



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE**



ADNA BARROS ISMERIM

**DISTRIBUIÇÃO DOS MASTÓCITOS E PROTEÍNAS RELACIONADAS COM
A DIFERENCIAÇÃO MIOFIBROBLÁSTICA (SMA, PAR-2, IL-6 e TGF β 1) EM
TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR**

SALVADOR-BA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE



**DISTRIBUIÇÃO DOS MASTÓCITOS E PROTEÍNAS RELACIONADAS COM
A DIFERENCIAÇÃO MIOFIBROBLÁSTICA (SMA, PAR-2, IL-6 e TGF β 1) EM
TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Odontologia e Saúde da Universidade Federal da
Bahia, como requisito para obtenção do título de
Doutor.

Aluno: Adna Barros Ismerim

Orientador: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos

Salvador-Ba

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

I83 Ismerim, Adna Barros.

Distribuição dos mastócitos e proteínas relacionadas com a diferenciação miofibroblástica (SMA, PAR-2, IL-6 e TGF β 1) em tumores de glândula salivar / Adna Barros Ismerim. - Salvador, 2016.

183 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, Salvador, 2016.

Área de concentração: Diagnóstico Bucal

1. Neoplasias de glândula salivar. 2. Mastócitos. 3. Miofibroblastos. I. Santos, Jean Nunes dos. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde. III. Título.

CDU: 616.31



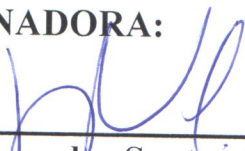
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. ADNA BARROS ISMERIM

“DISTRIBUIÇÃO DOS MASTÓCITOS E PROTEÍNAS
RELACIONADAS COM A DIFERENCIAÇÃO MIOFIBROBLÁSTICA
(PAR-2, IL-6, TGFbeta1) EM TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR”

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Orientador)

Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia



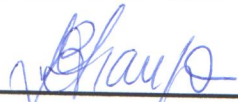
Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier (Examinador Interno)

Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia



Profa. Dra. Valéria Souza Freitas (Examinador Externo)

Professora da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS



Profa. Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo (Examinador Externo)

Professora da Universidade Federal da Bahia – FAMED



Profa. Dra. Ana Paula Veras Sobral (Examinador Externo)

Professora da Professora da Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco

Aos meus pais, Joaquim e Tereza,
por todo amor e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda sabedoria e conhecimento, por sempre ter renovado minhas forças e atendido minha orações, estando comigo em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis, era quando estava mais presente.

Aos meus pais, Joaquim e Tereza , e aos meus irmãos, Lídia, Hilquias, Léia e Acsa pelo amor, carinho, incentivo e força, sempre que precisei durante esta caminhada. Vocês são minha fortaleza!

Ao meu marido, Marcelo, e à nossa pequenina Alice, pelo amor que sinto todos os dias, que me enche de paz.

Ao meu orientador, Professor Dr Jean Santos, pela admirável competência, profissionalismo e amizade. Serei sempre grata por ter me ensinado a dar os primeiros passos na iniciação científica, e na continuidade da vida acadêmica, mestrado, e agora doutorado. Minha gratidão e reconhecimento!

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), por ter me acolhido durante esta nova etapa da minha formação.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde (FOUFBA), agradeço pelo apoio, ensinamentos e dedicação ao programa.

À professora Dra Maria Cristina Cangussu pelo apoio e prestatividade que sempre me atendeu, e às professoras Dra Clarissa Gurgel e Dra Deise Vilas Boas pela amizade, conselhos e doce convivência desde meus primeiros passos na pesquisa científica.

Aos professores da Patologia, Flávia Caló, Águida Leitão e Luciana Ramalho, pelo apoio, amizade e incentivo durante a caminhada.

Aos colegas da turma do doutorado, Leonardo Melo, Braúlio Carneiro Jr, Crhistiano Queiroz, Isaac Queiroz, Gardênia Paraguassú, Leonardo Provedel, Luana Bastos, Marcelo Castelucci, Rebeca Vasconcelos, e às amigas Poliana Ramos e Virgínia Uzeda pela amizade e companheirismo durante todo nosso curso.

À Sueli Paixão, secretária do programa, pelo apoio, amizade e prestatividade.

À Miriam Morais e Edilson Silva, técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica, por todo apoio durante a pesquisa.

Às colegas, Ludmila Valverde, Manuela Andion e Rebeca Dantas, pela significativa participação na fase experimental desta pesquisa.

À Dra Cláudia Macedo, pela parceria e por ceder, gentilmente, parte dos casos.

Aos Laboratórios de Patologia Cirúrgica da FOUFBA e da FIOCRUZ, por ceder a estrutura necessária para a realização dos experimentos deste estudo.

Ao Hospital Aristides Maltez, pela parceria e por viabilizar a execução dessa pesquisa através da disponibilização de parte dos casos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste trabalho

Aos alunos da UESB, com os quais eu tenho aprendido e me tornam, a cada dia, mais amante da docência.

RESUMO

As neoplasias de glândulas salivares representam um importante grupo de neoplasias cujos aspectos morfológicos são diversos, no entanto, o seu conteúdo estromal tem sido pouco investigado. Este estudo visa estudar a distribuição de mastócitos e proteínas relacionadas (SMA, PAR-2, TGF β 1, IL-6), bem como a sua contribuição na diferenciação miofibroblástica em diferentes neoplasias de glândulas salivares com e sem conteúdo mioepitelial e com alto e baixo índice proliferativo. Técnica imunohistoquímica para triptase de células mastocitárias, SMA, PAR-2, TGF β 1, IL-6 foi realizada em 10 casos de Adenoma Pleomórfico (AP), nove casos de Adenoma de Células Basais (AB), 10 casos de Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau (APBG), 14 casos de Carcinoma Mucoepidermóide (CME) e 10 casos de Carcinoma Adenóide Cístico (CAC), sendo inicialmente os tumores classificados de acordo com o seu conteúdo mioepitelial (<50% ou \geq 50%) e de proliferação celular (alto ou baixo), por meio da calponina e do Ki-67, respectivamente. Adicionalmente foi realizada dupla marcação imunohistoquímica para mastócitos e actina alfa de músculo liso (SMA). A densidade de mastócitos foi maior na região periparenquimal em todos os tumores, sendo mais elevada nos tumores malignos ($p=0,025$), especialmente no CME. Foi encontrada uma correlação positiva entre mastócitos intraparenquimais e periparenquimais nos tumores benignos ($p=0,020$), e uma correlação negativa nos tumores malignos ($p > 0,05$). Tumores benignos com alto índice proliferativo apresentaram alta expressão de PAR-2 e TGF β 1, baixa expressão de SMA e IL-6, e menor densidade de mastócitos periparenquimais quando comparados aos tumores de baixo índice proliferativo; nos tumores benignos com conteúdo mioepitelial <50% observou-se alta expressão de TGF β 1, alta expressão de PAR-2 em 50% dos casos, baixa expressão de SMA e IL-6 e menor densidade de mastócitos periparenquimais quando comparados aos tumores com conteúdo mioepitelial >50% ($p > 0,05$). Tumores malignos com alto índice proliferativo apresentaram alta expressão de PAR-2, baixa expressão de SMA, IL-6 e TGF β 1 e maior densidade de mastócitos totais, intra e periparenquimais quando comparados aos tumores de baixo índice proliferativo; no CME, tumores com baixo índice proliferativo apresentaram maior expressão de SMA ($p=0,031$); nos tumores malignos com conteúdo mioepitelial <50% observou-se alta expressão de PAR-2, baixa expressão de SMA, IL-6, TGF β 1, e maior densidade de mastócitos totais, intra e periparenquimais quando comparados aos tumores com conteúdo mioepitelial >50% ($p > 0,05$). Quando comparada a densidade de mastócitos com a marcação miofibroblástica (SMA), tumores benignos e malignos com alta expressão de SMA apresentaram maior densidade de mastócitos totais e periparenquimais, com destaque para a densidade periparenquimal no APBG ($p=0,017$). Em relação à expressão das proteínas PAR-2, IL-6 e TGF β 1 e a densidade de mastócitos e SMA não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Os resultados do presente trabalho apontam para uma possível participação dos mastócitos no desenvolvimento tumoral de tumores de glândula salivar. No entanto, não foi possível estabelecer a relação entre os mastócitos e a diferenciação miofibroblástica em tumores de glândula salivar.

Palavras-chave: Neoplasias de glândulas salivares, mastócitos, miofibroblastos.

ABSTRACT

Salivary gland neoplasms represent an important group of neoplasms whose morphology is different, however, its content stromal has been little investigated. This study aims to study the distribution of mast cells and related proteins (SMA, PAR-2, TGF β 1, IL-6), as well as their contribution to the myofibroblastic differentiation in different tumors of the salivary glands with and without myoepithelial content and high and low proliferative index. Immunohistochemistry for tryptase mast cells, SMA, PAR-2, TGF β 1, IL-6 was performed in 10 cases of Pleomorphic Adenoma (PA), nine cases of Basal Cell Adenoma (AB), 10 cases of Polymorphous Low- Grade Adenocarcinoma (PLGA), 14 cases of Mucoepidermoid Carcinoma (MEC) and 10 cases of adenoid cystic carcinoma (ACC) initially being tumors were classified according to their myoepithelial content (<50%, or \geq 50%) and cellular proliferation (high or low) by means of calponin and Ki-67, respectively. Additionally Double labeling immunohistochemistry was performed to mast cells and alpha smooth muscle actin (SMA). The density of mast cells was larger in the region periparenchymal all tumors and is higher in malignant tumors ($p = 0.025$), especially in MEC. A positive correlation between intraparenchymal and periparenchymal mast cells in benign tumors were found ($p = 0.020$), and a negative correlation in malignant tumors ($p > 0.05$). Benign tumors with high proliferation index showed high expression of PAR-2 and TGF β 1, low expression of SMA and IL-6, and lower density periparenchymal mast cells tumors compared to low proliferative index; in benign tumors with myoepithelial content of <50% was observed high expression of TGF β 1, high PAR-2 expression in 50% of cases, low SMA expression and IL-6 and lower density periparenchymal mast cells when compared to tumors with myoepithelial content > 50% ($p > 0.05$). Malignant tumors with high proliferative index showed high expression of PAR-2, low-SMA expression, IL-6 and TGF β 1 and higher density of total mast cells, intra and periparenchymal when compared to tumors of low proliferation index; the MEC, tumors with low proliferation index showed higher expression of SMA ($p = 0.031$); in malignant tumors with myoepithelial content <50% was observed high expression PAR-2, low-SMA expression, IL-6, TGF β 1, and higher density of total mast cells, intra and periparenchymal when compared to tumors with myoepithelial content > 50% ($p > 0.05$). Compared the density of mast cells with myofibroblastic marking (SMA), benign and malignant tumors with high expression of SMA showed a higher density of total and periparenchymal mast cells, highlighting the periparenchymal density in PLGA ($p = 0.017$). Regarding the expression of PAR-2 protein, IL-6 and TGF β 1 and the density of mast cells and SMA was no statistically significant difference ($p > 0.05$). The results of this study point to a possible role of mast cells in tumor development of salivary gland tumors. However, it was not possible to establish the relationship between mast cells and myofibroblast differentiation in salivary gland tumors.

Keywords: Salivary glands neoplasms, mast cell, myofibroblast

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Imunomarcaco de Mast Cell	74
Figura 2 Imunomarcaco do SMA	76
Figura 3 Dupla Marcaco de Mast Cell e SMA	78
Figura 4 Imunomarcaco do PAR-2	80
Figura 5 Imunomarcaco da IL-6	82
Figura 6 Imunomarcaco do TGF β 1	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpo, marca, clone, diluição, recuperação antigênica e controle positivo. Salvador-Ba, 2016.	57
Tabela 2. Relação da expressão da Calponina, Ki-67, SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 entre os tumores de glândula salivar. Salvador-Ba, 2016.	70
Tabela 3. Relação da expressão da Calponina, Ki-67, SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 entre os tumores de glândula salivar. Salvador-Ba, 2016	71
Tabela 4. Densidade de mastócitos nas neoplasias de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016.	72
Tabela 5. Densidade de mastócitos nos tumores benignos e malignos de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016.	72
Tabela 6. Correlação entre os mastócitos intraparenquimais e periparenquimais nas neoplasias de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016	72
Tabela 7. Distribuição da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 e a densidade de mastócitos de acordo com o grau histológico do Carcinoma Mucoepidermóide. Salvador-Ba, 2016.	86
Tabela 8. Distribuição da densidade de mastócitos e a expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (calponina) nos Adenomas Pleomórficos. Salvador-BA,2016.	90
Tabela 9. Distribuição da densidade de mastócitos e a expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (calponina) nos Adenomas de Células Basais. Salvador-BA,2016.	93
Tabela 10. Distribuição da densidade de mastócitos e a expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (calponina) nos Adenocarcinomas Polimorfo de Baixo Grau.	96

Salvador-BA,2016.

Tabela 11. Distribuição da densidade de mastócitos e a expressão do SMA, PAR- 98
2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) nos Carcinomas
Mucoepidermóides. Salvador-BA, 2016.

Tabela 12. Distribuição da densidade de mastócitos e a expressão do SMA, PAR- 101
2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo
mioepitelial (calponina) nos Carcinomas Adenóides Císticos. Salvador-BA, 2016.

Tabela 13. Distribuição da densidade de mastócitos e a expressão do SMA, PAR- 107
2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo
mioepiteliais (calponina) nos Tumores Benignos de glândulas salivares. Salvador-
Ba, 2016. 127

Tabela 14. Distribuição da densidade de mastócitos e a expressão do SMA, PAR- 108
2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo
mioepiteliais (calponina) nos Tumores Malignos de glândulas salivares. Salvador-
Ba, 2016.

Tabela 15. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1, SMA e a densidade 110
de mastócitos nos Adenomas Pleomórficos.Salvador-BA,2016 .

Tabela 16. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1,SMA e a densidade 112
de mastócitos nos Adenomas de Células Basais.Salvador-Ba, 2016.

Tabela 17. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1, SMA e a densidade 114
de mastócitos no Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau. Salvador-Ba, 2016.

Tabela 18. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6,TGFβ1, SMA e a densidade 116
de mastócitos nos Carcinomas Mucoepidermóides. Salvador-Ba, 2016.

Tabela 19. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1,SMA e a densidade 118
de mastócitos nos Carcinomas Adenóides Císticos. Salvador-Ba, 2016.

