of human high-molecular-weight salivary mucin (MG1) and low-molecular-weight salivary mucin (MG2). *J Dent Res*. 1996;75:1820–1826.
33. Ogata S, Uehara H, Chen A, et al. Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines. *Cancer Res*. 1992;52:5971–5978.
34. Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, et al. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics*. 1996;38:340–352.
35. Piludu M, Rayment SA, Liu B, et al. Electron microscopic immunogold localization of salivary mucins MG1 and MG2 in human submandibular and sublingual glands. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:69–79.
36. Press MF, Pike MC, Hung G, et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of salivary gland. *Cancer Res*. 1994;54:5675–5682.
37. Reis CA, David L, Carvalho F, et al. Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas. *J Histochem Cytochem*. 2000;48:377–388.
38. Retz M, Lehmann J, Röder C, et al. Differential Mucin MUC7 gene expression in invasive bladder in contrast to uniform MUC1 and MUC2 gene expression in both normal urothelium and bladder carcinoma. *Cancer Res*. 1998;58:5662–5666.
39. Seifert G. Mucoepidermoid carcinoma. In *Histological Typing of Salivary Gland Tumours*. World Health Organization, International Histological Classification of Tumours, Springer-Verlag, Berlin, 1991:20–21.
40. Simpson RH, Prasad AR, Lewis JE, et al. Mucin rich variant of salivary duct carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study of four cases. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:1070–1079.
41. Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, et al. Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res*. 2004;64:622–630.
42. Sobin LH, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumors*. American Joint Committee on Cancer and International Union Against Cancer (UICC), 6th Ed. New York, Wiley and Sons, 2002.
43. Spiro RH. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg*. 1986;8:177–184.
44. Tonon G, Gehlhaus KS, Yonescu R, et al. Multiple reciprocal translocations in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;152:15–22.
45. Von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten AA, Kenemans P, et al. Survival in early breast cancer patients is favourable influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J Clin Oncol*. 2000;18:574–583.
46. Weed DT, Gomez-Fernandez C, Pacheco J, et al. MUC4 and ErbB2 expression in major and minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Head Neck*. 2004;26:353–364.
47. Wickstrom C, Christersson C, Davies JR, et al. Macromolecular organization of saliva: identification of 'insoluble' MUC5B assemblies and non-mucin proteins in the gel phase. *Biochem J*. 2000;351:421–428.
48. Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, et al. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J*. 1998;334:685–693.
49. Yoo J, Robinson RA. H-ras gene mutations in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Cancer*. 2000;88:518–523.
50. Yu CJ, Yang PC, Shew JY, et al. Mucin mRNA expression in lung adenocarcinoma cell lines and tissues. *Oncology*. 1996;53:118–126.

Estudio N° 2

**Activation of the EGFR/ERK pathway in high-grade
mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands**

*Lujan B, Hakim S, Moyano S, Nadal A, Caballero M,
Diaz A, Valera A, Carrera M, Cardesa A, Alos L.*

**Department of Pathology, Hospital Clínic, IDIBAPS,
University of Barcelona, Villarroel, 170, Barcelona 08036, Spain.**

**British Journal of Cancer
2010 Aug; 103(4):510-6.**

*Factor de impacto: 4,846
Ranking: 28/143 (1º cuartil – Oncología)*

Activación de la vía efectora EGFR/ERK en carcinomas mucoepidermoides de alto grado de glándulas salivales

El carcinoma mucoepidermoide (CME) de glándula salival presenta diferencias en el comportamiento biológico dependiendo principalmente del grado histológico. Los tumores de alto grado, por lo general, tienen un curso biológico agresivo y requieren un tratamiento oncológico adicional después de la cirugía.

En una serie de 43 CME de glándulas salivales, estudiamos el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante la técnica de hibridación in situ cromogénica (CISH) con dos colores. Por otra parte, se evaluó la expresión de proteínas del EGFR y las MAPKs activadas (fosforiladas) ERK1/2 mediante inmunohistoquímica. Estos resultados se correlacionaron con el grado histológico de los tumores y la evolución de los pacientes.

El estudio con CISH demostró un alto número de copias del gen de EGFR, con una polisomía de cromosoma 7, en 8 de los 11 CME de alto grado (72,7%), mientras que 27 tumores de bajo grado y 15 de grado intermedio tenían un número de copias del gen EGFR normal ($P < 0.001$). Las ganancias del gen EGFR se correlacionó con el intervalo libre de enfermedad ($p = 0,003$) y la supervivencia global de los pacientes ($p = 0,019$). La expresión de la proteína de EGFR tuvo una correlación significativa con el grado histológico de los tumores, pero no con la evolución de los pacientes.

La expresión de pERK1/2 se correlacionó con el grado histológico de los tumores ($P < 0.001$), el intervalo libre de enfermedad ($p = 0,004$) y la supervivencia global de los pacientes ($p = 0,001$).

En conclusión, la vía efectora EGFR / ERK está activa en el CME de alto grado con comportamiento agresivo. Los pacientes con estos tumores que requieran un tratamiento oncológico adicional a la cirugía podrían beneficiarse de los inhibidores de EGFR y de MAPKs.

Activation of the EGFR/ERK pathway in high-grade mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands

B Lujan¹, S Hakim¹, S Moyano¹, A Nadal¹, M Caballero², A Diaz¹, A Valera¹, M Carrera³, A Cardesa¹ and L Alos^{*,1}

¹Department of Pathology, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Villarroel, 170, Barcelona 08036, Spain; ²Department of Otolaryngology, Hospital Clínic, University of Barcelona, Villarroel, 170, Barcelona 08036, Spain; ³Department of Pathology, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga, Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain

BACKGROUND: Mucoepidermoid carcinoma (MEC) shows differences in biological behaviour depending mainly on its histological grade. High-grade tumours usually have an aggressive biological course and they require additional oncological treatment after surgery.

METHODS: In a series of 43 MECs of the salivary glands, we studied the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene by using dual-colour chromogenic *in situ* hybridisation (CISH). Moreover, we assessed the protein expressions of the EGFR and the activated extracellular signal-regulated kinases (pERK1/2) by using immunohistochemistry. These results were correlated with the histological grade of the tumours and the outcome of the patients.

RESULTS: The CISH study demonstrated a high-EGFR gene copy number, with balanced chromosome 7 polysomy, in 8 out of 11 high-grade MECs (72.7%), whereas 27 low-grade and 15 intermediate-grade tumours had a normal EGFR gene copy number ($P < 0.001$). The EGFR gene gains correlated with disease-free interval ($P = 0.003$) and overall survival of the patients ($P = 0.019$). The EGFR protein expression had a significant correlation with the histological grade of the tumours but not with the outcome of the patients. The pERK1/2 expression correlated with histological grade of tumours ($P < 0.001$), disease-free interval ($P = 0.004$) and overall survival ($P = 0.001$).

CONCLUSIONS: The EGFR/ERK pathway is activated in high-grade MECs with aggressive behaviour. Patients with these tumours who require oncological treatment in addition to surgery could benefit from EGFR and mitogen-activated protein kinase pathway inhibitors.

British Journal of Cancer (2010) **103**, 510–516. doi:10.1038/sj.bjc.6605788 www.bjccancer.com

Published online 27 July 2010

© 2010 Cancer Research UK

Keywords: mucoepidermoid carcinoma; salivary gland carcinoma; epidermal growth factor; EGFR; extracellular signal-regulated kinase; ERK1/2

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most frequent malignant tumour that originates in the major and minor salivary glands, and represents about one third of all malignant salivary gland tumours (Spiro, 1986; Goode and El-Naggar, 2005; Ellis and Auclair, 2008). It is a heterogeneous neoplasm that may present different biological behaviour, depending mainly on the histological grade of the tumour (Goode *et al*, 1998; Goode and El-Naggar, 2005; Ellis and Auclair, 2008; Nance *et al*, 2008). Surgical resection is the standard treatment for all grades of MEC. Radiotherapy after wide surgical excision of the tumour is recommended for high-grade MECs. Lymphadenectomy and adjuvant external beam radiotherapy are indicated when cervical metastases are present. Chemotherapy is indicated in the treatment of metastatic disease and in the palliation of locoregional disease not amenable to either salvage surgery or radiation therapy (Agulnik and Siu, 2004; Nance *et al*, 2008). Low-grade MECs usually do not recur; most patients are cured after surgery and the 5-year survival rate is 76–95%.

Conversely, high-grade MECs are aggressive neoplasms that frequently have an infiltrative pattern of growth, recur and even metastasize, and their 5-year survival rate is 30–50% (Goode *et al*, 1998; Nance *et al*, 2008).

To date, clinical trials using targeted therapies on salivary gland tumours are scarce, probably because of the low number of these cases in each institution. Only one phase II study of Herceptin (Trastuzumab) with disappointing results in patients with advanced salivary gland tumours overexpressing HER2/neu has been published (Haddad *et al*, 2003). Incomplete clinical trials using epidermal growth factor receptor (EGFR) antagonists have been performed on patients with salivary gland cancer. Moreover, studies on the oncogenetic pathways in salivary gland MECs predictive of response to targeted therapies are scarce and incomplete. In recent years, strategies against the EGFR family and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway have received special attention in the treatment of cancer. The EGFR family, including the four distinct receptors EGFR/ErbB1, HER2/cerbB2, HER3/CerbB3 and HER4/ErbB4, has been identified as a potential therapeutic target in solid tumours. The EGFR/ErbB1 is a gene located on chromosome 7p12 and has

*Correspondence: Dr L Alos; E-mail: lalos@clinic.ub.es

Received 15 January 2010; revised 10 June 2010; accepted 16 June 2010; published online 27 July 2010

emerged as a significant factor in the development and growth of many types of cancer, playing an important role in cancer-cell proliferation, angiogenesis and metastasis. This gene encodes a 170-kDa membrane glycoprotein that can be activated by phosphorylation and induce a downstream signalling transduction cascade. A major signalling route of the EGFR is the Ras-Raf-MAPK pathway (Klapper *et al*, 2000). Activation of Ras initiates a multistep phosphorylation cascade that leads to the activation of MAPKs. The MAPK extracellular signal-regulated kinases ERK1/2 are the best characterised and are most strongly associated with human cancer. The ERK1/2 are activated by dual phosphorylation on a tyrosine and a threonine residue by dual-specificity kinases, and subsequently regulate cell transcription and have been linked to proliferation, survival and transformation (Lewis *et al*, 1998).

The EGFR antagonists are included in treatment protocols of advanced stages of non-small cell carcinoma of the lung, colorectal cancer and head and neck squamous cell carcinoma (Ciardello and Tortora, 2008). In head and neck tumours, EGFR can be abnormally activated and protein overexpression by the neoplastic cells is frequently detected by immunohistochemistry (Nicholson *et al*, 2001; Grandis and Sok, 2004). However, EGFR amplifications are not frequent and EGFR activating mutations are very rare (Kalyankrishna and Grandis, 2006). The EGFR overexpression has been correlated with poor prognosis in head and neck cancer (Kalyankrishna and Grandis, 2006). To date, several clinical trials have been carried out to identify the molecular characteristics of the tumours predictive of response to EGFR antagonists. The EGFR activating mutations and increased EGFR gene copy number identify the most sensitive population in these tumours (Cappuzzo *et al*, 2005; Hirsch *et al*, 2005; Tsao *et al*, 2005; Sartore-Bianchi *et al*, 2007). In most MECs of the salivary gland, the EGFR protein is overexpressed (Gibbons *et al*, 2001; Shang *et al*, 2007), but EGFR activating mutations are extremely rare (Han *et al*, 2008; Dahse and Kosmehl, 2008; Dahse *et al*, 2009). However, studies on the EGFR gene copy number have not been performed before in a series of salivary gland MECs.

In our previous studies, we saw that high-grade MECs with aggressive course differ molecularly from low-grade tumours. These high-grade tumours overexpress the oncogenic glycoprotein MUC1 (Alos *et al*, 2005; Handra-Luca *et al*, 2005). MUC1 acts as a proto-oncogene that interacts with EGFR and correlates with MAPK activation in mouse models (Schroeder *et al*, 2001) and inhibits the ligand-mediated ubiquitination and degradation of EGFR *in vitro* (Pochampalli *et al*, 2007). Moreover, the expression of ERK1/2 MAPKs has been related to aggressive tumour behaviour in MECs of the salivary glands (Handra-Luca *et al*, 2003). We therefore hypothesised that histological high-grade MECs, which have a clinically aggressive course, may harbour EGFR protein overexpression and high-EGFR gene copies linked to aggressive tumour biology. To investigate this, we studied the EGFR gene by using chromogenic *in situ* hybridisation (CISH) with a dual-colour probe, in a series of 43 MECs. This new technique obtains the same results as fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) and offers potential advantages over FISH to detect gene copy number, including the ability to distinguish between areas of tumour and normal tissue.

In addition to genetic analysis, the immunohistochemical study of the EGFR protein was performed and activated ERK1/2 were assessed by using an antibody specific for the dually phosphorylated and activated ERK1 and ERK2 (MAPK phospho-p44/42). These molecular studies have been correlated with the histological characteristics of the tumours and the follow-up of the patients.

MATERIALS AND METHODS

Selection of cases

Forty-three MECs diagnosed at the Department of Pathology of the Hospital Clinic, and Hospital Princesps d'Espanya, Bellvitge,

University of Barcelona, from 1996 until 2005, were reviewed. The medical records were obtained from patients' files in the Departments of Otorhinolaryngology and Maxillofacial Surgery. The study was approved by the Local Ethical Committee and patients gave their informed consent. At diagnosis, the tumours were staged according to the American Joint Committee on Cancer (Sobin and Wittekind, 2002). All patients underwent primary surgery as standard treatment. Lymph node dissection was performed only in cases with lymph node metastases. Full-dose radiotherapy was applied after tumour excision with positive margins, when lymph node metastases were assessed, and in locoregional recurrences. Chemotherapy with cisplatin was added for palliative purposes, in patients with lymph node metastases (N2 or N3) and in cases with tumoural persistence after surgery and resistance to radiotherapy.

Histological grading of MECs

Haematoxylin-eosin and alcian blue-stained slides and paraffin wax-embedded material were available for all cases. The MECs were graded following the 2005 World Health Organization Classification of Tumours (Goode and El-Naggar, 2005).

CISH and immunohistochemistry

Representative paraffin wax blocks were selected from each of the 43 cases for CISH and immunohistochemistry.

The CISH was performed on a 4- μ m section of each tumour that was deparaffined in two changes of xylene and three washes of degraded ethanol for 3 min each. The slides were pretreated with CISH pretreatment buffer (Dako, Carpinteria, CA, USA) and heated to 92°C, and then rinsed with distilled water. The tissues were digested for 10 min with pepsin digestion solution (Dako) at room temperature, washed twice in distilled water for 5 min each, dehydrated in 70, 85 and 96% alcohol for 2 min each and dried. A measure of 10 μ l of dual-colour EGFR Spectrum-red/CEP7 Spectrum-blue probe (Dako) were applied to each slide. Sections were covered with coverslips and denatured on a hot plate at 82°C for 5 min. Hybridisation was done overnight at 37°C. Then the slides were washed in 2 \times SSC at 73°C for 2 min and three times in distilled water. Then the sections were blocked with H₂O₂ in absolute methanol and incubated with a blocking reagent for 10 min at room temperature. The hybridisation signals were detected after sequential incubations with anti-mouse anti-DIG (60 min at room temperature), polymerised horseradish peroxidase anti-mouse antibody (60 min) and 3,3'-diaminobenzidine (DAB). The sections were counterstained with haematoxylin.

Immunohistochemical studies were carried out using the automated immunohistochemical system TechMate 500 (Dako), and the EnVision system (Dako). Briefly, 4 μ m sections were deparaffinised and hydrated using graded alcohols and water. For antigen retrieval, an autoclave pretreatment at 120°C for 5 min was performed. Peroxidase was blocked for 7.5 min in ChemMate peroxidase-blocking solution (Dako). The slides were incubated with the primary antibodies for 30 min and washed in ChemMate buffer solution (Dako). The peroxidase labelled polymer was then applied for 30 min. After being washed in ChemMate buffer solution, the slides were incubated with DAB substrate chromogen solution, washed in water, counterstained with haematoxylin, washed, dehydrated and mounted. The primary antibodies used in the study were: EGFR (Dako; dilution 1:100) and pERK1/2 (Phospho-p44/42; Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; dilution 1:50). Appropriate positive and negative controls were used.

The CISH and immunohistochemical results were evaluated by two independent observers (BL and LA). For CISH evaluation, a light microscope under a \times 40 objective was used. A total number of 100 tumoural cells were evaluated. The centromeric blue signal

and the EGFR red signal in each cell were counted and the proportion centromeric/EGFR signal number was calculated. The cases were considered normal if two blue and two red signals were visualised in each nuclear cell. Polysomy was considered when ≥ 3 blue and red signals (in equal number) were seen in each nucleus. The EGFR amplification was defined as red signals > 1.5 blue signals.

The immunostain for EGFR was evaluated: 0, no positive cells; 1+, low discontinuous membrane staining; 2+, unequivocal membrane staining with moderate intensity and 3+, strong and complete membrane staining. Only cases with 2+ and 3+ staining patterns were considered positive. The pERK1/2 showed nuclear positivity. For analytical purposes, positivity for EGFR and pERK1/2 was considered when $\geq 10\%$ of tumour cells were positive. High-pERK1/2 expression was considered when $\geq 30\%$ of positive cells were detected.

Statistical analysis

The continuous clinical variables considered were follow-up and age (median and range were calculated). Overall survival was calculated from diagnosis to the death of the patient or loss of follow-up. Disease-free interval was the time from surgical excision of the tumour to the first recurrence or metastasis. Both overall survival and disease-free interval were analysed by the Kaplan–Meier method. The categorical clinical variables were gender (female/male), location of tumours (parotid/submaxillary/minor salivary gland) and stage (I/II/III/IV). The categorical histological variables considered were histological grade (1/2/3) and molecular results: EGFR protein expression (positive/negative), EGFR gene copy (normal/polysomy) and ERK1/2 expression ($> 30\%$ of positive cells/ $< 30\%$ of positive cells). Fisher's exact test was used for comparison between qualitative variables and Student's *t*-test and ANOVA were applied for quantitative variables according to the application conditions. All tests were two sided. Differences were analysed by the log-rank method. Differences were considered to be statistically significant with an α risk of 0.05.

RESULTS

Clinicopathological characteristics of the patients

The clinicopathological characteristics of the patients at diagnosis, the treatment details and outcome are summarised in Table 1.

After a median follow-up of 62 months, 33 (76.8%), 6 (13.9%) and 4 (9.3%) patients were alive and disease free, alive with disease and died of disease, respectively. The median disease-free interval was 96 months (range 0–159 months). Relapses occurred in 19 (44.1%) patients: in 14 (32.6%) patients, a local tumoural recurrence took place, and in 5 (11.6%) patients, there was lymph node metastasis.

The statistical associations of the disease-free interval and overall survival with histological grade of tumours and molecular results are expressed in Table 2. Patients with high-grade tumours had shorter disease-free interval ($P = 0.001$) and overall survival ($P = 0.001$) than those with low- and intermediate-grade tumours.

EGFR gene analysis

Eight cases (18.6%) had chromosome 7 polysomy. In these cases, there were > 2 signals of both centromere and EGFR signals in over 70% of cells, but the relationship between both signals was 1:1. In two cases there were 3 signals (low polysomy) and in six cases there were > 3 signals (high polysomy). No cases with EGFR amplification were detected. All of the eight cases with chromosome 7 polysomy were high-grade MECs, whereas the rest of the tumours (27 low grade, 5 intermediate grade and 3 high grade) showed a normal pattern of expression ($P < 0.001$). Chromosome 7

Table 1 Clinicopathological characteristics of the patients at diagnosis, treatment details and outcome

Characteristic	No. of cases (%)
Patient number	43
Age (years)	
Median (range)	53 (4–82)
Gender	
Female	23 (53.5%)
Male	20 (46.5%)
Tumour location	
Parotid gland	22 (51%)
Minor salivary gland	15 (35%)
Submaxillary gland	6 (14%)
Histological grade of tumours	
Low grade	27 (63%)
Intermediate grade	5 (11.5%)
High grade	11 (25.5%)
Stage	
I	19 (44%)
II	6 (14%)
III	3 (7%)
IV	15 (35%)
Primary treatment	
Radical surgery	36 (83.7%)
Surgery and full-dose radiotherapy	7 (16.3%)
Outcome	
Alive and disease free	33 (76.8%)
Alive with disease	6 (13.9%)
Died of disease	4 (9.3%)

Table 2 Relationship between histological grade of tumours, EGFR gene copy number, EGFR expression and pERK1/2 expression with disease-free interval (DFI) and overall survival (OS)

Variable	DFI	OS
Histological grade 3 vs 2+1	$P = 0.001$	$P = 0.001$
EGFR gene copy number Polysomy vs normal	$P = 0.003$	$P = 0.019$
EGFR protein expression Positive vs negative	$P = 0.286$	$P = 0.307$
pERK1/2 expression Positive vs negative	$P = 0.004$	$P = 0.001$

Abbreviations: EGFR = epidermal growth factor receptor; pERK1/2 = activated extracellular signal-regulated kinases.

polysomy was associated with shorter disease-free interval ($P = 0.003$) and overall survival ($P = 0.019$) (Figure 1).

EGFR and pERK1/2 protein expression

The EGFR protein expression was positive in 34 tumours (79%). All cases with chromosome 7 polysomy showed expression of the EGFR protein ($P < 0.001$). These cases showed positivity in $> 60\%$ of tumoural cells. High-EGFR protein expression was associated with high-histological grade of tumour ($P < 0.001$, ANOVA), but it

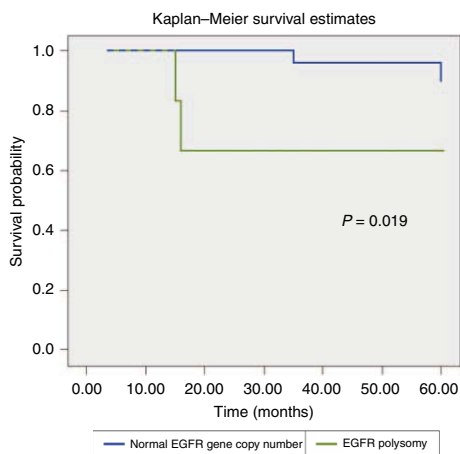


Figure 1 Kaplan–Meier curve for overall survival stratified by CISH results (normal EGFR gene copy number vs increased EGFR gene copy number).

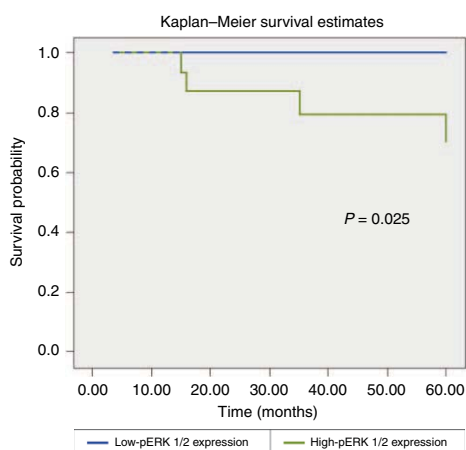


Figure 2 Kaplan–Meier curve for overall survival stratified by activated ERK1/2 expression (low-pERK1/2 expression vs high-pERK1/2 expression).

was associated with neither disease-free interval ($P=0.286$) nor overall survival ($P=0.307$).