Tabela 20. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1,SMA e a densidade de mastócitos nos Tumores Benignos de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016.	118
Tabela 21. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1,SMA e a densidade de mastócitos nos Tumores Malignos de glândulas salivares. Salvador-Ba,2016.	119
Tabela 22. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblática(SMA) nos Adenomas Pleomórficos. Salvador-Ba, 2016.	120
Tabela 23. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblática(SMA) nos Adenomas de Células Basais. Salvador-Ba, 2016.	121
Tabela 24. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblática(SMA) nos Adenocarcinomas Polimorfos de Baixo Grau. Salvador-Ba, 2016.	122
Tabela 25. Tabela 25. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblática(SMA) nos Carcinomas Mucoepidermóides. Salvador-Ba, 2016.	123
Tabela 26. Tabela 26. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblática(SMA) nos Carcinomas Adenóides Císticos. Salvador-Ba, 2016.	123
Tabela 27. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblática(SMA) nos Tumores Benignos de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016	124
Tabela 28. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblática(SMA) nos Tumores Malignos de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016.	124
Tabela 29. Relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e SMA com	126

os parâmetros clínicos dos casos de AP. Salvador-Ba, 2016.

Tabela 30. Relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGF β 1 e SMA com os parâmetros clínicos dos casos de AB. Salvador-Ba, 2016. 127

Tabela 31. Relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGF β 1 e SMA com os parâmetros clínicos dos casos de APBG. Salvador-Ba, 2016. 128

Tabela 32. Relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGF β 1 e SMA com os parâmetros clínicos dos casos de CME. Salvador-Ba, 2016. 129

Tabela 33. Relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGF β 1 e SMA com os parâmetros clínicos dos casos de CAC. Salvador-Ba, 2016. 130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Adenoma Pleomórfico
AB	Adenoma de Células Basais
ABPG	Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau
CAC	Carcinoma Adenóide Cístico
CME	Carcinoma Mucoepidermóide
CD10	Marcador de células foliculares e linfoblastos
CD34+	Antígeno de células progenitoras hematopoiéticas humanas (Do inglês: " <i>Cluster of Differentiation 34 positive</i> ")
COX2	Ciclo-oxigenase-2
CXCL12	Do inglês: " <i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12</i> "
Cyr61	Proteína rica em cisteína 61
CXCL14	Do inglês: " <i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 14</i> "
°C	Graus Celsius
DAB	3,3'- diaminobenzidina
15-d-PGJ ₂	Do inglês: " <i>15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2</i> "
D2-40	Anticorpo que reconhece podoplanina.(Do inglês:" <i>D240 antibody</i> ")
ED-A fibronectin	Domínio extra A da fibronectina
Ens-TEM	Transição Endotélio-Mesênquima
ERK1/2	Sinal extracelular regulado por proteínas quinases-isoformas 1 e 2
et al	Colaboradores
FACs	Fibroblastos Associados a Carcinomas

Fase G2	Fase da Interfase ciclo celular
Fase S	Fase do ciclo celular de duplicação do DNA
Fase M	fase do ciclo celular denominada mitose
FGF2	Fator de Crescimento Fibroblástico 2
FGFR-2	Receptor do Fator de Crescimento Fibroblástico 2
FSP1	Proteína Secretada por Fibroblasto 1
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
<i>Feed-back</i>	Do inglês: " <i>feed-back</i> "
Gap	Junções comunicantes ou nexos
<i>Hot spot</i>	Áreas com maior marcação (Do inglês: " <i>hot spot</i> ")
H/E	Hematoxilina/Eosina
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
h-caldesmon	marcador de proteína contrátil celular)
IFN β	Interferon beta
IGF-1	Fator de Crescimento semelhante a Insulina 1
<i>in situ</i>	No local, localizado
IM	Índice de marcação
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-9	Interleucina-9
IL-10	Interleucina-10

IL-17	Interleucina-17	
<i>in vivo</i>	Em um organismo vivo	
kDa	Quilodalton	
Ki-67	Antígeno de proliferação celular (do inglês Kiel 67)	
LTB ₄	Leucotrieno B4	
LTD ₄	Leucotrieno D4	
Mast cell	Mastócitos	
MAPK	Mitógenos ativados por proteína quinase	
MCP-1	Proteína quimioatratante para monócitos 1	
MEC	Matriz extracelular	
mm ²	Milímetros quadrado	
MMPs	Metaloproteinases	
MMP-2	Metaloproteinase 2	
MMP-3	Metaloproteinase 3	
MMP-9	Metaloproteinase 9	
MMP-14	Metaloproteinase 14	
MT1-MMP	Do inglês:"membrane-associated, type-I transmembrane MMP"	
n	Número de casos	
OMS	Organização Mundial de Saúde	
<i>Overnight</i>	Toda noite	Do inglês:" <i>overnight</i> "
PAF	Do inglês:"platelet-activating factor "	
PAR	Receptor Ativado por Protease	
PAR-2	Receptor Ativado por Protease 2	
PDG ₂	Prostaglandina D2	
PDGF	Fator de Crescimento derivado de Plaquetas	

PDGF-A	Fator de Crescimento derivado de Plaquetas-A
PDGFR- α	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
PBS	Solução salina fosfatada
p63	Proteína 63kDa
P-CADHERIN	Molécula de adesão celular p-caderina
Ph	Potencial de hidrogênio
SCF	Do inglês: " <i>stem cell factor</i> "
SDF-1 α	Fator Derivado de Células Estromais-1 (do inglês stromal cell-derived factor-1)
α -SMA	Alfa actina de músculo liso
SMA	Actina de músculo liso
S100	Família de proteínas com função regulatória em variados processos celulares
SMAD	Proteínas intracelulares que realizam a transdução de sinais extracelulares de ligantes do TGF β
SMMHC	Miosina de Músculo Liso de Cadeia Pesada
TEM	Transição Epitélio-Mesênquima
TGF β	Fator Transformador de Crescimento beta
TGF β 1	Fator Transformador de Crescimento beta 1
TGF β 2	Fator Transformador de Crescimento beta 2
TGF β 3	Fator Transformador de Crescimento beta 3
TGF β R1	Receptor tipo I do fator transformador de crescimento beta
TGF β R2	Receptor tipo II do fator transformador de crescimento beta
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRIS-HCl	Tris hidroximetil aminometano cloridrato

UFBA	Universidade Federal da Bahia
USA	Estados Unidos da América
µm	Micrômetros
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	Tumores de glândula salivar	24
2.1.1	Adenoma Pleomórfico	24
2.1.2	Adenoma de Células Basais	25
2.1.3	Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade	26
2.1.4	Carcinoma Mucoepiermóide	27
2.1.5	Carcinoma Adenóide Cístico	29
2.2	Mastócitos	31
2.2.1	Mastócitos e fibroblastos	34
2.2.2	Mastócitos e o Prognóstico Tumoral	35
2.3	Miofibroblastos	37
2.3.1	Miofibroblastos e Neoplasias	40
2.4	PAR-2	42
2.4.1	Mastócitos e ativação dos fibroblastos via PAR-2	43
2.5	Interleucina 6 (IL-6)	44
2.5.1	IL-6 e neoplasias	45
2.6	TGF β 1	47
2.6.1	TGF β 1 e neoplasias	48
3	PROPOSIÇÃO	52
3.1	Objetivo geral	52
3.2	Objetivos Específicos	52
4	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1	Aspectos éticos	54
4.2	Caracterização do estudo	54
4.3	Casuística	54
4.4	Estudo morfológico	55
4.5	Estudo Imunohistoquímico	55
4.5.1	Técnica imuno-histoquímica	55
4.5.2	Exame imuno-histoquímico	58
4.6	Análise estatística	61
5	RESULTADOS	62
5.1	Imunomarcção da Calponina e Ki-67	62
5.2	Imunomarcção dos Mastócitos	62
5.3	Imunomarcção do SMA	64
5.4	Dupla Marcação de Mast Cell e SMA	65

5.5	Imunomarcção do PAR-2	66
5.6	Imunomarcção da IL-6	67
5.7	Imunomarcção do TGF β 1	68
5.8	Comparação da expressão do PAR-2, IL-6, TGF β 1, SMA e mastócitos entre os diferentes graus histológicos do CME.	85
5.9	Comparação da expressão do SMA, PAR-2, IL-6, TGF β 1 e mastócitos de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (Calponina) nos tumores de glândulas salivares	87
5.9.1	Adenoma Pleomórfico	87
5.9.2	Adenoma de Células Basais	91
5.9.3	Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade	94
5.9.4	Carcinoma Mucoepiermóide	97
5.9.5	Carcinoma Adenóide Cístico	99
5.10	Comparação da expressão do SMA, PAR-2, IL-6, TGF β 1 e mastócitos de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (Calponina) entre os tumores benignos e malignos de glândulas salivares	102
5.10.1	Tumores Benignos	102
5.10.2	Tumores Malignos	104
5.11	Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6 e TGF β 1 e a densidade de mastócitos) nos tumores de glândulas salivares	109
5.11.1	Adenoma Pleomórfico	109
5.11.2	Adenoma de Células Basais	111
5.11.3	Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade	112
5.11.4	Carcinoma Mucoepiermóide	114
5.11.5	Carcinoma Adenóide Cístico	116
5.12	Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6 e TGF β 1 e a marcação miofibroblástica (SMA) nos tumores de glândulas salivares	120
5.12.1	Adenoma Pleomórfico	120
5.12.2	Adenoma de Células Basais	120
5.12.3	Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade	121
5.12.4	Carcinoma Mucoepiermóide	122
5.12.5	Carcinoma Adenóide Cístico	123
5.13	Relação entre a expressão de SMA, PAR-2, IL-6 e TGF β 1 e os parâmetros clínicos.	125
6	DISCUSSÃO	131
7	CONCLUSÕES	145
	REFERÊNCIAS	147
	ANEXOS	180

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândulas salivares são lesões raras, que apresentam um arranjo citoarquitetural diverso, o que torna o diagnóstico complexo (DARDICK et al., 1996; STENMAN; PERSSON; ANDERSSON, 2014; VASCONCELOS et al., 2016). Esta diversidade morfológica tem sido atribuída à capacidade de diferenciação do parênquima tumoral, especialmente, as células mioepiteliais, identificadas pelos seus variados graus de diferenciação nessas neoplasias (LOYOLA, ARAÚJO e SOUSA, 1999).

A importância do comportamento das células mioepiteliais e seus componentes secretórios têm se tornado evidente tanto no carcinoma *in situ* como na sua transição para o invasivo, tendo em vista que a sua interação com os componentes epiteliais e estromais podem favorecer o crescimento tumoral, invasão e metástase (MARTINEZ et al., 2010). Por outro lado, sabe-se que as células mioepiteliais expressam altos níveis de inibidores de angiogênese, desempenhando uma função negativa no crescimento tumoral (NGUYEN et al., 2000; BARSKY e KARLIN, 2006; COSTA et al., 2008; CARDOSO et al., 2009). Dessa forma, os tumores com participação mioepitelial são considerados de baixo grau em relação ao seu controle local, regional e a distância (BATSAKIS e EL-NAGAR et al., 1999; NGUYEN et al., 2000; BARSKY e KARLIN, 2006), destacando-se o adenoma pleomórfico, o mioepitelioma e o adenoma de células basais, o carcinoma mioepitelial, o carcinoma epitelial-mioepitelial, o carcinoma adenóide cístico, e adenocarcinoma de células basais e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, entre aqueles com conteúdo mioepitelial neoplásico (NIKAI et al., 1986; LUNA et al., 1987; NICOLATOU et al., 1988; DARDICK et al., 1992; TAKEDA, 1992; QUDDUS et al., 1999; ELLIS e AUCLAIR, 2008), ao contrário do carcinoma mucoepidermóide (LOYOLA, ARAÚJO e SOUSA, 1999).

Os mastócitos originam-se a partir de células progenitoras específicas pertencentes à linhagem hematopoiética, derivadas da medula óssea (PIO CONTI et al., 2007; MALTBY et al., 2009; CHNG et al., 2006). São células que se localizam no tecido conjuntivo próximo a vasos sanguíneos e nervos, e residem na maioria dos tecidos humanos, em especial, na pele, vias aéreas e trato digestivo, onde exercem funções importantes em muitos processos fisiológicos e patológicos, tais como cicatrização e remodelação tecidual, resposta imune inata e adquirida, processos inflamatórios agudo e crônico, além de participar efetivamente na biologia do câncer e demais alterações neoplásicas (NORRBY 2002; CONTI et al., 2007; MICHAILEDIOU et al., 2008; WASIUK et al., 2008; MALTBY et al., 2009; XIANG et al., 2010; VIDAL et al., 2010; DE ASSIS et al., 2012; SOUSA-NETO et al., 2016).

De acordo com Hebda et al., (1993), ao mesmo tempo em que ocorre um aumento local do número de mastócitos teciduais, torna-se evidente um maior número de miofibroblastos, por aqueles influenciarem as propriedades funcionais e bioquímicas dos fibroblastos e miofibroblastos via mediadores por eles produzidos no reparo tecidual. Dentre estes, destaca-se a triptase que induz a proliferação de fibroblastos estromais a diferenciação miofibroblástica durante a progressão do câncer de mama (MANGIA et al., 2011).

Os miofibroblastos têm sido reconhecidos como promotores tumorais, uma vez que essa população celular está relacionada com a agressividade de muitas neoplasias, e envolvida na criação de um microambiente permissivo a invasão tumoral (KALTERMAN et al., 2007; SOBRAL et al, 2011a; SOBRAL et al, 2011b; GUPTA, METGUD e GUPTA, 2015; JAYARAJ et al., 2015; GUPTA, RAMANI e CHANDRASEKAR, 2015). Dessa forma, são comumente denominados de fibroblastos associados a carcinoma (FAC) por estarem presentes em neoplasias humanas e

expressarem altos níveis de actina alfa de músculo liso (α -SMA), bem como enzimas proteolíticas e proteínas da matriz extracelular como tenascina (EGEBLAD et al., 2005).

Sendo assim, a necessidade de se identificar e caracterizar sinais específicos que podem levar à conversão de fibroblastos relativamente quiescentes à miofibroblastos tem adquirido uma importância marcante, destacando-se entre eles o PAR-2, o TGF β 1 e a IL-6.

Especula-se que o PAR-2 esteja envolvido em várias neoplasias humanas regulando a proliferação celular, via triptase, liberada pelos mastócitos (YOSHIE et al., 2005; WATANABE et al., 2012). Porém, ao nosso conhecimento, ainda não existem estudos de PAR-2 relacionados à neoplasias de glândula salivar.

O TGF β 1 é o principal responsável pela transdiferenciação de fibroblastos à miofibroblastos (THODE et al., 2011), uma vez que a sua ativação resulta no aumento de α -actina de músculo liso (WIPFF et al., 2007). Em adição, ao nosso conhecimento, embora estudos prévios tenham mostrado a importância desse fator de crescimento na progressão e prognóstico de neoplasias de glândula salivar (MANGUITA et al., 2010; DONG et al., 2011; WANG et al., 2011), apenas um destacou a sua distribuição em relação a miofibroblastos e somente em carcinoma mucoepidermóide (SOBRAL et al., 2004).