The pERK1/2 protein was expressed in 34 tumours (79%). There was a statistical correlation between pERK1/2 positivity and histological grade of tumour ($P<0.001$, ANOVA), shorter disease-free interval ($P=0.004$) and overall survival ($P=0.001$). High-pERK1/2 expression (positivity in $\geq 30\%$ of neoplastic cells) was observed in 21 tumours (49%). High-pERK1/2 expression was associated with shorter overall survival ($P=0.025$) (Figure 2), but not with disease-free interval ($P=0.108$). All cases with EGFR polysomy had high expression of pERK1/2 ($P=0.002$) and there

was a marginally significant correlation between high expression of pERK1/2 and EGFR immunohistochemical expression ($P=0.047$) (Figure 3).

DISCUSSION

This study shows that high-grade MECs with aggressive behaviour harbour an increased EGFR gene copy number and high expression of pERK1/2 MAPKs. In spite of the fact that EGFR amplification was not seen in any of the 43 cases of this series, in six of them there was high polysomy with ≥ 4 EGFR gene copies. The EGFR gene is rarely amplified in human cancers, but the increased EGFR gene copy number with balanced chromosome 7 polysomy in cancer cells is relatively frequent, in ~ 24 –40% of patients with non-small cell lung cancer, squamous-cell carcinoma of the head and neck or colorectal cancer. Chromosome 7 polysomy has been linked to tumour aggressiveness and poor clinical outcome (Hirsch *et al*, 2003; Ciardello and Tortora, 2008). In this study, all cases with EGFR gene gains had a significant shorter disease-free interval and overall survival. The EGFR product is a membrane glycoprotein composed of an extracellular ligand-binding domain, a transmembrane lipophilic component and an intracellular protein kinase domain. The ligand binding induces EGFR dimerisation, activation of the intrinsic tyrosine kinase protein and tyrosine phosphorylation with the activation of a cascade of biochemical and physiological responses (Lewis *et al*, 1998). This downstream signalling transduction activates MAPKs through phosphorylation by MAPK kinases, and the activation of this pathway is associated with cell proliferation and oncogenic transformation (Grandis and Sok, 2004). In this series, there was a significant correlation between increased EGFR copy number and high expression of pERK1/2 ($P=0.002$). High expression of activated ERK1/2 has been related to tumour progression in several neoplasms (Albanell *et al*, 2001; Adeyinka *et al*, 2002) and in salivary gland MECs (Handra-Luca *et al*, 2003). In this series, the pERK1/2 expression was significantly correlated with shorter disease-free interval and overall survival. Furthermore, MAPKs can also be activated through the upstream activation of HER2/neu or RAS. About one third of salivary gland MECs have HER2/neu gene amplification (Press *et al*, 1994) and about one fifth of MECs harbour H-RAS mutations (Yoo and Robinson, 2000a), but K-RAS mutations are extremely rare (Yoo and Robinson, 2000b). However, to define the molecular mechanisms underlying the biological behaviour in high-grade MECs, *in vitro* experiments with cell lines should be carried out.

The immunohistochemical expression of EGFR in the majority of MECs that we have observed is concordant with other studies (Gibbons *et al*, 2001; Shang *et al*, 2007). All cases with chromosome 7 polysomy had an expression of EGFR protein of over 60% of cells. Nevertheless, most immunohistochemical positive cases failed to show an increased EGFR gene copy number. This discrepancy between the EGFR gene copy number and the immunohistochemical detection of the protein has been reported before in several cancers, and has been attributed to a post-transcriptional phenomenon mediated at the mRNA level (Grandis and Twardy, 1993). There was a significant correlation between the EGFR protein expression and the histological grade of the tumours, but not with the clinical outcome of the patients. The current grading system classification is three-tiered, and tumours are classified into low-, intermediate- and high-grade MECs, depending on the architecture and cellular characteristics of the neoplasms. Low-grade tumours are usually well-defined tumours, often cystic with a predominance of mucous cells, whereas high-grade MECs usually have an infiltrative pattern of growth, are solid and mainly composed of intermediate type and epidermoid cells. High mitotic index, cellular anaplasia, necrosis and perineural invasion are characteristics of high-grade tumours (Spiro, 1986;

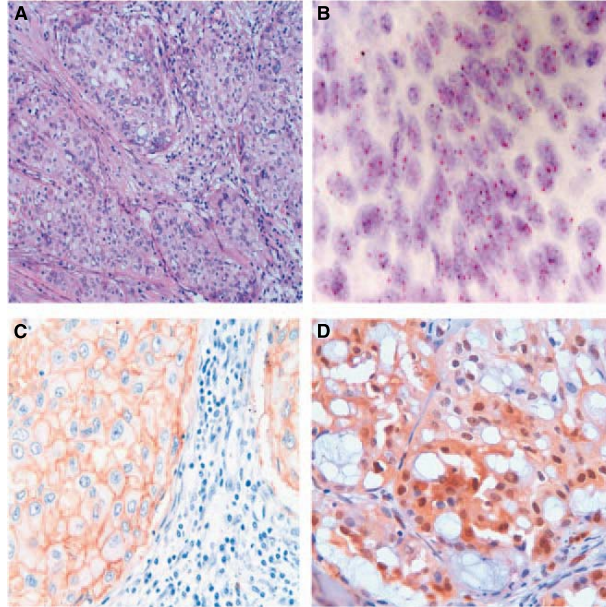


Figure 3 An example of high-grade mucoepidermoid carcinoma. (A) Histological characteristics of the neoplasm (HE $\times 200$). (B) The CISH analysis shows high polysomy. Four or five signals (both red EGFR and blue centromere) are seen in each nucleus in most of the neoplastic cells (EGFR CISH $\times 630$). (C) Expression of EGFR protein with strong and diffuse membrane positivity (EGFR $\times 400$). (D) High expression of activated ERK1/2 with nuclear positivity in most of the neoplastic cells (pERK1/2 $\times 400$).

Ellis and Auclair, 2008). Significant differences in the outcome of the patients related to histological grade have been repeatedly confirmed in series of MECs of the salivary glands (Goode *et al*, 1998; Alos *et al*, 2005; Nance *et al*, 2008). In this study, a statistical correlation between the histological grade and disease-free interval and overall survival of the patients was found. The prognostic value of the EGFR polysomy, and the EGFR and the pERK1/2 protein expressions were related to the histological grade.

Strategies against EGFR include monoclonal antibodies able to bind to the extracellular domain of the receptor such as cetuximab, or small molecule ATP-competitive tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as gefitinib and erlotinib. Some clinical, histopathological and molecular characteristics have been proposed for identifying the population sensitive to EGFR-TKI treatment in non-small carcinoma of the lung (Sone *et al*, 2007). Activating mutation in exons 18, 19 and 21 of the EGFR gene has proved to be a significant factor in predicting response to EGFR-TKIs in non-small cell carcinoma of the lung. However, these mutations are less common in the United States and European population than in the Asian population (Sone *et al*, 2007), and data from large randomised studies indicate that increased EGFR gene copy number is probably the best factor in predicting response and evaluate overall survival of the patients (Hirsch *et al*, 2005; Tsao *et al*, 2005; Cappuzzo *et al*, 2005). Interestingly, a good response to EGFR antagonists in head and neck and lung carcinomas with expression of MAPKs has been observed (Albanell *et al*, 2001; Gandara *et al*, 2004). Moreover, immunohistochemical positivity for activated ERK1/2 has been correlated with a good response to MAPKs inhibitors in clinical trials on cutaneous melanomas

(Jilaveanu *et al*, 2009). Therefore, the high-grade MECs in this series, with increased EGFR gene copy number and pERK1/2 high expression could be sensitive to EGFR or MAPKs antagonists.

The MECs of the lung share histological and molecular characteristics with salivary gland MECs. Some series on lung MECs have shown lack of EGFR mutations in these tumours and a percentage of chromosome 7 polysomy of 17%, similar to the results in our series (Macarenco *et al*, 2008). However, some lung MECs have been described as having activating EGFR mutations in the Asian population (Han *et al*, 2008). The MECs and adenosquamous carcinomas share histological characteristics and differential diagnosis between both tumour types may be challenging in the head and neck region and lung (Alos *et al*, 2004; Rossi *et al*, 2009). Adenosquamous carcinomas are aggressive tumours arising from upper or lower airways, whereas MECs have a salivary or bronchial gland origin, whose prognosis depends on the histological grade. Adenosquamous carcinomas usually harbour EGFR activating mutations, whereas MECs do not (Kang *et al*, 2007; Han *et al*, 2008; Macarenco *et al*, 2008; Rossi *et al*, 2009). Previous studies on salivary gland MECs have found that EGFR mutations are extremely rare (Han *et al*, 2008; Dahse and Kosmehl, 2008; Dahse *et al*, 2009).

To date, few cases on metastatic salivary gland MECs with EGFR gene gains with chromosome 7 polysomy and good response to EGFR monoclonal antibody cetuximab have been published (Grisanti *et al*, 2008). However, clinical trials that include a large series of salivary gland MECs are difficult to carry out because of the low number of these cases in each institution.

In conclusion, we have identified that high-grade salivary gland MECs usually have an increased EGFR gene copy number and

highly express pERK1/2. The activation of the EGFR/ERK pathway in these tumours is associated with aggressive behaviour and could represent potential indicators of response to EGFR antagonists or MAPK pathway inhibitors.

REFERENCES

Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC (2002) Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 8: 1747–1753

Agulnik M, Siu LL (2004) An update on the systemic therapy of malignant salivary gland cancers: role of chemotherapy and molecular targeted agents. *Curr Med Chem* 4: 543–551

Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, Del Campo JM, Sauleda S, Anido J, Raspall G, Giralt J, Rosello J, Nicholson RI, Mendelsohn J, Baselga J (2001) Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 61: 6500–6510

Alos L, Castillo M, Nadal A, Caballero M, Mallofre C, Palacin A, Cardesa A (2004) Adenosquamous carcinoma of the head and neck: criteria for diagnosis in a study of 12 cases. *Histopathology* 44: 570–579

Alos L, Lujan B, Castillo M, Nadal A, Carreras M, Caballero M, de Bolos C, Cardesa A (2005) Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands. *Am J Surg Pathol* 29: 806–813

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witts S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Dogliani C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Varella-Garcia M (2005) Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 97: 643–655

Ciardello F, Tortora G (2008) EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358: 1160–1174

Dahse R, Driemel O, Schwartz S, Dahse J, Kromeyer-Hauschild K, Berndt A, Kosmehl H (2009) Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations are rare in salivary gland carcinomas. *Br J Cancer* 100: 623–625

Dahse R, Kosmehl H (2008) Detection of drug-sensitizing EGFR exon 19 deletion mutations in salivary gland carcinoma. *Br J Cancer* 99: 90–92

Ellis GL, Auclair PL (2008) Mucoepidermoid carcinoma. In *Atlas of Tumour Pathology. Tumours of the Salivary Glands*, Silverberg SG, Sobin LH (eds), pp 173–193. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC

Gandara DR, West H, Chansky K, Davies AM, Lau DHM, Crowley J, Gumerlock PH, Hirsch FR, Franklin WA (2004) Bronchioloalveolar carcinoma: a model for investigating the biology of epidermal growth factor receptor inhibition. *Clin Cancer Res* 10: 4205s–4209s

Gibbons MD, Manne U, Carroll WR, Peters GE, Weiss HL, Grizzle WE (2001) Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope* 111: 1373–1378

Goode RK, Auclair PL, Ellis GL (1998) Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer* 82: 1217–1224

Goode RK, El-Naggar AK (2005) Mucoepidermoid carcinoma. In *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (eds), pp 219–220. IARC Press: Lyon

Grandis JR, Sok JC (2004) Signalling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther* 102: 37–46

Grandis JR, Tweardy DJ (1993) Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53: 3579–3584

Grisanti S, Amoroso V, Buglione M, Rosati A, Gatta R, Pizzocaro C, Ferrari VD, Marini G (2008) Cetuximab in the treatment of metastatic mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: a case report and review of literature. *J Med Case Reports* 2: 320–324

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Elena Gonzalvo for performing the immunohistochemical techniques, and Gemma Laguna for secretarial assistance.

Haddad R, Colevas AD, Krane JF, Cooper D, Glisson B, Amrein PC, Weeks L, Costello R, Posner M (2003) Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study. *Oral Oncol* 9: 724–727

Han SW, Kim HP, Jeon YK, Oh DY, Lee SH, Kim DW, Im SA, Chung DH, Heo DS, Bang YJ, Kim TY (2008) Mucoepidermoid carcinoma of lung: potential target of EGFR-directed treatment. *Lung Cancer* 61: 30–34

Handra-Luca A, Bilal H, Bertrand JC, Fouret P (2003) Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Am J Pathol* 163: 957–967

Handra-Luca A, Lamas G, Bertrand JC, Fouret P (2005) MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC expression in salivary gland mucoepidermoid carcinoma: diagnostic and prognostic implications. *Am J Surg Pathol* 29: 881–889

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn Jr PA, Di Maria MV, Veve R, Bremnes RM, Baron AE, Zeng C, Franklin WA (2003) Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 21: 3798–3807

Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier AC, Gumerlock P, Bunn Jr PA, Franklin W, Crowley J, Gandara DR (2005) Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence *in situ* hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 23: 6838–6845

Jilaveanu L, Zito C, Lee SJ, Nathanson KL, Camp RL, Rimm DL, Flaherty KT, Kluger HM (2009) Expression of sorafenib targets in melanoma patients treated with carboplatin, paclitaxel and sorafenib. *Clin Cancer Res* 15: 1076–1085

Kalyankrishna S, Grandis JR (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 24: 2666–2672

Kang SM, Kang HJ, Shin JH, Kim H, Shin DH, Kim SK, Kim JH, Chung KY, Kim SK, Chang J (2007) Identical epidermal growth factor receptor mutations in adenocarcinomatous and squamous cell carcinomatous components of adenosquamous carcinoma of the lung. *Cancer* 109: 581–587

Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y (2000) Biochemical and clinical implications of ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 77: 25–79

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74: 49–139

Macareno RS, Uphoff TS, Gilmer HF, Jenkins RB, Thibodeau SN, Lewis JE, Molina JR, Yang P, Aubry MC (2008) Salivary gland-type lung carcinomas: an EGFR immunohistochemical, molecular genetic, and mutational analysis study. *Mod Pathol* 21: 1168–1175

Nance MA, Seethala RR, Wang Y, Chiosea SI, Myers EN, Johnson JT, Lai SY (2008) Treatment and survival outcomes based on histologic grading in patients with head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Cancer* 113: 2082–2089

Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37(Suppl 4): S9–S15

Pochampalli MR, Bitler BG, Schroeder JA (2007) Transforming growth factor alpha dependent cancer progression is modulated by Muc1. *Cancer Res* 67: 6591–6598

Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG, El-Naggar AK (1994) Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 54: 5675–5682

Rossi G, Sartori G, Cavazza A, Tamperi S (2009) Mucoepidermoid carcinoma of the lung, response to EGFR inhibitors, EGFR and K-RAS mutations, and differential diagnosis. *Lung Cancer* 63: 159–160

Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronesi S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S (2007) Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 25: 3238–3245

- Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ (2001) Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem* **276**: 13057–13064
- Shang J, Shui Y, Sheng L, Wang K, Hu Q, Wei Q (2007) Epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor 2 expression in parotid mucoepidermoid carcinoma: possible implication for targeted therapy. *Oncol Rep* **19**: 435–440
- Sobin LH, Wittekind C (2002) *TNM Classification of Malignant Tumours. American Joint Committee on Cancer and International Union Against Cancer (UICC)*, 6th edn, Wiley and Sons: New York
- Sone T, Kasahara K, Kimura H, Nishio K, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Shibata K, Waseda Y, Fujimura M, Nakao S (2007) Comparative analysis of EGFR mutations and gene amplification as predictors of gefitinib efficacy in Japanese patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **109**: 1836–1844
- Spiro RH (1986) Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2807 patients. *Head Neck Surg* **8**: 177–184
- Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer J, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA (2005) Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* **353**: 133–144
- Yoo J, Robinson RA (2000a) H-ras gene mutations in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Cancer* **88**: 518–523
- Yoo J, Robinson RA (2000b) *ras* Gene mutations in salivary gland tumours. *Arch Pathol Lab Med* **124**: 836–839

V

Discusión

Discusión Estudio N° 1

En este trabajo hemos descrito por primera vez el patrón de expresión de las mucinas de membrana MUC1 y MUC4 y secretoras MUC2 MUC5AC, MUC5B, MUC6 en glándulas salivales normales y carcinomas mucoepidermoides. Además hemos podido correlacionar el patrón de expresión de las mucinas MUC1 y MUC4 con el comportamiento biológico de los tumores.

El CME es la neoplasia maligna más frecuente originada en las glándulas salivales (Ellis y Auclair 1996). El CME se compone de diferentes tipos celulares, y puede mostrar diferentes patrones de crecimiento, por lo tanto su diferente morfología histológica, depende del patrón y del tipo celular predominante. El comportamiento de los tumores se puede predecir por el grado histológico, que se define como bajo, intermedio y alto. Sin embargo, algunos CME de bajo grado pueden mostrar un curso agresivo (Auclair et al. 1992, Goode et al. 1998). Histológicamente, el CME de bajo grado a menudo tiene una arquitectura predominantemente quística con numerosas células mucosas, mínima atipia citológica y escasas mitosis. Los tumores de alto grado son predominantemente sólidos, con una predominancia de las células intermedias y epidermoides, y escasas células mucosas. La anaplasia, invasión perineural y necrosis son características de los tumores alto grado (Auclair et al. 1992, Goode et al. 1998, Seifert et al. 1991). Brandwein et al han agregado recientemente otras características histológicas de clasificación de estos tumores, como los márgenes infiltrantes, la invasión vascular y ósea,

para mejorar la reproducibilidad y la predicción en la conducta de estas neoplasias (Brandwein et al. 2001). En nuestra serie, la relación de las características clínicas y evoluciones de los pacientes y los grados histológicos de los tumores fueron concordantes con los resultados obtenidos por estos autores (Auclair et al. 1992, Brandwein et al. 2001, Goode et al. 1998).

Hasta la fecha, ha habido poca información sobre la expresión de las MUCs en las glándulas salivales normales y neoplásicas, al contrario de lo que ocurre en otros órganos como son el tracto gastrointestinal, mama, páncreas y pulmón, en los que la expresión de mucinas ha sido ampliamente explorada en condiciones normales y patológicas. MUC1 y MUC4 son MUCs de transmembrana o de membrana. En condiciones normales, estas MUCs actúan posiblemente como una barrera en la superficie apical de las células epiteliales, interviniendo en la regulación y protección tisular (Gendler et al. 1995, Hilkens et al. 1992). En nuestro estudio, las glándulas salivales normales de todo tipo (parótida, submaxilar y glándulas salivales menores) expresaron MUC1 y MUC4 en la membrana en los conductos excretores, estriado y intercalares, y ocasionalmente en las estructuras acinares. En estas estructuras, MUC1 fue positivo principalmente en las membranas celulares apicales, mientras que MUC4 mostró una positividad citoplasmática, principalmente en la zona apical o supranuclear. Estos resultados concuerdan con el resultado de otros trabajos (Ho et al. 1993, Liu et al. 2002).

Todos los tipos celulares (mucosas, epidermoides, intermedias, claras y columnares) mostraron tinción citoplásmica de MUC1 y MUC4, además de la membrana celular. Esto indica que en el desarrollo del proceso neoplásico hay alteraciones postranscripcionales que producen MUC1 glicosilada de forma aberrante (Brockhausen et al. 1995). Este hallazgo ha sido descrito en otras neoplasias, como en el adenocarcinoma de páncreas (Monges et al. 1999). Este cambio en el patrón de tinción puede ser útil como una herramienta de diagnóstico en biopsias pequeñas, para realizar el diagnóstico diferencial entre el CME y procesos reactivos de las glándulas salivales. La sobreexpresión frecuente de ambas MUCs con patrón de membrana favorece la hipótesis del origen del CME en estructuras ductales de las glándulas salivales, tal como ha sido sugerido con estudios de inmunohistoquímica para citoqueratinas. (Foschini et al. 2002) Además, hemos relacionado la expresión de ambos MUCs de membrana con el pronóstico de los CMEs. Hemos encontrado una correlación significativa entre la expresión de MUC1 y el grado histológico de los tumores, y hemos observado una alta expresión de MUC1 en CME de alto grado histológico. Estos tumores con una alta positividad de MUC1 tenían peor pronóstico, con un intervalo más corto libre de enfermedad, mayor tasa de recidivas y metástasis. La expresión de MUC1 reduce las adhesiones célula-célula y célula-matriz extracelular, (Hilkens et al. 1992) favoreciendo la invasión de

las células tumorales en el estroma subyacente, vasos linfáticos y sangre (Hiraga et al. 1998). La relación de una expresión alta de MUC1 con la agresividad del tumor se ha observado en otros tumores, como los adenocarcinomas de colon (Nakamori et al. 1994) y de mama. (McGuckin et al. 1995). Ya que MUC1 es un antígeno asociado a las células cancerosas circulantes, podría ser utilizado en pacientes con CME con alto grado para monitorizar el tratamiento y seguimiento, para la detección precoz de recidivas o metástasis, como ha sido propuesto en pacientes con carcinoma de mama (Graves et al. 1998). Por otra parte, en el futuro, los pacientes con CME de alto grado podrían beneficiarse de nuevas estrategias terapéuticas. MUC1 ha sido propuesto como una diana terapéutica en la inmunoterapia para el tratamiento de algunos carcinomas (Von Mensdorff-Pouilly et al. 2000).

En nuestro estudio, la expresión de MUC4 tuvo resultados opuestos en cuanto a su valor pronóstico. De hecho, la expresión de MUC1 se correlacionó inversamente con la expresión MUC4. Los CME de bajo grado histológico mostraron alta expresión de MUC4. La expresión de MUC4 se correlacionó inversamente con la progresión del tumor: los CMEs con alta expresión de MUC4 tenían mejor pronóstico, mayor intervalo libre de enfermedad y menor tasa de recidivas y de metástasis. MUC4 es un marcador de epitelio bien diferenciado (Jepson et al. 2002) y se sobreexpresa en algunas neoplasias bien diferenciadas, tales como los tumores de ovario,

(Giuntoli et al. 1998) y no se expresa en el carcinomas con líneas celulares pobremente diferenciadas o indiferenciadas (Jonckheere et al. 2004). Al contrario, en otras neoplasias de varios órganos, tales como los adenocarcinomas de páncreas y de mama, la expresión alta de MUC4 se ha relacionado con un tumor más agresivo. (Komatsu et al. 2000, Singh et al. 2004) MUC4 tiene dos dominios semejantes al del factor de crecimiento epidérmico (EGF-like), uno de los cuales actúa como ligando intramembranoso, y fosforila y activa el receptor tirosín-quinasa ErbB2. (Carraway et al. 1999) El pronóstico desfavorable que se atribuye a MUC4 se debe a varios mecanismos, tales como un aumento en la acción de ErbB2, un cambio en las vías de señalización que conducen a una disminución de la apoptosis, y a una alteración en la adhesión de células tumorales. (Jepson et al. 2002, Komatsu et al. 2000, Singh et al. 2004) Aproximadamente el 25-38% de los carcinomas mucoepidermoides expresan ErbB2, y esta expresión se relaciona con la progresión del tumor, dando lugar a un pronóstico desfavorable (Press et al. 1994, Weed et al. 2004). Por tanto, la expresión MUC4 en tumores humanos puede ser un indicador de diferenciación de células tumorales o bien un marcador y mediador de crecimiento tumoral y de progresión. Teniendo en cuenta estas funciones de MUC4, es comprensible que MUC4 pueda ser un marcador de buen o mal pronóstico, dependiendo del tipo de tumor. En este estudio se confirma que el CME de glándulas salivales bien diferenciado, de bajo grado, muestra alta expresión de MUC4,

y en esta neoplasia, MUC4 es un indicador de buen pronóstico. Estos hallazgos son concordantes con un estudio recientemente publicado (Weed et al. 2004). Según nuestros resultados, el valor pronóstico de las expresiones de MUC1 y de MUC4 están principalmente relacionadas con el grado histológico. Resultados similares sobre la expresión de mucinas y su valor pronóstico en carcinomas mucoepidermoides de glándula salival fueron publicados con posterioridad a este trabajo (Handra-Luca et al. 2005).

MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6, son MUCs secretoras, codificadas por cuatro genes localizados en el cromosoma 11 en la región p15.5 (Pigny et al. 1996) . En las glándulas salivales normales de nuestro estudio, MUC2 y MUC5AC fueron focalmente positivas en algunos casos, y se marcaron escasas células de los conductos excretores, mientras que, ambos MUCs fueron negativos en las estructuras acinares. Otros estudios utilizando métodos de PCR han observado una expresión heterogénea gen de MUC2 en las estructuras ductales de las glándulas salivales (Ho et al. 1993). MUC5B, también llamada MG1 (glicoproteína mucosa 1), y MUC7, también llamada MG2 (glicoproteína mucosa 2), han sido detectadas en secreciones de las glándulas salivales. Estas MUCs desempeñan un papel importante en el mantenimiento de las propiedades viscoelásticas y reológicas en la saliva y para facilitar la unión y eliminación los microorganismos orales. El origen acinar de MUC5B y MUC7 en las glándulas salivales

ya ha sido sugerido previamente (Nielsen et al. 1996), pero nuestras observaciones confirman que MUC5B se encuentra constantemente en acinos mucosos y MUC7 en acinos serosos de las glándulas salivales submandibular y las glándulas salivales menores. Sin embargo, los acinos serosos de la parótida son sólo focalmente positivos para MUC7 en algunos casos. Estudios recientes utilizando microscopía inmunoelectrónica, han obtenido resultados similares (Piludu et al. 2003).

Las MUCs secretoras en los CMEs resultaron de forma diversa. MUC2 fue positiva en más del 5% de las células neoplásicas en sólo dos casos, y se marcaron células mucosas. La expresión de genes MUC2 se ha relacionado con una “vía mucinosa de la carcinogénesis” (Adsay et al. 2002), ya que ha sido descrita como constante positiva en los carcinomas mucinosos de los diferentes órganos, como el de colon, páncreas, mama, ovario y estómago, pero rara vez en los carcinomas no-mucinosos (Adsay et al. 2002, Hanski et al. 1997, Lopez-Ferrer et al. 2000, Reis et al. 2000). Nuestros resultados sugieren que el carcinoma mucoepidermoide se desarrolla a través de una vía diferente a la descrita para los tumores mucinosos.

Aunque MUC6 fue siempre negativo en la glándula salival normal, los CMEs mostraron expresión anormal en aproximadamente un tercio de los tumores, con expresión principalmente en células con diferenciación glandular, pero también en células epidermoides en

algunos casos. La expresión de MUC2 y MUC6 se ha relacionado con un buen pronóstico en los carcinomas mucinosos, ya que se ha sugerido que estos MUCs pueden actuar como una barrera para la extensión neoplásica (Adsay et al. 2002). En tumores de las glándulas salivales, MUC2 y MUC6, han sido poco estudiadas, pero ambas se expresan en carcinomas ductales tipo coloide de la glándula salival, un tumor muy agresivo (Simpson et al. 2003). En los CMEs no se ha encontrado relación entre la expresión de MUC2 y MUC6 y el comportamiento biológico de los tumores. En nuestro estudio, MUC5AC y MUC5B mostraron un similar patrón de expresión en los CMEs, y fueron positivas en la mayor parte de las células mucinosas y en algunas células columnares. Ambas MUCs fueron positivas en la mayoría de los CMEs, pero sobretodo en los tumores de bajo grado, a menudo compuestos fundamentalmente de células mucosas y columnares. Por el contrario, MUC7 fue negativo en la mayoría de los tumores. En conclusión, la transformación maligna en los CMEs de la glándula salival se asocia con cambios en los patrones de expresión de las MUCs y éstos podrían ser utilizados con fines diagnósticos. MUC1 y MUC4 están sobreexpresadas principalmente en la membrana y el citoplasma de las células neoplásicas. MUC5AC, MUC5B y MUC6 se expresan a menudo, sobre todo en las células glandulares diferenciadas; mientras que MUC2 y MUC7 rara vez se expresan. La diferenciación del tumor modula de forma diferente la

expresión de MUC1 y MUC4. La alta expresión de MUC1 y baja de MUC4 son características de los tumores pobremente diferenciados y agresivos, mientras que los tumores de bajo grado con comportamiento favorable tienen baja expresión de MUC1 y alta expresión de MUC4.

Discusión Estudio N° 2

Este estudio muestra que los CMEs de alto grado, con un comportamiento agresivo, tienen un incremento del número de copias del gen EGFR y una alta expresión de las MAPKs pERK1/2. A pesar del hecho de que la amplificación de EGFR no se observó en ninguno de los 43 casos de esta serie, en seis de ellos hubo alta polisomía con ≥ 4 copias del gen EGFR. El gen EGFR rara vez se amplifica en los cánceres humanos, pero es relativamente frecuente el incremento equilibrado en el número de copias del gen EGFR con una polisomía del cromosoma 7, en ~24-40% de casos de cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello o cáncer colorrectal. La polisomía del cromosoma 7 se ha relacionado con la agresividad del tumor y peor evolución clínica (Hirsch et al. 2003, Ciardello y Tortora 2008). En este estudio, todos los casos con ganancias del gen EGFR han tenido un intervalo libre de enfermedad y una supervivencia global significativamente más cortos. El producto del EGFR es una glicoproteína de membrana compuesta de un dominio, de unión al ligando, extracelular, un componente lipofílico de transmembrana y un dominio intracelular tirosín-quinasa. La unión del ligando induce la dimerización del EGFR, la activación de la proteína tirosin-quinasa intrínseca por fosforilación de la tirosina, induciendo una cascada de respuestas fisiológicas y bioquímicas (Lewis et al. 1998). Esta transducción de señales activa las MAPKs través de la fosforilación de las quinasas MAPK,

y la activación de esta vía está asociada con la proliferación celular y la transformación oncogénica (Grandis y Sok 2004). En esta serie, hubo una correlación significativa entre el incremento en el número copias de EGFR y la expresión elevada de pERK 1/2 ($p = 0,002$). La alta expresión de ERK 1/2 en su forma activada se ha relacionado con la progresión del tumor en varias neoplasias (Albanell et al. 2001, Adeyinka et al. 2002) y en el CME de glándulas salivales (Handra-Luca et al. 2003). En este estudio, la expresión pERK1/2 se correlacionó con un intervalo libre de enfermedad y una supervivencia global significativamente menor. Por otra parte, las MAPKs pueden ser activadas también a través de la activación del HER2/neu o RAS. Aproximadamente un tercio de MEC de las glándulas salivales tienen una amplificación del gen HER2/neu (Press et al. 1994) y aproximadamente una quinta parte de los CMEs poseen mutaciones en H-RAS (Yoo y Robinson 2000a), pero las mutaciones en K-RAS son extremadamente raras (Yoo y Robinson 2000b).

La expresión inmunohistoquímica de EGFR en la mayoría de los CMEs que hemos observado es concordante con otros estudios (Gibbons et al. 2001, Shang et al. 2007). Todos los casos con polisomía del cromosoma 7 tuvieron una expresión de la proteína EGFR de más del 60% de las células. Sin embargo, la mayoría de los casos positivos para la inmunohistoquímica no mostró un mayor número de copias del gen EGFR.

Esta discrepancia entre el número de copias del gen EGFR y la detección inmunohistoquímica de la proteína ha sido reportada en varios tipos de cáncer, y se ha atribuido a un fenómeno post-transcripcional a nivel del ARNm (Grandis y Tweardy 1993). Hubo una correlación significativa entre la expresión de la proteína EGFR y el grado histológico de los tumores, pero no con la evolución clínica de los pacientes. El sistema de graduación actual de los CME es de tres grados: los tumores se clasifican en bajo, alto grado y grado intermedio, dependiendo de la arquitectura y las características celulares de las neoplasias. Los tumores de bajo grado suelen ser tumores bien definidos, a menudo quísticos con un predominio de células mucosas, mientras que, el CME alto grado suelen tener un patrón de crecimiento infiltrativo, sólidos y compuestos principalmente de células de tipo intermedio y epidermoides. Se ha confirmado en repetidas ocasiones en distintas series de CME de glándulas salivales que un alto índice de mitosis, anaplasia celular, necrosis e invasión perineural, son todas ellas características de los tumores de alto grado (Spiro 1986, Ellis y Auclair 2008). Las diferencias significativas en las evoluciones de los pacientes se relacionan con el grado histológico, (Goode et al. 1998, Alos et al. 2005, Nance et al. 2008). En este estudio, se encontró correlación estadística entre el grado histológico y el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global de los pacientes. El valor pronóstico de la

polisomía del EGFR y de la expresión de la proteína pERK 1/2, se relacionaban directamente con el grado histológico.

Las estrategias contra EGFR incluyen anticuerpos monoclonales que se unen al dominio extracelular del receptor, como el cetuximab, o pequeñas moléculas ATP-competitivas, inhibidoras de la tirosín-quinasa (TKIs), como gefitinib y erlotinib. Se han propuesto algunas de las características clínicas, histopatológicas y moleculares para la identificación de la población sensible al tratamiento con EGFR-TKI en el carcinoma no microcítico de pulmón (Sone et al. 2007). La activación de la mutación en los exones 18, 19 y 21 del gen de EGFR, ha demostrado ser un factor significativo para predecir la respuesta al EGFR-TKIs en carcinoma no microcítico de pulmón. Sin embargo, estas mutaciones son menos frecuentes en la población de los Estados Unidos y Europa que en la población asiática (Sone et al. 2007), y los datos de extensos estudios aleatorios indican que el incremento del número de copias del gen EGFR es probablemente el mejor factor para predecir la respuesta y evaluar la supervivencia global de los pacientes (Hirsch et al. 2005, Tsao et al. 2005, Cappuzzo et al. 2005). Curiosamente, se ha observado una buena respuesta a los antagonistas del EGFR en carcinomas de cabeza y cuello y pulmón con expresión de MAPKs (Albanell et al. 2001, Gándara et al. 2004). Por otra parte, la positividad inmunohistoquímica para ERK 1/2

activado se ha correlacionado con una buena respuesta a los inhibidores de las MAPKs en los ensayos clínicos con melanomas cutáneos (Jilaveanu et al. 2009). Por lo tanto, el CME de alto grado en esta serie, con incremento del número copias del gen EGFR y alta expresión de pERK 1/2 podría ser sensible a antagonistas de EGFR o MAPKs.

El CME de pulmón comparte características histológicas y moleculares con el CME de glándulas salivales. Algunas series de CME de pulmón han mostrado una falta de mutaciones de EGFR en estos tumores y un porcentaje de polisomía del cromosoma 7 del 17%, similar a los resultados de nuestra serie (Macarenco et al. 2008). Sin embargo, algunos CME de pulmón se han descrito como una activación de mutaciones de EGFR en la población asiática (Han et al, 2008). El CME y el carcinoma adenoescamoso comparten características histológicas, y el diagnóstico diferencial entre ambos tipos de tumores puede ser difícil en la región de cabeza y cuello y en el pulmón (Alos et al. 2004, Rossi et al. 2009). El carcinoma adenoescamoso es un tumor agresivo que se origina en las vías respiratorias superiores o inferiores, mientras que el CME tiene un origen de glándulas salivales o bronquiales y cuyo pronóstico depende del grado histológico. El carcinoma adenoescamoso suele tener mutaciones activadoras del EGFR, mientras que el CME no las tiene (Kang et al. 2007, Han et al. 2008, Macarenco et al. 2008, Rossi et al. 2009). Estudios previos

sobre CME de la glándula salival también han encontrado que las mutaciones del EGFR son extremadamente raras (Han et al. 2008, Dahse y Kosmehl 2008, Dahse et al. 2009).