A interleucina (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória que pode ser produzida, entre outros, por miofibroblastos e mastócitos (HEIKKA et al., 2008). A sua presença no microambiente tumoral estimula o crescimento e a invasão neoplásicas (Hugo et al., 2012), embora em tumores de glândula salivar, isto pareça ser controverso (GANDOUR-EDWARDS et al., 1995); uma vez que estes últimos autores observaram

uma forte presença dessa citocina em tumores de glândula salivar benignos e de baixa agressividade.

Portanto, considerando a importância dos mastócitos em neoplasias humanas, incluindo aquelas originadas de glândula salivar (VIDAL et al., 2010; JAAFARI-ASHKAVANDI e ASHRAF, 2014). bem como a sua contribuição na diferenciação miofibroblástica, este estudo visa a estudar a distribuição de mastócitos e proteínas relacionada (PAR-2, TGF β 1, IL-6), em diferentes neoplasias de glândulas salivares com e sem conteúdo mioepitelial e de alto e baixo índice proliferativo, a fim de contribuir para o conhecimento do perfil biológico dessas neoplasias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR

2.1.1 Adenoma Pleomórfico

O adenoma pleomórfico é a neoplasia benigna de glândula salivar mais comum. Acomete principalmente a glândula parótida, porém pode ser encontrada na submandibular, sublingual e glândulas salivares menores, sendo o palato a localização mais comum dessa neoplasia (VAIDYA et al., 2012; LUKSIC et al., 2012; RAHNAMA et al., 2013; FOMETE et al., 2015; WANG et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2016; ABRAHÃO et al, 2016). Ocorre com mais frequência entre 30 e 60 anos de idade, e possui predileção pelo sexo feminino. Os pacientes usualmente apresentam uma massa de crescimento lento e indolor.

Histopatologicamente, o adenoma pleomórfico é um tumor epitelial com morfologia complexa, constituído por elementos epiteliais, mioepiteliais e estruturas ductiformes arranjados em diversos padrões, dispersos em uma matriz condróide, mixóide, hialina ou com componente ósseo (CHIDZONGA et al., 1995; MCHUGH e VISSCHER, BARNES, 2009). A cápsula é formada a partir da fibrose do tecido conjuntivo, a qual é comprimida pela massa tumoral. Possui espessura e integridade variável, e é conhecida como “falsa cápsula” (VARGHESE et al., 2003). Segundo Soares et al. (2009), a recorrência do adenoma pleomórfico está relacionada com a ruptura da cápsula, a recessão incompleta das microextensões da cápsula ou a origem multifocal.

O tratamento indicado é a excisão cirúrgica ampla para se obter margens negativas. A maioria desses tumores ocorre na parótida e, para esses casos, o tratamento utilizado é a remoção parcial ou total da parótida com preservação do nervo facial (MENDENHALL et al., 2008; LINGAM et al., 2009; TARSITANO et al., 2014). Embora a progressão seja lenta, se não tratado, o tumor pode causar significativa morbidade e, mais raramente, morte (ALVES et al., 2002; DANIELS et al., 2007).

2.1.2 Adenoma de Células Basais

O adenoma de células basais (AB) é um tumor raro, que corresponde 1-2% de todos os tumores epiteliais de glândula salivar (JANG et al., 2004; WANG et al., 2015; ABRAHÃO et al., 2016) e ocorre mais frequentemente em glândula parótida (JANG et al., 2004; KANAUIA et al., 2015). Acomete mais frequentemente mulheres com idade entre 50 e 60 anos apresentando-se como uma massa palpável arredondada ou ovalar, indolor, não aderida a planos profundos e com um crescimento lento e progressivo (CALLEJO et al., 2010; ABRAHÃO et al., 2016). Tendem a ser menores do que os adenomas pleomórficos, medindo 3 cm ou menos em seu maior de diâmetro (JANG et al., 2004; GUPTA et al., 2011).

Histologicamente, o AB é caracterizado pela presença de células basalóides uniformes e regulares, que apresentam duas morfologias distintas e interligadas. Um grupo consiste em células pequenas com pouco citoplasma e intenso núcleo basalóide arredondado localizadas na periferia dos ninhos tumorais ou ilhas. O outro grupo é formado por células grandes com citoplasma abundante e núcleos em paliçada localizadas no centro dos ninhos tumorais. Uma estrutura semelhante a membrana basal

envolve estes ninhos tumorais, separando-os do tecido conjuntivo que os envolve (NAGAO et al., 1982; GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2006; KANAUIA et al., 2015).

O tratamento indicado é a completa excisão cirúrgica do tumor (YADAV et al., 2015; KANAUIA et al., 2015).

2.1.3 Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade

Trata-se de um tumor maligno epitelial de glândula salivar, encontrado mais frequentemente em glândulas salivares menores (PINTOR, FIGUEROA e MARTÍNEZ, 2007; MCHUGH, VISSCHER e BARNES, 2009; PATEL et al., 2015; WANG et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2016; ABRAHÃO et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2016). Aproximadamente 60% dos casos estão localizados na região do palato (RUÍZ-GODOY et al., 2007; PATEL et al., 2015; WANG et al., 2015; ABRAHÃO et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2016), mas outras regiões como parótida, glândula lacrimal, nasofaringe, orofaringe e fossa nasal também tem sido descritas (PALERI et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2016). Acomete uma ampla faixa etária entre 23-94 anos, com idade média de 59 anos (ARATHI, BAGE, 2009), e possui predileção pelo sexo feminino (RUÍZ-GODOY et al., 2007; PATEL et al., 2015; ABRAHÃO et al., 2016). Clinicamente, apresenta crescimento lento e indolor. Ocasionalmente pode estar associado à dor e ulceração. Diferentemente das demais neoplasias malignas, o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau exibe pequenas taxas de metástase regional e à distância bem como raras recorrências (PALERI et al., 2008; PATEL et al., 2015).

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau é uma entidade bem reconhecida em glândulas salivares menores apresentando um padrão histológico distinto (KRISHNAMURTHY, VAIDHYANATHAN e MAJHI, 2011; PATEL et al., 2015;

DOS SANTOS et al., 2016). Caracteriza-se por ser uma lesão não encapsulada com margens infiltrativas, uniformidade citológica e diversidade morfológica (PINTOR, FIGUEROA e MARTÍNEZ, 2007; DOS SANTOS et al., 2016). Vários padrões arquiteturais podem ser observados: cribriforme, tubular, sólido e trabecular (ARATHI, BAGE, 2009). Estudos têm mostrado que a presença de estruturas papilíferas possui uma significativa importância para o prognóstico, já que o subtipo papilífero apresenta maior tendência à metástase (MILLS, GARLAND e ALLEN, 1984; CARVALHO et al., 1993; EVANS e BATSAKIS, 1984; GNEEP, CHEN e WARREN, 1988; NORBERG, BURFORD-MASON e DARDICK, 1991; SLOOTWEG e MULLER, 1987). As células neoplásicas apresentam-se pequenas, com núcleo ovóide e raras figuras mitóticas são vistas. O estroma tumoral é composto por tecido fibroso que apresenta graus variáveis de material hialino, mixóide ou condromixóide (PALERI et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2016). Invasão do osso adjacente e infiltração perineural têm sido observadas em alguns casos (PINTOR, FIGUEROA e MARTÍNEZ, 2007).

O tratamento de escolha é a excisão cirúrgica (CASTLE et al., 1999; PATEL et al., 2015). Em casos de infiltração perineural e vascular é realizada a quimioterapia ou radioterapia (RUÍZ-GODOY et al., 2007; PATEL et al., 2015).

2.1.4 Carcinoma Mucoepidermóide

De acordo com alguns autores, carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno mais prevalente em glândula salivar maior e menor (AUCLAIR et al., 1992; GOODE et al., 1998; LUNA, 2006; TRIANTAFILLIDOU et al., 2006a; McHUGH et al., 2011; ADAMS; WARNER; NÖR, 2013; ABRAHÃO et al, 2016). Acomete principalmente

pacientes entre a terceira e quinta décadas de vida, com idade média de 45 anos (LUNA, 2006). Alguns estudos demonstram preferência pelo sexo feminino (AUCLAIR et al., 1992; BOAHENE et al., 2004; RAPIDIS et al., 2006; BAI et al., 2013; WANG et al., 2015). A parótida é a glândula maior mais afetada; das glândulas salivares menores, o palato é o local mais frequentemente acometido (LUNA, 2006; BAI et al., 2013; WANG et al., 2015). Clinicamente, apresenta-se como um crescimento nodular indolor, porém em alguns casos, outros sintomas como dor, ulceração e sangramento podem estar presentes (BOAHENE et al., 2004).

Histologicamente, é composto por proporções variadas de células epidermóides, mucosas, intermediárias, colunares e claras, arranjadas em grupos ou distribuídas aleatoriamente, dispostas entre formações císticas (LUNA, 2006). Acredita-se que a sua origem seja a partir de células pluripotentes dos ductos excretórios que são capazes de se diferenciar em células escamosas, colunares e mucosas (BOAHENE et al., 2004). De acordo com as características morfológicas e citológicas, são classificados em tumores de baixo, intermediário e alto grau de malignidade (RAPIDIS et al., 2006). Os tumores de baixo grau são caracterizados por proeminente formação cística, raras áreas celulares sólidas e grande proporção de células mucosas. O grau intermediário apresenta predomínio de células intermediárias dispostas em ilhas e pouca formação cística. Em neoplasias de alto grau, predominam áreas sólidas compostas por células epidermóides e intermediárias, com presença de atipia, anaplasia, múltiplas mitoses e necrose (LUNA, 2006; TRIANTAFILLIDOU et al., 2006a; TROSMAN et al., 2014).

O prognóstico do paciente está diretamente relacionado à forma de tratamento, às características clínicas e principalmente ao grau histológico da neoplasia. Os tumores de baixo grau de malignidade apresentam uma menor agressividade e melhor prognóstico, enquanto que as neoplasias de alto grau possuem grande potencial invasivo

e metastático, reduzindo a sobrevida do paciente (GOODE et al., 1998; LUNA, 2006). Num estudo com 125 carcinomas mucoepidermóides feito por McHugh et al. (2012), os tumores de baixo e de grau intermediário apresentaram melhor controle local e sobrevida.

O tratamento indicado para o carcinoma mucoepidermóide de baixo grau de glândula salivar menor é a excisão cirúrgica local. Em casos de tumores de alto grau é indicada a cirurgia radical com ressecção óssea e a associação da cirurgia com a radioterapia, porém esse tumor aparenta ser radioresistente (TRANTAFILLIDOU et al., 2006a; TROSMAN et al., 2014).

2.1.5 Carcinoma Adenóide Cístico

O carcinoma adenóide cístico representa 1% dos tumores de cabeça e pescoço (DUBERGÉ et al, 2012). É um tumor epitelial maligno que acomete principalmente as glândulas salivares menores, sendo relativamente raro em glândulas salivares maiores (SOARES et al., 2008). Pode se desenvolver em diversas regiões, incluindo glândulas salivares, árvore brônquica, esôfago, glândula lacrimal, pele, mama, dentre outros (KHAN et al., 2001; MOSKALUK, 2013). Ocorre em uma ampla faixa etária, com maior incidência entre a quarta e sexta décadas de vida. As mulheres são acometidas com maior frequência do que os homens (GIANNINI et al., 2006; LUKŠIĆ et al., 2014; WANG et al., 2015). Em adição, em alguns estudos epidemiológicos de glândula salivar, o carcinoma adenóide cístico mostra-se como o tumor mais comum (FOMETE et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2016), em especial nos estudos de glândula salivar menor (VAIDYA et al., 2012; LUKSIC et al., 2012; WANG et al., 2015).

O carcinoma adenóide cístico apresenta crescimento lento e invasivo, podendo desenvolver dor, inchaço, ulceração e paralisia do nervo facial (MARCOS et al., 2008), sendo caracterizado por alta taxa de recorrência, invasão perineural e metástases à distância (TRIANTAFILLIDOU et al., 2006b; SOARES et al., 2008; LUKŠIĆ et al., 2014).

O carcinoma adenóide cístico que sofre o processo de transformação para alto grau comumente envolve palato, glândulas mucoserasas sinonasais, e glândulas submandibulares. Além disso, são detectados em estágios avançados devido ao envolvimento ósseo ou extraglandular. Apresenta características clínicas importantes, como alta possibilidade de metástase linfática (57%), sendo que no carcinoma adenóide cístico convencional a probabilidade é de 5-25% (SEETHALA et al., 2007; EL-NAGGAR e HUVOS, 2005; DUBERGÉ et al., 2012).

Uma característica marcante do CAC é a sua capacidade de invadir tecido nervoso (WAAL, 1990; AMIT et al., 2014). A invasão perineural é definida como a presença de células tumorais viáveis no espaço perineural, enquanto que a invasão intraneural é a presença de células tumorais no interior do feixe nervoso, com ou sem destruição do axônio (AMIT et al., 2014). Rapidis et al. (2005) afirmam que a invasão perineural facilita o desenvolvimento de metástases, afetando negativamente no controle local e na sobrevida do paciente. Por outro lado, Amit et al. (2014) sugerem que a invasão intraneural, e não a invasão perineural, está associada a um pior prognóstico.

Histologicamente, é composto por células tumorais dispostas em lençóis, ninhos sólidos, túbulos ou estruturas cribriformes e o tecido conjuntivo apresenta material hialino ou mucoso exibindo estruturas semelhantes a cistos (MARCOS et al., 2008; BRAZÃO-SILVA et al., 2013). De acordo com o padrão de crescimento, o carcinoma adenóide cístico é classificado em: tubular, cribriforme e sólido, sendo que um tumor

pode conter dois ou mais subtipos (BRADLEY, 2004; SOARES et al., 2008; VIDYALAKSHMI; ARAVINDHAN, 2014). O padrão cribriforme é o mais comum, sendo denominado de “queijo suíço” devido à grande presença de estruturas pseudocísticas. O padrão tubular apresenta estruturas semelhantes a ductos, e por fim, o padrão sólido apresenta pouca ou nenhuma estrutura pseudocística e exibe maior pleomorfismo celular e atividade mitótica quando comparado aos demais padrões (GIANNINI et al., 2006; VIDYALAKSHMI; ARAVINDHAN, 2014).

Os subtipos histológicos apresentam comportamentos biológicos distintos que proporcionam prognósticos diferentes. O padrão cribriforme e tubular apresentam melhores prognósticos, enquanto que o padrão sólido apresenta pior prognóstico com maior risco de metástase (BRADLEY, 2004; GIANNINI et al., 2006; SHEN et al., 2012).

Existem várias possibilidades para o tratamento do carcinoma adenóide cístico: a terapêutica cirúrgica, a quimioterapia, a radioterapia e a terapia combinada, sendo esta última o tratamento de escolha para a maioria dos casos (SOARES et al., 2008; DUBERGÉ et al, 2012). O acompanhamento do caso é necessário devido ao alto índice de recorrência e metástases à distância (TRIANAFILLIDOU et al., 2006b, DUBERGÉ et al., 2012; MOSKALUK, 2013).

2.2 Mastócitos

Os mastócitos são um grupo de células derivadas da medula óssea, reguladores cruciais da inflamação e da resposta imune, por liberar diversas substâncias bioativas. Estas moléculas efetoras podem ser classificadas em três categorias: mediadores associados a grânulos pré-formados, como a serotonina, histamina, heparina, triptase e quimase; mediadores sintetizados por estímulos, como mediadores lipídicos (PAF),

prostaglandinas (PDG₂) e leucotrienos (LTB₄ e LTD₄), e por fim as citocinas, como as interleucinas, fator de crescimento tumoral (TNF- α), fator de crescimento transformador (TGF- β) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (WASIUK et al., 2009). Contudo, os mastócitos somente irão conseguir disponibilizar todos esses mediadores ao meio se estiverem em um estágio adequado de maturação e desenvolvimento, o qual só é alcançado devido à ação estimulatória de outras moléculas, especialmente do *stem cell factor* (SCF), fator de crescimento de neurônios, e algumas interleucinas, como a IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10 (Interleucinas -3, -4, -9, -10), que são os principais responsáveis pelo crescimento e diferenciação destas células (CONTI et al., 2007; NORRBY 2002).

Os mastócitos localizam-se no tecido conjuntivo próximo a vasos sanguíneos e nervos, residindo na maioria dos tecidos humanos, em especial, na pele, vias aéreas e trato digestivo, onde exercem funções importantes em muitos processos fisiológicos e patológicos, tais como cicatrização e remodelação tecidual, resposta imune inata e adquirida, processos inflamatórios agudo e crônico, além de participar efetivamente na biologia do câncer e demais alterações neoplásicas (CONTI et al 2007; MALTBY, KHAZAIE, MCNAGNY, 2009; DE OLIVEIRA et al., 2004; MICHAILIDOU, MARKOPOULOS e ANTONIADES 2008; FLEISCHMANN et al., 2009; RAO e BROWN, 2008; NORRBY, 2002; WASIUK et al., 2009; XIANG et al. 2010; DE ASSIS et al., 2012; SOUSA-NETO, et al., 2016), incluindo várias neoplasias malignas (TOMITA et al., 1999; MANGIA et al, 2011; WATANABE et al, 2012), tais como câncer de cólon, próstata, rim (YOSHII et al., 2005; STROUCH et al., 2010; JOHANSSON et al., 2010; NEMOLATO, 2010; WATANABE et al., 2012) e de glândula salivar (VIDAL et al., 2013; JAAFARI-ASHKAVANDI e ASHRAF, 2014).

Os mastócitos podem ser classificados de acordo com o conteúdo de proteases presentes em seus grânulos citoplasmáticos, mastócitos que contêm triptase e quimase, e

os mastócitos que possuem apenas triptase. Tais fenótipos não são estáticos, podendo ser alterados de acordo com o microambiente, a partir de estímulos moleculares, como o fator de crescimento de colônia, IL-6 e IL-1 (CARLINI et al., 2009; ROJAS et al., 2005; PIO CONTI et al., 2007; MALTBY, KHAZAIE e MCNAGNY, 2009; NORRBY, 2002; XIANG et al., 2010). Em relação à ação destas enzimas, a quimase interfere especificamente na degradação da matriz extracelular a partir da ativação de metaloproteinases (MMPs) latentes, o que favorece indiretamente a angiogênese, uma vez que este processo libera fatores pró-angiogênicos armazenados na intimidade dos tecidos. Por outro lado, a triptase é um potente fator pró-angiogênico associado a proliferação de células endoteliais, além de participar no aumento da permeabilidade vascular, remodelação do tecido conjuntivo e proliferação das células tumorais. (CARLINI et al., 2009; ROJAS et al., 2005; RIBATTI, CRIVELLATO e MOLICA, 2009).

Imunologicamente, os mastócitos podem apresentar efeitos benéficos à biologia tumoral ou participar efetivamente na rejeição e supressão do tumor (PIO CONTI et al., 2007). Este comportamento dual é provavelmente atribuído à capacidade dessas células de secretarem mediadores individuais, através da regulação de fosfoprotéínas específicas, em um processo denominado de “liberação diferencial” ou “ativação intragranular”, no qual elas liberam alguns mediadores seletivamente sem degranulação. Há diversas substâncias provenientes dos mastócitos que podem inibir o crescimento tumoral, como a IL-1, IL-4, IL-6 e o fator de necrose tumoral que induzem a apoptose de células endoteliais e tumorais. Além dessas, há ainda o condroitin sulfato que inibe metástases, a quimase para a qual é atribuída a indução de apoptose em diferentes tipos celulares, e a triptase que apesar de estimular a angiogênese, também promove o recrutamento de células inflamatórias e fibroblastos. (RAJPUT et al., 2008; PIO CONTI

et al., 2007; THEOHARIDES, CONTI, 2004). Além disso, os mastócitos podem favorecer a progressão de tecidos neoplásicos, por um processo de tolerância imunológica e/ou da supressão da resposta imune, através da liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β . Por outro lado, os mastócitos podem participar da rejeição do tumor, por desencadear uma resposta imunológica efetiva contra as células tumorais, através do recrutamento e interação com outras células do sistema imune (RAO, BROWN 2008; MALTBY, KHAZAIE e MCNAGNY, 2009).

Estudos ainda apontam que a inibição da degranulação suprime o crescimento tumoral, sugerindo que a atividade pró-tumoral dos mastócitos está relacionada aos mediadores liberados nos grânulos (ROCHE, 1986; NOEL et al., 2008).

2.2.1 Mastócitos e fibroblastos

Os mastócitos exercem efeitos significantes nos fibroblastos, devido à sua variedade de mediadores (MANGIA et al., 2011). Au et al. (2007) afirmaram que os mastócitos se comunicam com os fibroblastos presentes no tecido de granulação por meio das junções comunicantes intercelulares do tipo *gap*, modulando o reparo da ferida e a fibrose.

Os mastócitos degranulados liberam mediadores como histamina, heparina, IL-1 β , proteína quimioatraente para monócitos (MCP-1) e fatores de crescimento como TGF- β (BRIGHTLING et al., 2003). Alguns dos produtos secretados pela degranulação dos mastócitos, incluindo histamina, TGF- β , TNF- α , MCP-1 e fator derivado de células estromais-1 α (SDF-1 α) podem ser potentes desencadeadores da imigração de células inflamatórias e fibrócitos *in vivo* (TANG et al., 1998; ABE et al., 2001; METZ, 2003; PHILLIPS et al., 2004; HERZOG e BUCALA 2010). Adicionalmente, podem também

liberar proteases como MMP2 e a MMP9 (metaloproteinases -2 e -9) (FANG et al., 1999).

Ao mesmo tempo em que ocorre um aumento local do número de mastócitos no tecido, torna-se evidente um maior número de miofibroblastos (HEBDA et al., 1993). Numerosos mediadores produzidos pelos mastócitos influenciam diretamente as propriedades funcionais-bioquímicas dos fibroblastos e miofibroblastos. A triptase, por exemplo, induz a proliferação de fibroblastos estromais e a diferenciação miofibroblástica (MANGIA et al., 2011). Epivatianos et al. (2008) sugerem que a triptase contida nos mastócitos está envolvida no processo de fibrose da sialoadenite submandibular crônica, entretanto, os miofibroblastos e fibroblastos CD34 + não estão correlacionados.

Battle et al. (2007) correlacionaram a densidade de mastócitos e a fibrose miocárdica em pacientes com alteração cardíaca congestiva e concluíram que os mastócitos sintetizam produtos vasosativos e fibrogênicos que contribuem para remodelação ventricular na falha cardíaca.

Mangia et al. (2011) sugeriram que durante a progressão do câncer de mama, os mastócitos podem contribuir para remodelação do estroma e diferenciação de miofibroblastos, através da liberação da triptase no microambiente tumoral em sinergia com outros mediadores.

2.2.2 Mastócitos e o Prognóstico Tumoral

A contribuição dos mastócitos para o crescimento tumoral e o seu significado prognóstico é controverso (RIBATTI, CRIVELLATO, 2009). Entretanto, as evidências mostram que os mastócitos contribuem para o crescimento tumoral devido ao seu

estímulo angiogênico e efeito na remodelação da matriz extracelular, além de modular a resposta imune (MALTBY et al., 2009). Em adição, mastócitos ativados liberam IL-6 (HUGO et al., 2012), que pode contribuir para invasividade do câncer (SULLIVAN et al., 2009).

De acordo com a revisão de Pio Conti et al. (2007), estes observaram uma correlação positiva entre a densidade dos mastócitos e um melhor prognóstico em câncer de mama. Contudo, Xiang et al. (2010) analisando a participação da triptase dos mastócitos na biologia do câncer de mama, observaram que uma maior quantidade de triptase correlaciona-se com a progressão maligna e risco de metástases aos linfonodos.

O estudo de Gomes et al. (2008) e Michailidou, Markopoulos e Antoniades (2008) observaram a presença de mastócitos em lesões orais pré-malignas e malignas, e concluíram que a densidade de mastócitos aumenta conforme o grau de displasia e agressividade da lesão. Além disso, os últimos também observaram a associação de microvasos em relação ao número de mastócitos e ao nível de alteração displásica da lesão. O nosso grupo, em 2010, realizou também um estudo em lesões de queilite actínica com diferentes graus de displasia, que mostrou um acúmulo de células de Langerhans e mastócitos nessas lesões. Embora não houvesse diferença significativa entre os diferentes graus de displasia, foi mostrada uma diferença significativa entre a população de mastócitos e mucosa labial normal (ARAÚJO et al., 2010).

Johansson et al. (2010) apontam os mastócitos como um novo marcador prognóstico independente do câncer de próstata, representando um alvo para terapia, tendo em vista que os mastócitos afetam a progressão tumoral em animais e humanos. Além disso, os mastócitos peritumorais fornecem FGF-2 para o microambiente tumoral, o qual pode contribuir para seu efeito angiogênico.

Vidal et al., (2013) estudaram a presença de mastócitos e densidade de microvasos em neoplasias de glândulas salivares. Foi observada uma diferença quantitativa entre densidade de mastócitos e microvasos, particularmente em CME, que é um tumor maligno de comportamento agressivo sem diferenciação mioepitelial.

Jaafari-ashkavandi e Ashraf (2014) analisaram a presença de mastócitos em tumores de glândulas salivares, e mostraram que, embora a densidade de mastócitos tenha sido maior nos tumores benignos e malignos em relação a glândula salivar normal, essa diferença não foi significativa entre os grupos.

Estudos realizados em câncer de próstata têm demonstrado a relação entre a localização dos mastócitos e o prognóstico do tumor, no qual os mastócitos presentes no interior do tumor estão relacionados com um melhor prognóstico, enquanto o acúmulo em regiões peritumorais está associado a piores prognósticos (FLEISCHMANN et al., 2009; JOHANSSON et al., 2010). Contudo, Carlini et al. (2009) demonstraram que apenas os mastócitos do tipo triptase-quimase tem valor prognóstico, estando associado ao maior risco de morte quando comparado a pacientes com baixa densidade de MC_{TC}. Além disso, estes autores observaram que o acúmulo de mastócitos foi maior em regiões peritumorais quando comparado a áreas intratumorais, e que a densidade de microvasos se correlaciona diretamente com a quantidade de mastócitos presentes. Nosso grupo também demonstrou distribuição peritumoral similar em tumores odontogênicos benignos (DE ASSIS et al., 2012).

2.4 Miofibroblastos

O microambiente tumoral consiste de vários tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, componentes vasculares, e células inflamatórias da resposta imune inata e

adquirida), como também da matriz extracelular (MEC) por eles produzida e todas as moléculas que estão concentradas e imobilizadas nele (EGEBLAD et al., 2005).

A maioria dos tumores incorpora um tipo de célula fibroblástica biologicamente ativa conhecida por uma variedade de termos: fibroblastos reativos, miofibroblastos ou simplesmente fibroblastos associados a carcinomas (FACs) (FRANCO et al., 2010).

O fibroblasto é capaz de adaptar-se a injúria tecidual e durante a cicatrização de feridas ele muda seu fenótipo tornando-se “reativo”. O fibroblasto reativo é denominado miofibroblasto- um tipo celular que exhibe propriedades mútuas de fibroblastos e de células da musculatura lisa. Além da presença no processo cicatricial de feridas, os fibroblastos reativos são também observados em neoplasias, sendo comumente denominados FACs (EGEBLAD et al., 2005).

Os miofibroblastos são células mesenquimais de formato fusiforme ou estrelado, com retículo endoplasmático rugoso proeminente, feixes de miofilamentos contráteis periféricos e fibronexos. Apresentam junções tipo *gap* que permitem a comunicação eletroquímica entre as células (EYDEN, 2008). Estas células estão presentes em tecido de granulação e no estroma tumoral e exibem similaridades na estrutura, imunofenótipo e nas atividades moleculares (EYDEN et al., 2009). Na cicatrização de feridas, os miofibroblastos produzem a contração local da matriz, um processo que ocorre com o suporte da síntese e secreção do colágeno (GABBIANI, 2003).

O miofibroblasto representa uma das diversas células envolvidas na regulação da carcinogênese. Ele exerce um papel central no complexo processo de interação tumor-estroma e, conseqüentemente, evidências crescentes sugerem que os miofibroblastos contribuem à carcinogênese, progressão neoplásica, angiogênese e metastáse, comparados com fibroblastos obtidos de localizações não-neoplásicas (MANGIA et al., 2011). No estroma tumoral, a contratilidade e a produção de colágeno pelos

miofibroblastos explicam o fenômeno de retração e a consistência firme dos carcinomas (SEEMAYER et al.,1979).

A necessidade de se identificar e caracterizar sinais específicos que podem desencadear a conversão de fibroblastos relativamente quiescentes para miofibroblastos tem adquirido uma nova importância. Por exemplo, embora a sinalização da triptase via PAR-2 possa contribuir para a fibrose intersticial cardíaca através da ativação dos miofibroblastos, o seu mecanismo ainda não é bem compreendido. Estudos recentes na literatura tem mostrado a importante função da sinalização da triptase via PAR-2 na ativação da síntese de colágeno em vários tipos de células primárias (DIXON e CUNNINGTON, 2011).

Os FACs diferem dos fibroblastos normais pela alta expressão anormal de actina de músculo liso (α -SMA) e o aumento da expressão de enzimas proteolíticas e proteínas da MEC, como a tenascina (EGEBLAD et al, 2005). Adicionalmente, outros marcadores como a vimentina, desmina ou miosina de músculo liso podem ser usados em combinação com α -SMA para distinguir entre subpopulações de miofibroblastos e fibroblastos normais ou células do músculo liso (KUNZ-SCHUGHART e KNUECHEL, 2002; TUXHORN et al., 2001). Nos miofibroblastos cardíacos, apesar da α -SMA ser o padrão ouro como marcador, outro igualmente usado é o domínio EXTRA A da fibronectina (ED-A fibronectin) (SANTIAGO et al., 2010).