Hasta la fecha, han sido publicados casos de metástasis de CME de glándulas salivales con ganancias del gen de EGFR y polisomía del cromosoma 7 y buena respuesta a cetuximab, anticuerpos monoclonales de EGFR (Grisanti et al. 2008). Sin embargo, los ensayos clínicos que incluyan una gran serie de CME de las glándulas salivales son difíciles de llevar a cabo debido al bajo número de estos casos en cada institución.

En conclusión, hemos identificado que los CMEs de alto grado de glándulas salivales, usualmente tienen un incremento del número de copias del gen de EGFR y una alta expresión de pERK 1/2. La vía de activación del EGFR/ERK en estos tumores está asociada con un comportamiento agresivo y podría representar un posible indicador de la respuesta a los antagonistas del EGFR o inhibidores de la vía MAPK.

VI

Conclusiones

1 La mayor parte de las glándulas salivales normales, tanto mayores como menores expresan MUC1 y MUC4 en las estructuras ductales y acinares. MUC2 y MUC5AC se expresan de forma focal en estructuras ductales excretoras, en una minoría de casos. MUC5B se expresa en acinis mucosos; MUC7 se expresa en acinis serosos. MUC6 no se expresa en glándulas salivales normales.

2 La expresión de MUC1 en los carcinomas mucoepidermoides (CMEs) se correlaciona con el grado histológico de los tumores: los CMEs de bajo grado tienen significativamente menor expresión de MUC1, mientras que los CMEs de alto grado tienen mayor expresión ($p < 0,001$). La alta expresión de MUC1 se correlaciona con la progresión de la enfermedad: los tumores con alta expresión tienen un intervalo libre de enfermedad más corto ($p = 0,0104$) y de presentación de metástasis a distancia ($p = 0,0131$).

3 La expresión de MUC4 en los CMEs es inversa a la de MUC1 ($p = 0,002$). Se correlaciona inversamente con el grado histológico de los tumores: los tumores de bajo grado tienen una alta expresión de MUC4, mientras que los de alto grado tienen menor expresión ($p < 0,001$). La expresión de MUC4 se correlaciona inversamente con la progresión neoplásica: los MECs con alta expresión de MUC4 presentan menor índice de recidivas tumorales y un intervalo libre de enfermedad más largo; los tumores con baja expresión de MUC4

presentan mayor índice de recidivas tumorales y un intervalo libre de enfermedad más corto ($p=0,0255$).

- 4** En los CMEs, MUC5AC y MUC5B tienen similar patrón de expresión: son positivos en las células mucosas y ocasionales células columnares. MUC2 y MUC7 se expresan en escasas células mucinosas de una minoría de CMEs; MUC6 puede expresarse en todo tipo de células de los CMEs, pero también en una minoría de casos. No hay relación con estas expresiones con el grado histológico, evolución o pronóstico de los tumores.
- 5** Un 18,6% de los CMEs, que se corresponden con el 72,7% de los tumores de alto grado histológico, tienen aumento del número de copias del gen EGFR, con polisomía del cromosoma 7.
- 6** Todos los pacientes con CME que tienen un aumento del número de copias del gen EGFR tienen un intervalo libre de enfermedad más corto ($p=0,003$), y una disminución de la supervivencia global ($p=0,019$).
- 7** Todos los tumores con aumento de copias del gen EGFR tienen alta expresión inmunohistoquímica de la proteína EGFR (en más del 60% de las células tumorales) ($p<0,001$) y de pERK1/2 (en más del 30% de las células tumorales) ($p= 0,002$)

- 8** La alta expresión inmunohistoquímica de la proteína EGFR se correlaciona con el grado histológico de los tumores ($p < 0,001$), pero no tiene correlación significativa con la evolución de los pacientes.
- 9** La expresión inmunohistoquímica de pERK1/2 se correlaciona con el grado histológico de los CMEs ($p < 0,001$), el intervalo libre de enfermedad ($p = 0,004$) y la supervivencia global de los pacientes ($p = 0,001$).
- 10** La alta expresión de MUC1 y la activación de la vía efectora EGFR/ERK que tienen los CMEs de alto grado podrían seleccionar estos pacientes como candidatos a tratamientos dirigidos contra dianas terapéuticas.

VII

Bibliografía

Abiose BO, Oyejide O, Ogunniyi J. *Salivary gland tumours in Ibadan, Nigeria: a study of 295 cases*. Afr J Med Sci 1990;19:195-199.

Accetta PA, Gray GF Jr, Hunter RM, Rosenfeld L. *Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands*. Arch Pathol Lab Med 1984;108:321-315.

Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC. *Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumourigenesis and breast cancer progression*. Clin Cancer Res 2002;8:1747-1753.

Adsay NV, Merati K, Andea A, Sarkar F, Hruban RH, Wilentz RE, Goggins M, Iocobuzio-Donahue C, Longnecker DS, Klimstra DS. *The dichotomy in the preinvasive neoplasia to invasive carcinoma sequence in the pancreas: differential expression of MUC1 and MUC2 supports the existence of two separate pathways of carcinogenesis*. Mod Pathol. 2002;15:1087–1095.

Aggarwal P, Lessie MD, Lin DI, Pontano L, Gladden AB, Nuskey B, Goradia A, Wasik MA, Klein-Szanto AJ, Rustgi AK, Bassing CH, Diehl JA. *Nuclear accumulation of cyclin D1 during S phase inhibits Cul4-dependent Cdt1 proteolysis and triggers p53-dependent DNA rereplication*. Genes Dev 2007;21:2908-2922.

Agulnik M, Siu LL. *An update on the systemic therapy of malignant salivary gland cancers: role of chemotherapy and molecular targeted agents*. *Curr Med Chem* 2004;4:543-551.

Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, Del Campo JM, Sauleda S, Anido J, Raspall G, Giralt J, Rosello J, Nicholson RI, Mendelsohn J, Baselga J. *Activated extracellular signal regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments*. *Cancer Res* 2001;61:6500-6510.

Alos L, Castillo M, Nadal A, Caballero M, Mallofre C, Palacin A, Cardesa A. *Adenosquamous carcinoma of the head and neck: criteria for diagnosis in a study of 12 cases*. *Histopathology* 2004;44:570-579.

Alos L, Lujan B, Castillo M, Nadal A, Carreras M, Caballero M, de Bolos C, Cardesa A. *Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands*. *Am J Surg Pathol* 2005;29:806-813.

Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmied MB, Ringel J, Friess H, Hollingsworth MA, Büchler MW, Aubert JP, Batra SK. *Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance*. Clin Cancer Res. 2001;7:4033–4040.

Auclair PL, Ellis GL, Gnepp DR, Wenig BN, Janney CG. *Salivary gland neoplasms: general considerations*. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, eds. *Surgical pathology of the salivary glands*. WB Saunders. Philadelphia, 1991:135-164.

Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. *Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases*. Cancer. 1992;69:2021-2030.

Audié JP, Janin A, Porchet N, Copin MC, Gosselin B, Aubert JP. *Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization*. J Histochem Cytochem. 1993;41:1479-1485.

Bitler B, Goverdhan A, Schroeder J. *MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor*. Journal of Cell Science 2010;123:1716-1723.

Bitler B, Menzl I, Huerta C, Sands B, Knowlton W, Chang A, Schroeder J. *Intracellular MUC1 Peptides Inhibit Cancer Progression*. Cancer Therapy: Preclinical 2011; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-08-1745

Boahene DK, Olsen KD, Lewis JE, Pinheiro AD, Pankratz VS, Bagniewski SM. *Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: The Mayo Clinic experience*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2004;130:849-856.

Braga VMM, Pemberton LF, Duhig T, Gendler SJ. *Spatial and temporal expression of an epithelial mucin, MUC1, during mouse development*. Development. 1992;115:427-437.

Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, Bodian C, Urken ML, Gnepp DR, Huvos A, Lumerman H, Mills SE. *Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading*. Am J Surg Pathol 2001;25:835-845.

Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J. *Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells*. Eur J Biochem. 1995;233:607-618.

Callender DL, Frankenthaler RA, Luna MA, Lee SS, Goepfert H. *Salivary gland neoplasms in children*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1992;118:472-476.

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Varella-Garcia M. *Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst 2005;97:643-655.

Carraway KL, Rossi EA, Komatsu M, Price-Schiavi SA, Huang D, Guy PM, Carvajal ME, Fregien N, Carraway CA, Carraway KL. *An intramembrane modulator of the ErbB2 receptor tyrosine kinase that potentiates neuregulin signalling*. J Biol Chem. 1999;274:5263-5266.

Castro EB, Huvos AG, Strong EW, Foote FW. *Tumors of the major salivary glands in children*. Cancer 1972;29:312-317.

Cawson RA, Gleeson MJ, Eveson JW. *The pathology and Surgery of de Salivary Glands*. Isis Medical Media. Oxford, 1997:117-169.

Chong GC, Beahrs OH, Chen ML, Hayles AB. *Management of parotid gland tumors in infants and children*. Mayo Clin Proc 1975;50:279-283.

Ciardello F, Tortora G. *EGFR antagonists in cancer treatment*. N Engl J Med 2008;358:1160-117.

Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Marquette CH, Wurtz A, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N. *From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes*. Int J Cancer. 2000;86:162–168.

Dahse R, Driemel O, Schwartz S, Dahse J, Kromeyer-Hauschild K, Berndt A, Kosmehl H. *Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations are rare in salivary gland carcinomas*. Br J Cancer 2009;100:623-625.

Dahse R, Kosmehl H. *Detection of drug-sensitizing EGFR exon 19 deletion mutations in salivary gland carcinoma*. Br J Cancer 2008;99:90-92.

Dawe CJ. *Tumours of the salivary and lachrymal glands, nasal fossa and maxillary sinuses*. IARC Sci Publ 1979;23:91-133.

De Bolos C, Garrido M, Real FX. *MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach*. Gastroenterology. 1995;109:723–734.

De Bolos C, Guma M, Barranco C, Garrido M, Kim YS, Real FX. *MUC6 expression in breast tissues and cultured cells: abnormal expression in tumors and regulation by steroid hormones*. Int J Cancer. 1998;77:193–199.

Di Palma S, Simpson RHW, Skalova A, Leivo I. *Mucoepidermoid carcinoma. Major and Minor Salivary Glands*, Chapter 5. In: Cardesa A, Sliemers P, eds. *Pathology of the Head and Neck*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 2006:146-147.

Ellies M, Laskawi R. *Diseases of the salivary glands in infants and adolescents*. Head Face Med 2010;6:1-7.

Ellies M, Schaffranietz F, Arglebe C, Laskawi R. *Tumors of the salivary glands in infants and adolescents*. J Oral Maxillofac Surg 2006;64:1049-1058.

Ellis GL, Auclair PL. *Tumors of the salivary glands. Atlas of Tumor Pathology*, 4th Series. Fascicle 17. Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC, 2008:1-48,173-196.

Ellis GL, Auclair PL. *Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Salivary Glands*. 3rd Series. Fascicle 17. Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC, 1996: 155-175, 353-355.

Ellis GL. *Clear cell neoplasms in salivary glands: clearly a diagnostic challenge*. Ann Diagn Pathol 1998;2:61-78.

Eneroth CM. *Incidence and prognosis of salivary-gland tumours at different sites. A study of parotid, submandibular and palatal tumours in 2632 patients*. Acta Otolaryngol Suppl. 1969;263:174-178.

Eneroth CM. *Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular gland, and the palate region*. Cancer 1971;27:1415-1418.