A origem dos FACs ainda não está clara e é um alvo de investigações extensas. Entretanto, recentemente têm sido propostos mecanismos que explicam a sua origem: os fibroblastos residentes locais; transição epitélio-mesênquima (TEM); células mesenquimais ou ainda da transição endotélio-mesênquima (EndMT) (DESMOULIERE et al., 2004; XING et al., 2011). As células derivadas da TEM têm

sido identificadas a microscopia de luz como miofibroblastos (WILLIS et al., 2006; RADISKY et al., 2007).

Outros estudos mostram a importância de TEM na deposição da matriz extracelular em processos de fibrose e no estroma tumoral. As evidências mostram que as células derivadas de TEM perdem antígenos epiteliais (E-caderina, desmoplaquina, proteína da zônula de oclusão-1 e citoqueratina 18) e adquirem marcadores mesenquimais (vimentina, proteína fibroblasto específica-1, fibronectina, colágeno I e III, desmina e α -SMA) (KALLURI e NEILSON, 2003; WILLIS et al., 2006).

2.4.1 Miofibroblastos e Neoplasias

A interação entre células tumorais e fibroblastos estromais exerce um papel essencial na progressão do tumor (OYANAGI et al., 2014). A importância dos FACs na carcinogênese epitelial tem sido descrita em experimentos de recombinação, mas apenas recentemente têm sido identificadas algumas moléculas responsáveis por esses efeitos. Entretanto, a maioria dessas moléculas não é exclusiva dos FACs nos carcinomas. Um exemplo é a proteína secretada por fibroblasto (FSP1), a qual é expressa tanto nos FACs como nas células do carcinoma durante a progressão tumoral (AMBARTSUMIAN et al., 1996), e possivelmente por macrófagos (INOUE et al., 2005).

Os miofibroblastos são reconhecidos como promotores tumorais. Uma grande quantidade de miofibroblastos no estroma tem sido associada ao pobre prognóstico (KALLERMAN et al., 2007; SUROWIAK et al., 2007; GUPTA, METGUD e GUPTA, 2015; JAYARAJ et al., 2015; GUPTA, RAMANI e CHANDRASEKAR, 2015). Os miofibroblastos promovem a proliferação das células do carcinoma (SEEMAYER et al., 1979), pela secreção de fatores de crescimento como TGF β (BHOWMICK et al., 2004)

e enzimas proteolíticas como as (MMPs) e ativador do plasminogênio uroquinase (BHOWMICK et al., 2004; NIELSEN et al., 2001; DESMOULIERE et al., 2004). Essas moléculas degradam a matriz, incluindo a membrana basal, um processo que facilita a migração das células tumorais e libera ativadores latentes de migração (XING et al., 2011; EYDEN et al., 2009).

FACs secretam citocinas pró-inflamatórias como TGF- β , fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que atraem células imunes em excesso para região do estroma tumoral, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Os macrófagos atraídos pelos gradientes quimiotáticos liberam fatores de ação endotelial como VEGF, HGF, MMP2 e IL-8. As diversas citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos FACs propiciam um estado de inflamação crônica, o qual facilita a metástase (FRANCO et al., 2010; XING et al., 2011).

Miofibroblastos também promovem a angiogênese. Consequentemente, tanto a degradação da matriz como a angiogênese facilitam a progressão tumoral (ORIMO e WEINBERG, 2006). Entretanto, os miofibroblastos apresentam uma heterogeneidade funcional (EYDEN et al., 2009). Por exemplo, o carcinoma tubular de mama apresenta muitos miofibroblastos estromais (HARRIS e AHMED, 1977), mas tem um baixo potencial de metástase. Isto resulta de uma falha no repertório de moléculas pró-invasivas (EYDEN et al., 2009).

Em câncer de mama, miofibroblastos promovem o crescimento tumoral, angiogênese e invasão por CXCL12, MMP9 E MMP14 (Hu et al., 2009; Orimo et al., 2005). Em câncer de próstata, os miofibroblastos promovem crescimento das células neoplásicas e invasão por CXCL12, CXCL14, MMP2 E MMP3 (Augsten et al., 2009; Wang et al., 2010). No carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço, o crescimento e invasão são promovidos por MMP2 e MT1-MMP derivados de

fibroblastos (Zhang et al., 2006). Em neoplasias de glândulas salivares, tem sido demonstrado que os miofibroblastos estão relacionados ao padrão de crescimento agressivo do CAC devido sua alta expressão de MMP-2 e da quimiocina CXCL12 (Guan et al., 2014).

2.4 PAR-2

Receptores ativados por protease (PAR) representam uma subfamília de proteínas G compostas por quatro membros (PAR-1, -2, -3 e -4) acoplados a receptores de domínio transmembrana e ativados por serinoproteases (McLARTY et al., 2011), cuja ação é clivar a sequência N-terminal extracelular do seu receptor. Esta cascata de sinalização celular é seguida por consequente aumento de cálcio intracelular via segundo mensageiro, o que contribui fortemente para a comunicação celular (KAUFFMANN e HOLLEMBERG, 2012). PAR-1, -2, -3 e -4 são encontrados em uma variedade de células, incluindo muitos tipos celulares do sistema cardiovascular (McLARTY et al., 2011), além de exercerem importante função na progressão tumoral e metástase (KAUFFMANN e HOLLEMBERG, 2012).

O mecanismo de ativação dos PARs tem sido investigado e a triptase tem se apresentado como ativador do PAR-2, mas não da -1, -3 e -4. PAR-1 está presente em fibroblastos cardíacos e induz a sua proliferação através da ativação por ERK1/2 (sinal extracelular regulado por proteínas quinases-isoformas 1 e 2) (ADBELKARIM et al., 2002).

O receptor PAR-2 pode responder a conhecidos agonistas naturais como a triptase e tripsina, como também a agonistas sintéticos. Enquanto a triptase é específica para o receptor PAR-2, a tripsina pode também clivar e ativar receptores de PAR-1 e 4,

mas a diferenciação mioblástica é dependente da cascata de sinalização via PAR-2 (DUCHESNE et al., 2011).

McLarty et al. (2011) observaram que os níveis de PAR-2 estão aumentados em fibroblastos cardíacos na presença de triptase, que induz a produção de colágeno. A via de ativação dos fibroblastos cardíacos é iniciada pela triptase que estimula PAR-2 e induz a ativação de MAPK (Mitógenos ativados por proteína quinase) na forma de fosforilação da ERK1/2). Esta fosforilação leva a conversão de fibroblasto a miofibroblasto e por último, o acúmulo de colágeno no coração, isto é, a fibrose do coração hipertenso.

Especula-se que o PAR-2 esteja envolvido em várias neoplasias malignas humanas regulando a proliferação celular, através da sinalização da triptase liberada pelos mastócitos (YOSHI et al., 2005; WATANABE et al., 2012).

2.4.1 Mastócitos e ativação dos fibroblastos via PAR-2

De acordo com Duchesne et al. (2011), os mastócitos contribuem para o reparo tecidual em tecidos com fibrose, estimulando a proliferação dos fibroblastos através da liberação da triptase, a qual ativa o receptor ativado por protease (PAR-2). Os autores observaram que a triptase pode estimular a proliferação de mioblastos e seu efeito é parte da casacata de sinalização dependente da ativação da PAR-2 e COX-2.

Asano-Kato et al. (2005) investigaram o efeito da triptase na proliferação de fibroblastos da conjuntiva ocular e estudaram se o efeito foi mediado pelo PAR-2. Eles concluíram que a triptase aumentou a proliferação de fibroblastos, atribuindo ao PAR-2 a mediação para esta resposta.

Murray et al. (2012) observaram em seu estudo que a triptase induziu um aumento significativo na fibroproliferação, deposição de colágeno, formação do metabólito do ácido araquidônico (15-d-PGJ₂) e na expressão da PAR-2 em fibroblastos cardíacos adultos de ratos. A triptase induziu mudanças nos fenótipo dos fibroblastos cardíacos através do mecanismo PAR-2-dependente.

Watanabe et al. (2012) estudaram as funções dos 2 fenótipos de mastócitos, mastócitos triptase + e mastócitos quimase +, e sua relação com o fator de células tronco e PAR-2 em pacientes em hemodiálise e com carcinoma renal. Seus resultados mostraram que a densidade de mastócitos triptase + foi alta, tanto nas áreas peritumoral como intratumoral e nenhuma correlação significativa foi detectada em mastócitos quimase +. Enfatizaram também a importante função dos mastócitos triptase + e seus efeitos colaborativos com o fator de células tronco e PAR-2 na carcinogênese e no prognóstico tumoral. Os autores especulam que a expressão do PAR-2 pode estar super-regulada no carcinoma de células renais.

2.5 Interleucina 6 (IL-6)

A Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória, inicialmente conhecida como fator de crescimento das células B, sendo o maior indutor da fase aguda da inflamação, em combinação com IL-1 e TNF- α (HEIKKILA et al., 2008). É uma proteína imune de 185 aminoácidos glicosilados nas posições 73 e 172, que pertence à família das hematopietinas (RAY et al., 1989; KISHIMOTO, 2006).

A IL-6 é produzida por diferentes tipos de células, sendo os monócitos, fibroblastos e células endoteliais suas principais fontes (HELLE et al., 1991). Macrófagos, linfócitos T e B, granulócitos, células do músculo liso, eosinófilos,

condrócitos, osteoblastos, células da glia e queratinócitos produzem IL-6 após estímulos, assim como os mastócitos e as células tumorais (RAY et al., 1989; VAN MEIR et al., 1990; HEIKKILA et al., 2008; DIENZ e RINCON, 2009). As células do glioblastoma também sintetizam IL-6 constitutivamente, a qual também pode ser detectada no líquido cefalorraquidiano (VAN MEIR et al., 1990)

O estímulo fisiológico para síntese de IL-6 são IL-1, endotoxinas bacterianas, TNF- α , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e oncostatina M (Helle et al., 1991). Nos fibroblastos, a síntese de IL-6 é estimulada pelo interferon β (IFN β), TNF α e infecções virais (HELLE et al., 1988). A IL-6 pode também estimular ou inibir sua própria síntese, por mecanismo autócrino, dependendo do tipo celular. Nas células epiteliais, endoteliais e fibroblásticas, a secreção de IL-6 é induzida por IL-17 (GROBLEWSKA et al., 2012).

2.6.1 IL-6 e neoplasias

A IL-6 pode influenciar a carcinogênese e desempenha uma função importante na progressão de neoplasias malignas do sistema imune como linfomas B, linfoma difuso de grandes células e mieloma múltiplo (HEIKKILA et al., 2008; AGGARWAL e GEHLOT, 2009).

A IL-6 também aumenta a inflamação crônica e cria um microambiente favorável ao crescimento tumoral (AGGARWAL et al., 2006; HEIKKILA et al., 2008), tendo em vista que um persistente estado de inflamação é um importante fator para o desenvolvimento de tumores malignos (COUSSENS e WERB, 2004; VAKKILA e LOTZE, 2004).

Vários tipos tumorais apresentam seu crescimento modulado pela IL-6 e alguns tumores têm demonstrado secretar IL-6 constitutivamente, como nos carcinomas cervicais (EUSTACE et al.,1993). A atuação desta proteína inclui a inibição da apoptose das células neoplásicas e estimulação da angiogênese. (CHEN et al., 1999; HEIKKILA et al., 2008; GROBLEWSKA et al., 2012).

Elevação dos níveis séricos de IL-6 está presente em pacientes com câncer de mama (RAVISHANKARAN e KARUNANITHI, 2011), endométrio (BELLONE et al., 2005), ovário (ZAKRZEWSKA e POZANSKI, 2011), rins (NEGRIER et al., 2005), estômago (Kim et al., 2009), colo retal (GROBLEWSKA et al., 2008) e pancreático (MROCZKO et al., 2010).

Mojtahedi et al. (2011) observaram que a concentração sérica de IL-6 aumenta com a progressão estágio do tumoral do carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço, e verificaram uma diferença significativa entre o estágio IV versus estágio I/II/III.

Groblewska et al. (2012), em sua ampla revisão, afirmaram que os níveis de IL-6 estão correlacionados com as características clínico-patológicas do câncer de esôfago, tais como: estágio do tumor, profundidade de invasão tumoral e envolvimento de linfonodos.

A secreção de IL-6 no ambiente tumoral pode ser o gatilho para perpetuação do ciclo celular, estimulando o crescimento e invasão tumoral, e o aumento do número de mastócitos e miofibroblastos. Estudo aponta para uma mútua ativação entre mastócitos e fibroblastos envolvendo IL-6 de forma bidirecional. Os mastócitos em degranulação liberam IL-6 que promove a proliferação de fibroblastos, os quais também passam a secretar IL-6 como um mecanismo de *feed-back* positivo, estimulando o aumento do número de mastócitos (HUGO et al., 2012).

De acordo com Hugo et al. (2012) existem duas vias de liberação de IL-6 que promovem o crescimento do tumor: aferente e eferente. Por via aferente, os fibroblastos estromais secretam IL-6 que atua no crescimento tumoral e na invasividade via transição epitélio-mesênquima (TEM), com aquisição de expressão autócrina para reforçar sua alteração neoplásica. Já por via eferente, a secreção de IL-6 pelo tumor está associada à transformação dos fibroblastos em miofibroblastos, acentuando o crescimento tumoral.

IL-6 pode atuar como inibidor do crescimento celular de alguns tumores malignos, como carcinoma de mama e nas leucemias/células dos linfomas humanos (CHEN et al, 1988), como também no câncer de pulmão (TKIZAWA et al., 1993).

Gandour-Edwards et al. (1995) em um estudo imuno-histoquímico encontraram uma relação inversa entre a presença de IL-6 e a agressividade biológica das neoplasias de glândulas salivares. Eles observaram que os tumores benignos e de baixa agressividade exibiram reatividade mais forte que os tumores de alta malignidade e metastáticos. Entretanto, os autores ressaltam que se faz necessário mais estudos para elucidação desses achados.

2.6 TGF β 1

A família do TGF- β apresenta três isoformas em mamíferos: o TGF- β 1, o TGF- β 2 e o TGF- β 3 (AIGNER e BOGDAHN, 2008), embora existam além dessas, mais outras isoformas em anfíbios e galinhas (IEZZI et al., 2008). As três isoformas inicialmente descritas iniciam a sinalização intracelular por meio de 2 tipos de receptores transmembrana conhecidos como receptor tipo I (TGF β RI) e receptor tipo II (TGF β RII) (BOWMICK et al, 2004; RANGANATHAN et al, 2007). Após ativação dos

receptores e ligantes, via fosforilação de receptores tirosina quinase, a cascata de sinalização segue com ativação de membros da família do SMAD, atingindo o núcleo formando um complexo que age como um importante regulador da atividade transcricional (EVANS et al., 2003; MASSAGUE, SEOANE e WOTTON, 2005; BUDI et al., 2015). Os membros da família do TGF β regulam a proliferação, migração, diferenciação celular e o reparo tecidual (BIERBE e MOSES, 2006).

2.6.1 TGF β 1 e neoplasias

Durante a carcinogênese, o TGF β tem se mostrado um regulador crítico para interação tumor-estroma e invasão tumoral (OYANAGI et al., 2014; CALON et al., 2014), sendo que o TGF β 1 é um potente inibidor da proliferação das células epiteliais, mas usualmente estimula o crescimento das células mesenquimais (FORINO et al., 2006), o crescimento tumoral e invasão, ao modular o microambiente tumoral, promovendo a formação de vasos sanguíneos e matriz, e suprimindo a resposta imune (CHEN et al., 2014). De acordo com Hwang et al. (2014) o TGF β 1 promove o crescimento tumoral e favorece um fenótipo mais invasivo.

Nas fases iniciais da neoplasia, o TGF β 1 atua como supressor tumoral, entretanto nos estágios mais avançados promove a progressão tumoral, metástase e TEM, via perda de adesão de moléculas ativadoras, angiogênese, ativação de proteinases e supressão imunológica (PASCHE et al., 2001; LEWIS et al., 2004; MICHL et al., 2005; DO TV et al., 2008).

Chen et al. (2014) estudaram a expressão do TGF β 1 no citoplasma e na MEC do câncer do epitélio do ovário. A expressão do TGF β 1 no citoplasma e na MEC no epitélio neoplásico do ovário foi correlacionada negativamente com a diferenciação do

tumor, entretanto, foi positivamente correlacionado aos estágios clínicos. Adicionalmente, a expressão do TGF β 1 estava associada ao desenvolvimento e progressão tumoral, sendo a sua alta expressão na MEC associada a invasão e metástase. Similarmente, em tumores do coloretal e de próstata, a expressão de TGF β 1 apresenta-se aumentada e está correlacionada com o pobre prognóstico (TSUSHIMA et al., 1996; WIKSTROM et al., 1998).

Em estudos prévios tem sido mostrado que o TGF β 1 promove a expressão de MMP-2 que degrada a matriz intercelular, como também o maior componente da membrana basal, o colágeno tipo IV, hidrolisando a membrana basal, permitindo que as células tumorais penetrem o tecido conjuntivo (MUKAI et al., 1998). O TGF β 1 age de maneira parácrina na MEC, promovendo angiogênese e supressão da resposta imune, criando assim um microambiente favorável para o crescimento das células tumorais e metástase (CHEN et al., 2014).

Ao TGF β 1 é atribuída a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, sendo que estes últimos apresentam receptores específicos para este importante membro da família do TGF- β (ELENBAAS e WEINBERG, 2011; SARRAZY et al., 2011; THODE et al., 2011). É possível que os miofibroblastos, por meio de estresse funcional representado por tensão intra e extracelular, ative o TGF- β 1 resultando no aumento da α -actina de músculo liso (WIPFF et al., 2007).

Muitos tumores resultam da alteração na via parácrina dos fatores de crescimento. Os fatores de crescimento são mediadores de uma variedade de processos biológicos como o reparo tecidual, carcinogênese e também contribuem para proliferação celular e transformação neoplásica das células. O TGF β 1 vem sendo estudado em neoplasias de glândulas salivares e tem sido observado o seu papel crucial na iniciação, progressão, invasão e metástase dos diferentes carcinomas de glândula

salivar (MANGUITA et al., 2010; DONG et al., 2011; WANG et al., 2011; DONG et al., 2013), conforme se segue.

Dong et al. (2011) afirmaram que o TGF β 1 promove a migração e invasão do carcinoma adenóide cístico. Em adição, o TGF β 1 mostrou-se associado a metástase pulmonar (DONG et al., 2013) e ao mau prognóstico nesse tumor (GUO et al., 2002). Por outro lado, Cao et al. (2009) relataram que a expressão de TGF β 1 pode inibir o desenvolvimento do carcinoma mucoepidermoide. No entanto, Wang et al., (2011) verificaram que o TGF β 1 influencia a invasão e metástase do carcinoma mucoepidermoide.

Manguita et al. (2010) estudaram a expressão do FGF-2, TGF β -1, PDGF-A (fator de crescimento derivado de plaquetas-A) e seus respectivos receptores (FGFR-1, FGFR-2, TGF β R-II e PDGFR- α) em células mioepiteliais do adenoma pleomórfico em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Os resultados demonstraram que as células mioepiteliais foram fortemente positivas para o FGF-2 e FGR-1 e moderadamente positivas para PDGF-A e PDGFR- α , FGFR-2, TGF β -1 e TGF β R-II foram negativos em todas as amostras.

Furuse et al. (2010) estudaram diversos fatores de crescimento, entre eles o FGF e TGFbeta-1, em carcinoma ex-adenoma pleomorfo em diferentes estágios de progressão. Eles demonstraram que esses fatores podem contribuir para proliferação celular nas fases iniciais de progressão do carcinoma ex-adenoma pleomórfico.

Sobral et al. (2004) estudaram 25 casos de carcinomas mucoepidermóides avaliaram a presença dos miofibroblastos pela imunomarcagem para vimentina, desmina, SMA, TGF β 1 e TGF β RII, observando que o TGF β -1 foi positivo nas células epidermóides de tumores de grau intermediário e no estroma de poucos casos; o

TGF β R-II foi positivo na maioria das células epidermóide e intermediárias independentemente do grau de malignidade.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Estudar, a relação entre a distribuição dos mastócitos via triptase e a expressão de proteínas (PAR-2, IL-6 e TGF β 1) relacionadas com a diferenciação de miofibroblastos, em diferentes neoplasias de glândulas salivares com e sem conteúdo mioepitelial e com alto e baixo índice proliferativo.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar o conteúdo mioepitelial, através da imunoexpressão da calponina, em diferentes neoplasias de glândula salivar (adenoma pleomórfico, adenoma de células basais, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenóide cístico).

- Identificar o índice proliferativo, através da imunoexpressão do Ki-67, das diferentes neoplasias de glândula salivar (adenoma pleomórfico, adenoma de células basais, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenóide cístico).

- Identificar e comparar a presença de mastócitos (Mast cell) e miofibroblastos (SMA), por imunohistoquímica convencional e dupla marcação, nos diferentes tumores de glândula salivar (adenoma pleomórfico, adenoma de células basais, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenóide cístico):

a- Com e sem conteúdo mioepitelial, nas regiões intraparenquimal e periparenquimal.

b- Com alto e baixo índice proliferativo, nas regiões intraparenquimal e periparenquimal.

-Identificar e comparar a presença das proteínas PAR-2, IL-6 e TGF β 1 nos diferentes tumores de glândula salivar (adenoma pleomórfico, adenoma de células basais, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenóide cístico):

a- Com e sem conteúdo mioepitelial, nas regiões intraparenquimal e periparenquimal.

b-Com alto e baixo índice proliferativo, nas regiões intraparenquimal e periparenquimal.

c- Com maior ou menor quantidade de mastócitos.

d- Com maior ou menor quantidade de α -SMA.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA sob parecer número 235.138.

4.2 Caracterização do estudo

Este estudo representa um estudo transversal e descritivo, considerando a expressão imuno-histoquímica da triptase de mastócitos, α -SMA, calponina, PAR-2, IL-6, TF β 1 e Ki-67.

4.3 Casuística

A população desse estudo consistiu de casos de neoplasias de glândula salivar, obtidos dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), de um Laboratório Particular (Vitória da Conquista-Ba) e do Hospital Aristides Maltez (Salvador-Ba), Centro de Referência em Câncer no Estado da Bahia.

Da amostra, foram selecionados os casos com presença de material biológico suficiente e em boas condições de uso. Foram utilizados 10 casos de adenoma pleomórfico, 9 casos de adenomas de células basais, 10 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, 14 casos de carcinoma mucoepidermóide e 10

casos de carcinoma adenóide cístico. Os dados clínicos referentes à idade, sexo, localização anatômica e tamanho da lesão foram obtidos a partir das fichas de exames anatomopatológicos (ANEXO 1).

4.4 Estudo morfológico

Todos os casos deste estudo foram enquadrados de acordo com os critérios diagnósticos da Organização Mundial de Saúde (OMS), 2005. Em adição, também foram descritas e analisadas áreas de glândula salivar morfológicamente normal, localizadas adjacentes aos tumores.

Para análise histológica, cortes de cinco micrômetros de espessura foram obtidos dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina. As lâminas referentes a cada caso foram coradas em hematoxilina/eosina (H/E) e submetidas a novo exame histológico sob microscopia de luz e devida revisão.

4.5 Estudo imuno-histoquímico

4.5.1 Técnica Imunohistoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada em cortes de 3- μ m de espessura, um corte para cada espécime, obtidos dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina. O experimento foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da FOUFBA, em parceria com a FIOCRUZ-BA. Inicialmente foram efetuadas reações de

padronização para determinar as melhores diluições, métodos de recuperação antigênica e tempo de incubação de cada anticorpo, conforme rotina do nosso grupo de pesquisa. A seguir, os casos foram submetidos à imunomarcação para os anticorpos Ki-67, PAR-2, IL-6, Calponina, TGFβ1, Mast Cell e SMA. Dados sobre fabricante, clone, diluição, recuperação e controle positivo dos anticorpos estão descritos na Tabela 1.

As secções estendidas em lâminas de vidro, previamente silanizadas, foram desparafinizadas em dois banhos de xilol durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram re-hidratados em dois banhos de álcool absoluto durante 5 minutos à temperatura ambiente. Para exposição dos epítopos antigênicos, as secções foram submetidas à recuperação antigênica, em calor úmido a 95 C por 45 minutos (Ki-67, PAR-2, IL-6, Calponina, TGFβ1, SMA) ou na estufa a 37 C (Mast cell) por 30 minutos, conforme descrito na Tabela 1. Após os cortes retornarem à temperatura ambiente, foram novamente lavados em água corrente, seguidos do bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizado em solução de peróxido de hidrogênio a 3% e água destilada, por 10 minutos, protegido da luz.

Repetida a lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas foram imersas em três banhos sequenciais: solução de TRIS HCl BSA 1% por 5 minutos, solução de TRIS-TRITON por 5 minutos e água destilada por 5 minutos. Em seguida, os anticorpos foram diluídos com solução redutora de *background* (Dako Corporation, Carpinteria, USA), aplicados sobre os cortes e incubados por 18h (*overnight*) a 4 C (TABELA 1). O anticorpo Mast Cell foi incubado à temperatura ambiente, por 1h.

Em seguida, as lâminas foram imersas em dois banhos de solução de TRIS-HCl BSA 1% durante 5 minutos cada, e, então, foi aplicado o sistema polimérico *EnVision Advance* (Dako Corporation, Carpinteria, USA), à temperatura ambiente, durante 20 minutos em HRP link e 20 minutos em HRP enzyme.

Esta etapa foi sucedida por nova imersão em solução de TRIS-HCl BSA 1%, como já descrito anteriormente. Para revelação da reação foi empregado o DAB (3,3'-diaminobenzidina, *Dako Corporation, Carpinteria, USA*) em câmara escura por 5 minutos. Em seguida, após nova lavagem em água destilada, as secções teciduais foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 5 minutos e novamente lavadas. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Bálamo do Canadá. Para o controle negativo, cada anticorpo primário foi substituído por soro normal de mesmo isotipo.

Tabela 1. Anticorpo, marca, clone, diluição, recuperação antigênica e controle positivo. Salvador-Ba, 2016.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Recuperação	Controle positivo
Ki-67	Abcam	Policlonal	1:50	Citrato pH 6,0	CA de boca
PAR-2	Novus biologicals	Policlonal	1:50	Citrato pH 6,0	CA mama
IL-6	Novus biologicals	NB600-1131	1:600	Citrato pH 6,0	Cisto periapical
Calponina	Dako	Clone-calp	1:50	Citrato pH 6,0	Ca de mama
TGFβ1	Abcam	2 Ar2	1:100	EDTA pH 9,0	CA mama
Mast Cell	Dako	AA1	1:50	Tripsina 1%	Mastocitose
SMA	Dako	1A4	1:100	Citrato pH 6,0	Mastocitose

Dupla marcação imuno-histoquímica para triptase de mastócitos e α -SMA foi executada, sendo a co-localização dessas proteínas identificada utilizando o kit EnVision™ G2 Doublestain System. As secções histológicas seguiram para desparafinização em xilol e re-hidratação com álcool. Para exposição dos epítomos antigênicos, as secções foram submetidas à recuperação antigênica com citrato pH 6,0 em banho maria 96°C por 45 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena e de

proteínas teciduais, foi utilizado o reagente Dual Endogenous Enzyme Block™ (Dako, Carpinteria, USA), em temperatura ambiente por 10 minutos.

O primeiro anticorpo primário (Mast Cell), diluição 1:50, foi incubado por 1 hora em TA e, após isto, exposto ao reagente Polymer HRP e a reação revelada com diaminobenzidina-3'3. Após esta primeira revelação, os cortes histológicos foram incubados com a solução Doublestain Block HRP™ (Dako, Carpinteria, USA) por 10 minutos. A partir de então, as mesmas secções foram incubadas overnight (18h, 4°C) com o segundo anticorpo (SMA), diluição 1:100 e, após isto, exposto ao reagente Rabbit/Mouse Link™ (Dako, Carpinteria, USA) por 20 minutos. Foi então aplicado nos cortes o Polymer/AP por 20 minutos e a reação revelada com a solução Permanent Red Working Solution (Dako, Carpinteria, USA), por 15 minutos. As lâminas foram montadas com Glycergel Mouting Medium (Dako, Carpinteria, USA).