Epstein J, Scully C. *Cytomegalovirus: a virus of increasing relevance to oral medicine and pathology*. J Oral Pathol Med 1993;22:348-353.

Evans HL. *Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a study of 69 cases with special attention to histologic grading*. Am J Clin Pathol 1984;81:696-701.

Eveson JW, Auclair PL, Gnepp DR, El-Naggar AK. *Tumours of Salivary Glands: Introduction*. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005:209–215.

Eveson JW, Cawson RA. *Salivary gland tumors: a review of 2,410 cases with particular reference to histologic types, site, age and sex distribution.* J Pathol 1985;146:51-58.

Foschini MP, Marucci G, Eusebi V. *Low-grade mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: characteristic immunohistochemical profile and evidence of striated duct differentiation.* Virchows Arch 2002;440:536-42.

Gandara DR, West H, Chansky K, Davies AM, Lau DHM, Crowley J, Gumerlock PH, Hirsch FR, Franklin WA. *Bronchioloalveolar carcinoma: a model for investigating the biology of epidermal growth factor receptor inhibition.* Clin Cancer Res 2004;10:4205s-4209s.

Gendler SJ, Spicer AP. *Epithelial mucin genes.* Annu Rev Physiol 1995;57:607-634.

Géneser F. *Histología. Glándulas Salivales. Aparato digestivo.* Capítulo 18. Editorial Médica Panamericana. Junín, Buenos Aires, 1988:397-400.

Gésime JM, Acevedo AM, Lalaguna F. *Las mucinas salivales y sus implicaciones en la reología de la saliva humana y los sustitutos salivales*. Acta Odontológica Venezolana 2009;47:1-12.

Gibbons MD, Manne U, Carroll WR, Peters GE, Weiss HL, Grizzle WE. *Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands*. Laryngoscope 2001;111:1373-1378.

Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G. *Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining*. Cancer Res 1994;54:1812-1817.

Giuntoli RL, Rodriguez GC, Whitaker RS, Dodge R, Voynow JA. *Mucin gene expression in ovarian cancers*. Cancer Res 1998;58:5546-5550.

Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. *Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria*. Cancer 1998;82:1217-1224.

Goode RK, El-Naggar AK. *Mucoepidermoid carcinoma*. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005:219–220.

Graham S, Blanchet M, Rohrer T. *Cancer in asbestos-mining and other areas of Quebec*. J Natl Cancer Inst 1977;59:1139-1145.

Grandis JR, Sok JC. *Signalling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy*. Pharmacol Ther 2004;102:37-46.

Grandis JR, Tweardy DJ. *Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer*. Cancer Res 1993;53:3579-3584.

Graves R, Hilgers J, Fritsche H, Hayes D, Robertson JFR. *MUC-1 mucin assays for monitoring therapy in metastatic breast cancer*. Breast 1998;7:181-186.

Grisanti S, Amoroso V, Buglione M, Rosati A, Gatta R, Pizzocaro C, Ferrari VD, Marini G. *Cetuximab in the treatment of metastatic mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: a case report and review of literature*. J Med Case Reports 2008;2:320-324.

Guzzo M, Andreola S, Sirizzotti G, Cantu G. *Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: clinicopathologic review of 108 patients treated at the National Cancer Institute of Milan*. *Ann Surg Oncol* 2002;9: 688-695.

Haddad R, Colevas AD, Krane JF, Cooper D, Glisson B, Amrein PC, Weeks L, Costello R, Posner M. *Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study*. *Oral Oncol* 2003;39:724-727.

Han SW, Kim HP, Jeon YK, Oh DY, Lee SH, Kim DW, Im SA, Chung DH, Heo DS, Bang YJ, Kim TY. *Mucoepidermoid carcinoma of lung: potential target of EGFR-directed treatment*. *Lung Cancer* 2008;61:30-34.

Handra-Luca A, Bilal H, Bertrand JC, Fouret P. *Extra-cellular signalregulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma*. *Am J Pathol* 2003;163:957-967.

Handra-Luca A, Lamas G, Bertrand JC, Fouret P. *MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC expression in salivary gland mucoepidermoide carcinoma: diagnostic and prognostic implications*. *Am J Surg Pathol* 2005;29:881-889.

Hanski C, Hofmeier M, Schmitt-Gräff A, Riede E, Hanski ML, Borchard F, Sieber E, Niedobitek F, Foss HD, Stein H, Riecken EO. *Overexpression or ectopic expression of MUC2 is the common property of mucinous carcinomas of the colon, pancreas, breast and ovary.* J Pathol 1997;182:385-391.

Herrmann K, Niedobitek G. *Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction.* J Pathol 2003;199:140-145.

Hilkens J, Ligtenberg JL, Vos HL, Litvinov SV. *Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property.* Trends Biochem Sci 1992;17:359-363.

Hiraga Y, Tanaka S, Haruma K, et al. *Immunoreactive MUC1 expression at the deepest invasive portion correlates with prognosis of colorectal cancer.* Oncology 1998;55:307-319.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn Jr PA, Di Maria MV, Veve R, Bremnes RM, Baron AE, Zeng C, Franklin WA. *Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis.* J Clin Oncol 2003;21:3798-3807.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier AC, Gumerlock P, Bunn Jr PA, Franklin W, Crowley J, Gandara DR. *Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study.* J Clin Oncol 2005;23:6838-6845.

Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. *Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues.* Cancer Res 1993;53:641-651.

Hoffman DA, McConahey WM, Fraumeni JF Jr, Kurland LT. *Cancer incidence following treatment of hyperthyroidism.* Int J Epidemiol 1982;11:218-224.

Holloway SM, Sofaer JA. *Coefficients of relationship by isonymy among oral cancer registrations in Scottish males.* Community Dent Oral Epidemiol 1992;20:284-287.

Iezzoni JC, Gaffey MJ, Weiss LM. *The role of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinomas.* Am J Clin Pathol 1995;103:308-315.

Jepson S, Komatsu M, Haq B, Arango ME, Huang D, Carraway CA, Carraway KL. *MUC4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27kip, but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinase B/Akt pathways.* Oncogene 2002;21:7524-7532.

Jilaveanu L, Zito C, Lee SJ, Nathanson KL, Camp RL, Rimm DL, Flaherty KT, Kluger HM. *Expression of sorafenib targets in melanoma patients treated with carboplatin, paclitaxel and sorafenib.* Clin Cancer Res 2009;15:1076-1085.

Jonckheere N, Perrais M, Mariette C, Batra SK, Aubert JP, Pigny P, Van Seuningen I. *A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as a target of TGF- β in pancreatic carcinogenesis.* Oncogene 2004;23:5729-5738.

Kalish LH, Kwong RA, Cole IE, Gallagher RM, Sutherland RL, Musgrove EA. *Deregulated cyclin D1 expression is associated with decreased efficacy of the selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cell lines.* Clin Cancer Res 2004;10:7764-7774.

Kalyankrishna S, Grandis JR. *Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer.* J Clin Oncol 2006;24:2666-2672.

Kang SM, Kang HJ, Shin JH, Kim H, Shin DH, Kim SK, Kim JH, Chung KY, Kim SK, Chang J. *Identical epidermal growth factor receptor mutations in adenocarcinomatous and squamous cell carcinomatous components of adenosquamous carcinoma of the lung*. Cancer 2007;109:581-587.

Kaste SC, Hedlund G, Pratt CB. *Malignant parotid tumours in patients previously treated for childhood cancer: clinical and imaging findings in eight cases*. Am J Roentgenol 1994;162:655-659.

Katz AD, Preston-Martin S. *Salivary gland tumors and previous radiotherapy to the head or neck. Report of a clinical series*. Am J Surg 1984;147:345-348.

Keelawat S, Liu CZ, Roehm PC, Barnes L. *Adenosquamous carcinoma of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic study of 12 cases and review of the literature*. Am J Otolaryngol 2002;23:160-168.

Kelude B, Lawoyin JO, Akang EE. *Salivary gland neoplasms: a 21year review of cases seen at University College Hospital, Ibadan*. Afr J Med Med Sci 2001;30:95-98.

Kessler A, Handler SD. *Salivary gland neoplasms in children; a 10 year survey at The Children's Hospital of Philadelphia*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1994;29:195-202.

Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. *Biochemical and clinical implications of ErbB/HER signaling network of growth factor receptors*. Adv Cancer Res 2000;77:25-79.

Koivunen P, Suutala L, Schorsch I, Jokinen K, Alho OP. *Malignant epithelial salivary gland tumors in northern Finland: incidence and clinical characteristics*. Eur Arch Otorhinolaryngol 2002;259:146-149.

Komatsu M, Tatum L, Altman NH, Carothers Carraway CA, Carraway KL. *Potentiation of metastasis by cell surface sialomucin complex (MUC4), a multifunctional anti-adhesive glycoprotein*. Int J Cancer 2000;87:480-486.

Kotwall CA. *Smoking as an etiologic factor in the development of Warthin's tumor of the parotid gland*. Am J Surg 1992;164:646-647.

Leroy X, Buisine MP, Leteurtre E, Aubert S, Buob D, Porchet N, Copin MC. *MUC1 (EMA): A key molecule of carcinogenesis?*. Ann Pathol. 2006;26:257-266.

Leegaard T, Lindeman H. *Salivary gland tumours. Clinical picture and treatment.* Acta Otolaryngol Suppl (Stockh) 1969;263:155-159.

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. *Signal transduction through MAP kinase cascades.* Adv Cancer Res 1998;74:49-139.

Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, Veness MJ, Walker DM, Morgan GJ, Rose BR. *Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil.* Int J Cancer. 2003;106:553-558.

Liu B, Lague JR, Nunes DP, Toselli P, Oppenheim FG, Soares RV, Troxler RF, Offner GD. *Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands.* J Histochem Cytochem 2002;50:811-820.

Locati LD, Quattrone P, Pizzi N, Fior A, Cantù G, Licitra L. *Primary high-grade mucoepidermoid carcinoma of the minor salivary glands with cutaneous metastases at diagnosis.* Oral Oncol 2002;38:401-404.

Lopez-Ferrer A, de Bolos C, Barranco C, Garrido M, Isern J, Carlstedt I, Reis CA, Torrado J, Real FX. *Role of fucosyltransferases in the association between apomucin and Lewis antigen expression in normal and malignant gastric epithelium.* Gut 2000;47:349-356.

Loy TS, McLaughlin R, Odom LF, Dehner LP. *Mucoepidermoid carcinoma of the parotid as a second malignant neoplasm in children.* Cancer 1989;64:2174-2177.

Macarenco RS, Uphoff TS, Gilmer HF, Jenkins RB, Thibodeau SN, Lewis JE, Molina JR, Yang P, Aubry MC. *Salivary gland-type lung carcinomas: an EGFR immunohistochemical, molecular genetic, and mutational analysis study.* Mod Pathol 2008;21:1168-1175.

Maillie HD, Gilda JE. *Radiation-induced cancer risk in radiographic cephalometry.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993;75:631-637.

Mancuso TF, Brennan MJ. *Epidemiological considerations of cancer of the gallbladder, bile ducts and salivary glands in the rubber industry.* J Occup Med. 1970;12:333-341.

Martinez-Madriral F, Bosq J, Casiraghi O. *Major Salivary Glands.* Chaper 17. In: Stemberg, S., ed. *Histology of Pathologist.* 2nd edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 1997:405-429.

Martinez-Madriral F, Bosq J, Casiraghi O. *Major Salivary Glands.* Chaper 17. In: Milles, S., ed. *Histology for Pathologist.* 3th edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 2007:445-470.

Masanja MI; Kalyanyama BM, Simon EN. *Salivary gland tumours in Tanzania*. East Afr Med J 2003;80:429-434.

McGuckin MA, Walsh MD, Hohn BG, Ward BG, Wright RG. *Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer*. Hum Pathol 1995;26:432-439.

Melrose RJ, Abrams AM, Howell FV. *Mucoepidermoid tumors of the intraoral minor salivary glands: a clinicopathologic study of 54 cases*. J Oral Pathol 1973;2:314-25.