4.5.2 Exame imunohistoquímico

Inicialmente, todos os casos foram divididos de acordo com o seu conteúdo mioepitelial, através da marcação imuno-histoquímica para calponina. Para tal, as células mioepiteliais positivas para este anticorpo foram quantificadas em relação ao parênquima de cada tipo tumoral, adotando-se o critério estabelecido por Costa et al (2008), onde a imunorreatividade foi estabelecida como $<50\%$ e $\geq 50\%$. Dessa forma, estabelecemos os tumores com maior ou menor diferenciação mioepitelial. Aqueles casos ausentes também foram registrados

Para o Ki-67, foi realizada a contagem manual das células marcadas positivamente e das células negativas, em aumento de 400x em 10 campos, e transferidas para um monitor de vídeo por um sistema computadorizado. Após a captura através de uma câmara digital (AXIOCAM ICc3, ZEISS, Germany 2008), os casos foram analisados utilizando-se de um

software (IMAGEJ 1.48v, NIH Image, USA, 2014). Em seguida, foi feita uma porcentagem de células marcadas em relação ao total de células presentes por campo. Para possibilitar a comparação com os demais anticorpos, a porcentagem obtida através da contagem para o Ki-67 foi classificada em escores. Os casos foram classificados de acordo com a intensidade e a proporção de marcação. A intensidade foi classificada em: escore 0 = sem coloração, escore 1 = coloração fraca, escore 2 = coloração moderada e escore 3 = coloração forte. A proporção de marcação foi definida como a porcentagem de células marcadas (0 = 0-10%, 1 = 11-25%, 2 = 26-50%, 3 = 51-75%, 4 = 76-100%). O índice de marcação (IM) foi calculado através da multiplicação da intensidade (0-3) pela proporção (de 0 a 4), como segue: $IM = \text{Intensidade de marcação} \times \text{Proporção de células marcadas}$. Em seguida, classificamos a expressão de proteínas por IM: negativo (-) para IM=0, baixa expressão (1+) para IM entre 1 e 4, alta expressão (2+) para IM entre 5 e 8, e superexpressão (3+) para IM entre 9 e 12 (adaptado de DULTRA et al., 2012; YAN et al., 2013; WEI et al., 2014; DONG et al., 2014) (ANEXO 2).

O exame imunohistoquímico dos mastócitos, foi realizado com base no critério usado por Vidal et al (2013), através da identificação da presença ou ausência dos mastócitos nos diferentes tumores de glândula salivar. Foi realizada a contagem manual das células marcadas positivamente e das células negativas, em aumento de 400x em 10 campos, e transferidas para um monitor de vídeo por um sistema computadorizado. Após a captura através de uma câmera digital (AXIOCAM ICc3, ZEISS, Germany 2008), a contagem do número de mastócitos por mm^2 foi realizada, e a média de contagem foi determinada para cada caso. Foram considerados positivos, os casos onde os mastócitos exibiam marcação de cor castanha.

A análise imunohistoquímica dos mastócitos incluiu a observação dessas células no estroma e no parênquima do tumor, evitando-se áreas de inflamação significativa.

Quando os mastócitos foram observados no parênquima da lesão, foram classificados como intraparenquimais. Quando os mastócitos foram observados no estroma do tumor, foram classificados como periparenquimais, como já definidos por nosso grupo (DE ASSIS et al., 2012; VIDAL et al., 2013).

O mesmo critério proposto por Costa et al. (2008), descrito anteriormente para calponina, foi adaptado para as células estromais α -SMA positivas (miofibroblastos), onde a imunorreatividade foi estabelecida como $<50\%$ e $\geq 50\%$.

A fim de verificar a distribuição espacial comparativamente entre células α -actina de músculo liso e mastócitos, tendo em vista que estas últimas também influenciam a diferenciação de fibroblastos/miofibroblastos, no presente estudo foram quantificadas as células α -actina de músculo liso positivas em áreas de maior confluência de mastócitos (*hot spot*) em até cinco campos de 56mm^2 , comparativamente em regiões intraparenquimais e periparenquimais em todos os casos de cada neoplasia estudada.

As células positivas ao PAR-2, IL-6 e TGF β 1 foram quantificadas em cinco campos microscópicos de maior confluência, estabelecendo-se o número médio por mm^2 . Os casos foram classificados de acordo com a intensidade e a proporção de marcação, como descrito anteriormente.

Além disso, a marcação foi classificada de acordo com a sua localização: nuclear ou citoplasmática. Também foram descritos os tipos celulares positivamente marcados.

Toda a análise morfométrica foi executada por dois observadores, utilizando um microscópio de alta definição em um aumento de 400x (Axiostar Plus, Zeiss, Germany, 2008) e registrada com uma câmera digital (AxioCam Icc3, Zeiss, Germany, 2008) e um software específico (Axiovision Rel 4.8, Zeiss, Germany, 2008).

4.6 Análise estatística

Para possibilitar a comparação da imunomarcação entre dois grupos de tumores, o IM foi categorizado em dois grupos: alta imunexpressão (2+ e 3+) e baixa imunexpressão (- e 1+). Para análise estatística das imunomarcações dos anticorpos (Ki-67, PAR-2, IL-6, TGF β 1, calponina e SMA) nos diferentes tipos tumorais (AP, AB, APBG, CAC e CME) foi aplicado o Teste Exato de Fisher e o Teste Qui-quadrado de Pearson. Para análise estatística das imunomarcações dos mastócitos foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis e o Teste de Mann-Whitney. Para correla o da densidade de mastócitos intraparenquimais e periparenquimais foi realizada a Correla o de Spearman. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 IMUNOMARCAÇÃO DA CALPONINA e Ki-67

Os dados da imunomarcação da calponina e Ki-67 encontram-se descritos na TABELA 2.

5.2 IMUNOMARCAÇÃO DOS MASTÓCITOS.

Os mastócitos foram observados em todas as neoplasias de glândula salivares estudadas. As células estavam localizadas predominantemente próximo aos vasos sanguíneos e mostravam morfologia variada (oval, alongada ou arredondada). Essa popula o celular concentrou-se na região periparenquimal, independente do padrão morfológico dos tumores. Os mastócitos também foram detectados ocasionalmente no parênquima de glândulas salivares normais e em tecido glandular presente na periferia dos espécimes de alguns dos tumores estudados.

No AP, os mastócitos concentravam-se mais frequentemente na cápsula fibrosa (FIGURA 1A). A densidade total de mastócitos foi 3,35 células/mm², sendo que a marca o foi mais evidente na região periparenquimal 2,60 células/mm² quando comparada a densidade intraparenquimal 0,25 células/mm², mas essa correla o não foi estatisticamente significativa ($r=0,425$, Coeficiente de Spearman, $p=0,221$) (TABELA 4).

O AB apresentou o menor número de mastócitos totais e periparenquimais entre as neoplasias estudadas (FIGURA 1B). A densidade total de mastócitos foi 2,20 células/mm², sendo que a marca o foi mais evidente na região periparenquimal 1,80

células/mm² quando comparada a densidade intraparenquimal 0,00 células/mm², e essa correlação foi estatisticamente significante (r=0,680, Coeficiente de Spearman, p=0,044) (TABELA 4).

No APBG, a densidade total de mastócitos foi 5,50 células/mm², sendo que a marcação foi mais evidente na região periparenquimal 4,95 células/mm² quando comparada a densidade intraparenquimal 0,45 células/mm², mas essa correlação não foi estatisticamente significante (r=0,062, Coeficiente de Spearman, p=0,865) (TABELA 4), (FIGURA 1C).

O CME foi a neoplasia estudada que apresentou maior densidade de mastócitos totais, periparenquimais e intraparenquimais (FIGURA 1D). A densidade total de mastócitos foi 7,10 células/mm², sendo que a marcação foi mais evidente na região periparenquimal 3,70 células/mm² quando comparada a densidade intraparenquimal 2,60 células/mm², e essa correlação não foi estatisticamente significante (r= - 0,168, Coeficiente de Spearman, p=0,583) (TABELA 4).

No CAC, a densidade total de mastócitos foi 4,40 células/mm², sendo que a marcação foi mais evidente na região periparenquimal 4,40 células/mm² quando comparada a densidade intraparenquimal 0,00 células/mm² e essa correlação não foi estatisticamente significante (r=0,406, Coeficiente de Spearman, p=0,244). O CAC exibiu o menor número de mastócitos intraparenquimais entre as neoplasias estudadas (TABELA 4), (FIGURA 1E).

Comparando a densidade dos mastócitos entre os tumores estudados, a densidade total de mastócitos foi maior no CME, e foi observada diferença estatisticamente significante (p=0,008, Teste de Kruskal-Wallis). Em relação à localização, o número de mastócitos foi maior na região periparenquimal em todos os tumores estudados, mas não foi observada diferença estatisticamente significante (p=0,207, Teste de Kruskal-

Wallis), (TABELA 4). Na densidade de mastócitos intraparenquimais foi observada diferença estatisticamente significante entre os tumores ($p < 0,001$, Teste de Kruskal-Wallis), (TABELA 4). Quando pareados os tumores, esta diferença significativa foi observada entre CME e AP ($p = 0,010$, Teste de Kruskal-Wallis), CME e ACB ($p = 0,001$, Teste de Kruskal-Wallis), CME e APBG ($p = 0,016$, Teste de Kruskal-Wallis) e CME e CAC ($p < 0,001$, Teste de Kruskal-Wallis).

Quando comparada a distribuição entre tumores benignos e malignos, observou-se que a densidade de mastócitos total ($p = 0,060$, Teste de Kruskal-Wallis) e a densidade periparenquimal ($p = 0,025$, Teste de Kruskal-Wallis) apresentaram diferença estatisticamente significante entre os grupos, sendo mais alta nos tumores malignos (TABELA 5). No entanto, a densidade de mastócitos intraparenquimais apesar de ter sido mais elevada em tumores malignos, essa diferença não foi estatisticamente significante ($p = 0,089$, Teste de Kruskal-Wallis) (TABELA 5). Em adição, foi encontrada uma correlação positiva estatisticamente significante entre mastócitos intraparenquimais e periparenquimais nos tumores benignos ($r = 0,529$, Coeficiente de Spearman, $p = 0,020$) e uma correlação negativa nos tumores malignos, apesar desta não apresentar diferença significativa ($r = 0,03$, Coeficiente de Spearman, $p = 0,856$), (TABELA 6).

5.3 IMUNOMARCAÇÃO DO SMA

Os miofibroblastos foram observados no tecido estromal nas neoplasias de glândula salivar, com formato alongado e fusiforme.

No AP, os miofibroblastos foram observados apenas na cápsula. Não apresentou marcação no interior do tumor (FIGURA 2A), (TABELA 2).

No AB, a grande maioria dos casos (n=8) apresentou marcação inferior a 50% dos miofibroblastos, e estes se concentravam mais na periferia do tumor (FIGURA 2B), (TABELA 2).

No APBG, a marcação dos miofibroblastos, na maioria dos casos (n=7), foi inferior a 50% (TABELA 2) (FIGURA 2C).

No CME, a grande maioria dos casos (n=9) apresentou marcação inferior a 50% dos miofibroblastos (TABELA 2), (FIGURA 2D).

No CAC, 60% dos casos (n=6) apresentaram marcação dos miofibroblastos inferior a 50% (FIGURA 2E), (TABELA 2). O único caso de subtipo sólido sobressaiu-se, apresentando marcação superior a 50% (FIGURA 2F).

Quando comparada a expressão do SMA entre tumores benignos e malignos foi observado predomínio de baixa expressão de SMA em ambos os grupos (p=0,784, Teste Qui-Quadrado) (TABELA 2).

5.4 DUPLA IMUNOMARCAÇÃO MASTCELL e SMA

As células α -SMA positivas foram avaliadas em áreas de maior confluência de mastócitos (*hot spot*) em todos os casos de cada tipo tumoral (AP, AB, APBG, CME e CAC). Não foi possível estabelecer uma relação entre a presença de alta densidade de mastócitos com a presença de miofibroblastos, pois em áreas *hot spot* de mastócitos não foi encontrado miofibroblastos adjacentes nos tumores estudados, exceto em um caso de CAC (FIGURA 3).

5.5 IMUNOMARCAÇÃO DE PAR-2

Em glândula salivar normal, houve marcação citoplasmática e nuclear das células ductais (FIGURA 4A).

No AP, 50% dos casos (n=5) apresentaram superexpressão de PAR-2 (ANEXO 3). Observou-se marcação citoplasmática das células mais internas dos ductos, de algumas células mioepiteliais e células luminais (FIGURA 4B). Em um caso, a marcação ocorreu em todas as camadas do ducto. Notou-se ainda, no estroma, marcação de células inflamatórias e vasos sanguíneos.

No AB, o IM variou de negativo (n=1) a superexpressão (n=4). Houve marcação citoplasmática das células ductais e em regiões túbulo-trabeculares em áreas sólidas. A marcação do estroma foi discreta (FIGURA 4C).

No APBG, a maioria dos casos apresentou superexpressão (n=8) (ANEXO 3). Observou-se marcação citoplasmática granular das células tumorais. Em um caso apresentou também marcação nuclear. Houve marcação de fibroblastos (FIGURA 4D).

No CME, grande parte dos casos apresentou superexpressão (n=10) (ANEXO 3). Houve marcação citoplasmática de células epidermóides, intermediárias, granulares, mucosas e marcação granular dos espaços císticos. Em um caso, houve também marcação nuclear das células epidermóides e intermediárias (FIGURA 4E). No estroma, observou-se marcação de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos.

No CAC, o IM variou bastante entre os casos (ANEXO 3). Observou-se marcação heterogênea, ora do núcleo ora do citoplasma, das células internas e externas dos ductos (FIGURA 4F). Em alguns casos, notou-se marcação citoplasmática do espaço cístico de áreas cribriformes. No caso do sub-tipo sólido, houve marcação das ilhas epiteliais sólidas (FIGURA 4G). O estroma hialino e mucoide não apresentaram

marcação. Por vezes, observou-se marcação de células inflamatórias e fibroblastos, mas não marca matriz.

Quando comparados os tumores benignos (n=19) e malignos (n=34), foi observada uma alta imunexpressão do PAR-2 em doze tumores benignos (63,2%), e em vinte e sete tumores malignos (79,4%), sem diferença estatisticamente significativa (p=0,198, Teste Qui-Quadrado), (TABELA 3).

5.6 IMUNOMARCAÇÃO DE IL-6

Em glândula salivar normal, houve marcação granular e por vezes membranar das células mioepiteliais. No entanto, os ductos não apresentaram marcação (FIGURA 5A).

No AP, a marcação nuclear do IL-6 variou entre negativo (n=4) e superexpressão (n=3) (ANEXO 3). Observou-se marcação citoplasmática e membranar, eventualmente nuclear, de células epiteliais e algumas células mioepiteliais, como também células externas dos ductos. As células epitelióides mostraram marcação citoplasmática. No estroma, observou-se uma intensa marcação. Houve marcação da matriz fibrosa, células inflamatórias e alguns fibroblastos (FIGURA 5B e C).

No AB, todos os casos foram negativos (n=9).

No APBG, 90% dos casos (n=9) foi negativo à marcação do IL-6. (ANEXO 3). Um único caso apresentou marcação em áreas focais da matriz estromal. O parênquima tumoral não apresentou marcação (FIGURA 5D)

No CME, houve um predomínio de baixa expressão (n=7) e negativo (n=6) para IL-6 (ANEXO 3). A marcação foi citoplasmática das células ductais, com exceção de um caso que apresentou marcação nuclear. A marcação foi predominantemente em

células escamosas sob forma granular. No estroma tumoral, notou-se a marcação de células inflamatórias e fibroblastos. A marcação foi mais predominante no estroma do que no parênquima tumoral (FIGURA 5E).

No CAC, um número elevado de casos foi negativo (n=9) para IL-6 (ANEXO 3). Em um único caso houve marcação citoplasmática, e este era sub-tipo sólido. No estroma, observou-se intensa marcação (FIGURA 5F).

Quando comparados os tumores benignos (n=19) e malignos (n=34), foi observada uma baixa imunexpressão da IL-6 em quinze tumores benignos (78,9%), e em trinta e um tumores malignos (91,2%), sem diferença estatisticamente significativa (p=0,198, Teste Exato de Fisher), (TABELA 3).

5.7 IMUNOMARCAÇÃO DO TGF β 1

Em glândula salivar normal, houve marcação citoplasmática e nuclear das células ductais (FIGURA 6A).

No AP, o IM foi em 50% dos casos negativo (n=5) (ANEXO 3). Houve marcação ora citoplasmática, ora marcação nuclear de células mioepiteliais e ductais (FIGURA 6B e C). Os fibroblastos e células inflamatórias exibiam marcação.

No AB, a maioria dos casos foi de alta expressão (n=6). Observou-se marcação citoplasmática e nuclear das células ductais e células basalóides (FIGURA 6D) Alguns linfócitos apresentaram marcação.

No APBG, na maioria dos casos houve ausência de marcação (n=6). Quando presente, a marcação foi citoplasmática de células ductais e marcação nuclear das células tubulares e em áreas sólidas. As células de revestimento epitelial também apresentaram marcação nuclear (FIGURA 6E).

No CME, houve um predomínio de ausência de marcação (n=4) e baixa expressão (n=4) do TGF β 1 (ANEXO 3). A marcação foi predominantemente citoplasmática de células acinares, ductais e células escamosas. Por vezes, a marcação nuclear foi também observada nas células ductais, células epiteliais e nas células intermediárias das áreas sólidas (FIGURA 6F).

No CAC, o IM do TGF β 1 foi negativo em 50% dos casos (n=5) (ANEXO 3). A marcação foi observada em citoplasma e núcleo das células luminais e das estruturas cribriformes (FIGURA 6G).

Quando comparados os tumores benignos (n=19) e malignos (n=34), foi observada uma alta imunoexpressão do TGF β 1 em dez tumores benignos (52,6%), e baixa expressão em vinte e quatro tumores malignos (79,4%), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,094, Teste Qui-Quadrado), (TABELA 3).

Tabela 2. Relação da expressão da Calponina, Ki-67, SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 entre os tumores de glândula salivar. Salvador-Ba, 2016.

MARCADORES	EXPRESSÃO	AP (n/%)	AB (n/%)	APBG (n/%)	CME (n/%)	CAC (n/%)	p valor
CALPONINA	<50%	5(50%)	1(11,1%)	2(20%)	-	4(40%)	0,265
	≥50%	5(50%)	8(88,9%)	8(80%)	-	6(60%)	
Ki-67							
	BAIXA	7(70%)	7(77,8%)	9(90%)	8(57,1%)	8(80%)	0,483
	ALTA	3(30%)	2(22,2%)	1(10%)	6(42,9%)	2(20%)	
SMA	<50%	6(60%)	7(77,8%)	7(70%)	9(64,3%)	6(60%)	0,942
	≥50%	4(40%)	2(22,2%)	3(30%)	5(35,7%)	4(40%)	
PAR-2							
	BAIXA	4(40%)	3(33,3%)	0(0%)	4(28,6%)	3(30%)	0,247
	ALTA	6(60%)	6(66,7%)	10(100%)	10(71,4%)	7(70%)	
IL-6							
	BAIXA	6(60%)	9(100%)	9(90%)	13(92,9%)	9(90%)	0,111
	ALTA	4(40%)	0(0%)	1(10%)	1(7,1%)	1(10%)	
TGFβ1							
	BAIXA	6(60%)	3(33,3%)	7(70%)	8(57,1%)	9(90%)	0,140
	ALTA	4(40%)	6(66,7%)	3(30%)	6(42,9%)	1(10%)	

*Estatisticamente significante (p<0,05)

Teste Exato de Fisher

Tabela 3. Relação da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 entre os tumores benignos e malignos de glândula salivar. Salvador-Ba, 2016.

MARCADORES	EXPRESSÃO	TUMORES		p valor
		BENIGNOS	MALIGNOS	
CALPONINA	<50%	6(31,6%)	6(30%)	0,198
	≥50%	13(68,4%)	14(70%)	
Ki-67	BAIXA	14(73,7%)	25(73,5%)	0,990
	ALTA	5(26,3%)	9(26,5%)	
SMA	<50%	13(68,4%)	22(64,7%)	0,784
	≥50%	6(31,6%)	12(35,3%)	
PAR-2	BAIXA	7(20,6%)	7(20,6%)	0,198
	ALTA	12(63,2%)	27(79,4%)	
IL-6	BAIXA	15(78,9%)	31(91,2%)	0,234 ^a
	ALTA	4(21,1%)	3(8,8%)	
TGFβ1	BAIXA	9(47,4%)	24(70,6%)	0,094
	ALTA	10(52,6%)	10(29,4%)	

*Estatisticamente significante (p<0,05)

Teste Qui-Quadrado de Pearson;

^aTeste Exato de Fisher

Tabela 4. Densidade de mastócitos nas neoplasias de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016.

Tumores	Densidade Total	p valor	Densidade Intraparenquimal	p valor	Densidade Periparenquimal	p valor
	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	
Adenoma Pleomórfico	3,35(1,05-6,75)		0,25(0,00-1,50) ^a		2,60(0,00-6,35)	
Adenoma de Células Basais	2,20(1,15-2,95) ^a		0,00(0,00-0,50) ^a		1,80(1,15-2,65)	
Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau	5,50(2,32-8,20)	0,008	0,45(0,00-0,90) ^a	p<0,001	4,95(1,42-8,12)	0,207
Carcinoma Mucoepidermóide	7,10(5,55-11,00) ^b		2,60(1,90-5,25) ^b		3,70(1,50-7,90)	
Carcinoma Adenóide Cístico	4,40(2,75-6,77)		0,00(0,00-0,00) ^a		4,40(2,75-6,55)	

*Estatisticamente significante (p<0,05)

*Teste de Kruskal-Wallis

^{a,b} Letras distintas indicam diferenças significativas

Tabela 5. Densidade de mastócitos nos tumores benignos e malignos de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016.

Tumores	Densidade Total	p valor	Densidade Intraparenquimal	p valor	Densidade Periaparenquimal	p valor
	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	
Benignos	2,30(1,40-5,90)	0,060	0,00(0,00-1,40)	0,089	2,20(0,80-4,70)	0,025
Malignos	5,80(3,85-8,50)		0,60(0,00-2,30)		4,60(1,95-7,75)	

*Estatisticamente significante (p<0,05)

*Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 6. Correlação entre os mastócitos intraparenquimais e periparenquimais nas neoplasias de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016.

Mastócitos Intraparenquimais/Periparenquimais	Spearman r	p valor
Tumores Benignos	0,529	0,020
Tumores Malignos	-0,033	0,856

*Estatisticamente significante (p<0,05)

FIGURA 1. Imunomarcção de Mast cell.

(A) Adenoma Pleomórfico: Observar mastócitos de formatos variados presentes tanto no estroma como no parênquima tumoral. (B) Adenoma de Células Basais: Mastócitos fusiformes (seta) e ovulares (cabeça de seta) presentes no tecido estromal. (C) Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau: Notar a presença de mastócitos apenas no tecido estromal. (D) Carcinoma Mucoepidermóide: Observar mastócitos com diferentes formatos presentes no parênquima tumoral. (E) Carcinoma Adenóide Cístico: Observar mastócitos presentes apenas no tecido estromal.

FIGURA 2. Imunomarcção de SMA.

(A) Adenoma Pleomórfico: Observar miofibroblastos presentes na cápsula tecidual.

(B) Adenoma de Células Basais: Observar miofibroblastos presentes no tecido estromal

periparenquimal. (C) Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau: Observar miofibroblastos presentes no tecido estromal periparenquimal. (D) Carcinoma

Mucoepidermóide: Observar numerosos miofibroblastos imunomarcados no tecido estromal periparenquimal. (E) Carcinoma Adenóide Cístico: Notar miofibroblastos

imunomarcados no tecido estromal periparenquimal. (F) Notar numerosa quantidade de miofibroblastos no tecido estromal de um tumor sólido; comparar com a figura anterior.

FIGURA 3. Dupla Marcação.

Carcinoma Adenóide Cístico: Notar mastócitos com formatos variados, marcados de cor castanho escura (seta) e miofibroblastos em vermelho fúcsia (cabeça de seta) .

FIGURA 4. Imunomarcção do PAR-2.

(A) Glândula salivar normal. Imunomarcção presente especialmente nos ductos glandulares. (B) Adenoma Pleomórfico: Imunomarcção citoplasmática presente em células luminas das estruturas ductais. (C) Adenoma de Células Basais: Imunomarcção presente em células parenquimatosas e fibroblastos estromais. (D) Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau: Notar presença de imunomarcção e túbulos glandulares, fibroblastos estromais e células endoteliais. (E) Carcinoma Mucoepidermóide: Notar imunomarcção em células escamosas e fibroblastos estromais. (F) Carcinoma Adenóide Cístico: Observar imunomarcção em células componentes dos túbulos glandulares. (G) Observar imunomarcção especialmente em núcleos celulares de um tumor sólido.

FIGURA 5. Imunomarcção de IL-6.

(A) Glândula Salivar Normal: Observar imunomarcção no tecido estromal e em células mioepiteliais em torno dos ácinos mucosos. (B) Adenoma Pleomórfico: Imunomarcção citoplasmática e membranar de células ductais externas. (C) Observar imunomarcção membranar de células mioepiteliais, bem como fibroblastos e matriz extracelular. (D) Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau: Notar ausência de marcação nas células parenquimatosas e presença de marcação no tecido estromal. (E) Carcinoma Mucoepidermóide: Observar imunomarcção citoplasmática, especialmente, de células escamosas. Tecido estromal também foi imunomarcado. (F) Carcinoma Adenóide Cístico: Observar remanescente de matriz extracelular imunomarcado, bem como citoplasma de algumas células tumorais de um tumor sólido.

FIGURA 6. Imunomarcção do TGF β 1.

(A) Glândula Salivar Normal: Imunomarcção de células ductais presentes em ductos glandulares bem diferenciados. (B) Adenoma Pleomórfico: Nichos de células mioepiteliais imunomarcados (C) Notar núcleos celulares de estruturas ductais imunomarcadas. (D) Adenoma de células basais: Observar imunomarcção nuclear e citoplasmática em uma área mais sólida. (E) Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau: Observar núcleos celulares imunomarcados. (F) Carcinoma Mucoepidermóide: Parênquima tumoral com células imunomarcadas tanto no núcleo como no citoplasma. (G) Carcinoma Adenóide Cístico: Destaque para os lúmens imunomarcados (seta) no padrão cribriforme.

5.8 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PAR-2, IL-6, TGF β 1, SMA E MASTÓCITOS ENTRE OS DIFERENTES GRAUS HISTOLÓGICOS DO CME.

As diferenças encontradas entre a expressão PAR-2, TGF β 1, SMA e mastócitos nos diferentes graus histológicos do CME não foram estatisticamente significantes (TABELA 7).

Os tumores de baixo grau apresentaram IMs menores para SMA, IL-6 e TGF β 1, enquanto que para PAR-2, os IMs foram maiores. Em adição, densidade de mastócitos periparenquimais (6,70 células/mm²) foi mais elevada que a densidade de mastócitos intraparenquimais (3,75 células/mm²) (TABELA 7).

Os tumores de grau intermediário apresentaram IMs elevados para PAR-2 e TGF β 1. Por outro lado, para IL-6 e SMA, os IMs foram menores. Em relação aos mastócitos, a densidade periparenquimal (2,30 células/mm²) foi menor que a densidade intraparenquimal (2,55 células/mm²) (TABELA 7).

Os tumores de alto grau apresentaram menores IMs para TGF β 1. Já para SMA, PAR-2 e IL-6, os IMs, em metade dos casos, apresentaram alta expressão. Em relação aos mastócitos, a densidade de mastócitos periparenquimais (5,60 células/mm²) foi mais elevada que a densidade de mastócitos intraparenquimais (1,80 células/mm²) (TABELA 7).

Tabela 7. Distribuição da densidade de mastócitos e da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o grau histológico do Carcinoma Mucoepidermóide. Salvador-BA,2016.

Variáveis	SMA n(%)		p valor	PAR-2 n(%)		P valor	IL-6 n(%)		P valor	TGFβ1 n(%)		P valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²)	p valor
	<50%	≥50%		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	
Baixo (n=8)	6(75%)	2(25%)	0,450	2(25%)	6(75%)	1,000	8(100%)	-	0,143	5(62,5%)	3(37,5%)	0,450	3,75(1,85-5,62)	0,483	6,70(1,72-10,90)	0,380
Intermediário (n=4)	2(50%)	2(50%)		1(25%)	3(75%)		4(100%)	-		1(25%)	3(75%)		2,55(2,20-4,70)		2,30(1,40-3,50)	
Alto (n=2)	1(50%)	1(50%)		1(50%)	1(50%)		1(50%)	1(50%)		2(100%)	-		1,80(-)		5,60(-)	

*Estatisticamente Significante (p<0,005)

5.9 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO SMA, PAR-2, IL-6, TGF β 1, E MASTÓCITOS DE ACORDO COM O ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (Ki-67) E CONTEÚDO MIOEPITELIAL (CALPONINA) NOS TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES

5.9.1 ADENOMA PLEOMÓRFICO

Nos tumores com baixo índice de proliferação, os mastócitos apresentaram a densidade total de 4,10 células/mm². Já nos tumores com alto índice de proliferação a densidade total foi menor, equivalendo a 2,60 células/mm² (p=0,667, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 0,50 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação a densidade apresentou-se menor (p=0,667, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 2,60 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação, a densidade foi similar, 2,60 células/mm² (p=0,667, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 8).

Nos tumores com baixo índice de proliferação, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 71,4% dos casos (n=5). Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do SMA foi maior que 50% em 66,7% dos casos (n=2) (p=0,500, Teste Exato de Fisher), (TABELA 8).

O PAR-2 apresentou baixa expressão em 57,1% dos tumores (n=4) com baixo índice de proliferação. No entanto, nos tumores com alto índice de proliferação, em 100% dos casos (n=3), foi observada alta expressão do PAR-2 (p=0,200, Teste Exato de Fisher), (TABELA 8).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 71,4% dos tumores (n=5) com baixo índice de proliferação. No entanto, nos tumores com alto índice de proliferação, em 66,7% dos casos (n=2) foi observada alta expressão da IL-6 (p=0,500, Teste