Milham S Jr. *Cancer mortality pattern associated with exposure to metals*. Ann N Y Acad Sci 1976;271:243-249.

Monges GM, Mathoulin-Portier MPA, Acres RB, Houvenaeghel GF, Giovannini MF, Seitz JF, Bardou VJ, Payan MJ, Olive D. *Differential MUC1 expression in normal and neoplastic human pancreatic tissue. An immunohistochemical study of 60 samples*. Am J Clin Pathol 1999;112: 635-640.

Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. *Structural organization and classification of the human mucin genes*. Front Biosci 2001;6:D1192-D1206.

Monoo K, Sageshima M, Ito E, Nishihira S, Ishikawa K. *Histopathological grading and clinical features of patients with mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands*. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho 2003;106:192-198.

Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. *MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma*. Gastroenterology 1994;106:353-361.

Nance MA, Seethala RR, Wang Y, Chiosea SI, Myers EN, Johnson JT, Lai SY. *Treatment and survival outcomes based on histologic grading in patients with head and neck mucoepidermoid carcinoma*. Cancer 2008;113:2082-2089.

Nascimento AG, Amaral LP, Prado LA, Kligerman J, Silveira TR. *Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a clinicopathologic study of 46 cases*. Head Neck Surg 1986;8:409-417.

Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. *EGFR and cancer prognosis*. Eur J Cancer 2001;37(Suppl 4):S9-S15.

Nielsen PA, Mandel U, Therkildsen MH, Clausen H. *Differential expression of human high-molecular-weight salivary mucin (MG1) and low-molecularweight salivary mucin (MG2)*. J Dent Res 1996;75:1820-1826.

Ogata S, Uehara H, Chen A, Itzkowitz SH. *Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines*. Cancer Res 1992;52:5971-5978.

Okabe M, Miyabe S, Nagatsuka H, Terada A, Hanai N, Yokoi M, Shimozato K, Eimoto T, Nakamura S, Nagai N, Hasegawa Y, Inagaki H. *MECT1-MAML2 fusion transcript defines a favorable subset of mucoepidermoid carcinoma*. Clin Cancer Res. 2006;12:3902-3907.

Olsen KD, Devine KD, Weiland LH. *Mucoepidermoid carcinoma of the oral cavity*. Otolaryngol Head Neck Surg 1981;89:783-791.

Ostman J, Anneroth G, Gustafsson H, Tavelin B. *Malignant salivary gland tumours in Sweden 1960-1989 an epidemiological study*. Oral Oncol 1997;33:169-176.

Palmer JA, Mustard RA, Simpson WJ. *Irradiation as an etiologic factor in tumours of the thyroid, parathyroid and salivary glands*. Can J Surg 1980;23:39-42.

Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiegue-Zouitina S, d'Hooge MC, Laine A, Van-Seuningen I, Degand P, Gum JR, Kim YS, Swallow DM, Aubert JP, Porchet N. *Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes*. Genomics 1996;38:340-352.

Piludu M, Rayment SA, Liu B, Offner GD, Oppenheim FG, Troxler RF, Hand AR. *Electron microscopic immunogold localization of salivary mucins MG1 and MG2 in human submandibular and sublingual glands*. J Histochem Cytochem 2003;51: 69-79.

Pinkston JA, Cole P. *Incidence rates of salivary gland tumors: results from a population-based study*. Otolaryngol Head Neck Surg 1999;120:834-840.

Pires F. et al. 2004 Pires F, Almeida O, Araujo J, Kowasky P. *Pronostic factor in head and neck, mucoepidermoide carcinoma*. Arch Otonolaryngol Head Neck Surg 2004;130:174-180.

Pochampalli MR, Bitler BG, Schroeder JA. *Transforming growth factor alpha dependent cancer progression is modulated by Mucl*. Cancer Res 2007;67:6591-6598.

Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG, and Adel K. El-Naggar. *Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of salivary gland*. Cancer Res 1994;54:5675-5682.

Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG, El-Naggar AK. *Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis*. Cancer Res 1994;54:5675-5682.

Reis CA, David L, Carvalho F, Mandel U, de Bolós C, Mirgorodskaya E, Clausen H, Sobrinho-Simões M. *Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas*. J Histochem Cytochem 2000;48:377-388.

Retz M, Lehmann J, Röder C, Plötz B, Harder J, Eggers J, Pauluschke J, Kalthoff H, Stöckle M. *Differential Mucin MUC7 gene expression in invasive bladder in contrast to uniform MUC1 and MUC2 gene expression in both normal urothelium and bladder carcinoma*. Cancer Res 1998;58:5662-5666.

Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology. *Major and minor salivary glands*. 8th edition. Mosby. New York, 1996:835-837.

Rossi G, Sartori G, Cavazza A, Tamberi S. *Mucoepidermoid carcinoma of the lung, response to EGFR inhibitors, EGFR and K-RAS mutations, and differential diagnosis.* Lung Cancer 2009;63:159-160.

Rouvière, H., Delmas, A. *Anatomía Humana Descriptiva, Topográfica y Funcional.* Tomo I. Cabeza y cuello. 11ª edición. Masson. Barcelona, 2005:402-409,559-605.

Saku T, Hayashi Y, Takahara O, Matsuura H, Tokunaga M, Tokunaga M, Tokuoka S, Soda M, Mabuchi K, Land CE. *Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950-1987.* Cancer 1997;79:1465-1475.

Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S. *Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab.* J Clin Oncol 2007;25:3238-3245.

Saw D, Lau WH, Ho JH, Chan JK, Ng CS. *Malignant lymphoepithelial lesion of the salivary gland.* Hum Pathol 1986;17:914-923.

Schneider AB, Favus MJ, Stachura ME, Arnold MJ, Frohman LA. *Salivary gland neoplasms as a late consequence of head and neck irradiation.* Ann Intern Med 1977;87:160-164.

Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ. *Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland.* J Biol Chem 2001;276:13057-13064.

Schuller DE, McCabe BF. *Salivary gland neoplasms in children.* Otol Clin North Am 1977;10:399-412.

Scully C. *Viruses and salivary gland disease: are there associations?* Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1988;66:179-183.

Seifert G. *World Health Organization, International Histological Classification of Tumours. Mucoepidermoid carcinoma. Histological Typing of Salivary Gland Tumours.* Springer-Verlag. Berlin, 1991:20-21.

Seifert G, Miehle A, Haubrich J, Chilla R. *Diseases of the salivary glands: diagnosis, pathology, treatment, facial nerve surgery.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1986:171-179.

Shang J, Shui Y, Sheng L, Wang K, Hu Q, Wei Q. *Epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor 2 expression in parotid mucoepidermoid carcinoma: possible implication for targeted therapy*. *Oncol Rep* 2007;19:435-440.

Simpson RH, Prasad AR, Lewis JE, Skálová A, David L. *Mucin rich variant of salivary duct carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study of four cases*. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1070-1079.

Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK. *Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis*. *Cancer Res* 2004;64:622-630.

Skalova A, Lehtonen H, Von Boguslawsky K, Leivo I. *Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB 1 antibody in paraffin sections*. *Hum Pathol* 1994;25: 929-935.

Sobin LH, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumors. American Joint Committee on Cancer and International Union Against Cancer (UICC), 6th edition*. Willey and Sons. New York, 2002.

Sone T, Kasahara K, Kimura H, Nishio K, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Shibata K, Waseda Y, Fujimura M, Nakao S. *Comparative analysis of EGFR mutations and gene amplification as predictors of gefitinig efficacy in Japanese patients with nonsmall cell lung cancer.* Cancer 2007;109:1836-1844.

Speight PM, Barrett AW. *Salivary gland tumors.* Oral Disease 2002;8:229–240.

Spiro RH, Huvos AG, Berk R, Strong EW. *Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. A clinicopathologic study of 367 cases.* Am J Surg 1978;136:461-468.

Spiro RH, Koss LG, Hajdu SI, Strong EW. *Tumors of minor salivary origin. A clinicopathologic study of 492 cases.* Cancer 1973;31:117-129.

Spiro RH. *Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients.* Head Neck Surg 1986;8:177-184.

Spitz MR, Batsakis JG. *Major salivary gland carcinoma. Descriptive epidemiology and survival of 498 patients.* Arch Otolaryngol 1984;110:45-49.

Spitz MR, Sider JG, Newell GR, Batsakis JG. *Incidence of salivary gland cancer in the United States relative to ultraviolet radiation exposure*. Head Neck Surg 1988;10:305-308.

Sun EC, Curtis R, Melbye M, Goedert JJ. *Salivary gland cancer in the United States*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999;8:1095-1100.

Sunderman FW Jr. *Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals*. Ann Clin Lab Sci 2001;31:3-24.

Takeichi N, Hirose F, Yamamoto H, Ezaki H, Fujikura T. *Salivary gland tumors in atomic bomb survivors, Hiroshima, Japan. II. Pathologic study and supplementary epidemiologic observations*. Cancer 1983;52:377-385.

Testut L, Latarjet A. *Tratado de Anatomía Humana. Aparato de la digestión, peritoneo. Aparato urogenital. Capítulo 2. Tomo 4. 9ª edición*. Salvat. Barcelona,1995:531-569.

Thomson P. J., Soames J. V., Booth C., O'Shea J. A. *Epithelial cell proliferative activity and oral cancer progression*. Cell Prolif 2002;1:110-120.

Tonon G, Gehlhaus KS, Yonescu R, Kaye FJ, Kirsch IR. *Multiple reciprocal translocations in salivary gland mucoepidermoid carcinomas*. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;152:15-22.

Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA. *Erlotinib in lung cancer molecular and clinical predictors of outcome*. *N Engl J Med* 2005;353:133-144.

Von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten AA, Kenemans P, Snijdwint FG, Kok A, Van Kamp GJ, Paul MA, Van Diest PJ, Meijer S, Hilgers J. *Survival in early breast cancer patients is favourable influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin*. *J Clin Oncol* 2000;18:574-583.

Wedell B, Burian P, Dahlenfors R. *Cytogenetic observation in a mucoepidermoide carcinoma arising from heterotopic intranodal salivary tissue*. *Oncol Rep* 1997;4:515-516.

Weed DT, Gomez-Fernandez C, Pacheco J, Ruiz J, Hamilton-Nelson K, Arnold DJ, Civantos FJ, Zhang J, Yasin M, Goodwin WJ, Carraway KL. *MUC4 and ErbB2 expression in major and minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma*. *Head Neck* 2004;26:353-364.

Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carlstedt I. *MUC5B is a major gelforming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage.* Biochem J 1998;334:685-693.

Wickstrom C, Christersson C, Davies JR, Carlstedt I. *Macromolecular organization of saliva: identification of insoluble MUC5B assemblies and non-mucin proteins in the gel phase.* Biochem J 2000;351:421-428.

Williams RR, Horm JW. *Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey.* JNCI 1977;58:519-524.

Yonezawa S, Goto M, Yamada N, Higashi M, Nomoto M. *Expression profiles of MUC1, MUC2, and MUC4 mucins in human neoplasms and their relationship with biological behavior.* Proteomics. 2008;8:3329-3341.

Yoo J, Robinson RA. *H-ras gene mutations in salivary gland mucoepidermoid carcinomas.* Cancer 2000a;88:518-523.

Yoo J, Robinson RA. *Ras Gene mutations in salivary gland tumours.* Arch Pathol Lab Med 2000b;124:836-839.

Yu CJ, Yang PC, Shew JY, Hong TM, Yang SC, Lee YC, Lee LN, Luh KT, Wu CW. *Mucin mRNA expression in lung adenocarcinoma cell lines and tissues*. *Oncology* 1996;53:118-126.

Zhu Q, Tipoe GL, White FH. *Proliferative activity as detected by immunostaining with Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the human parotid gland*. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:336-342.

*Diseño gráfico: Luis Luján,
Tel. 656982611, aluisl@hotmail.com*

*Impreso en España por Novoprint.
Barcelona, febrero 2011.*

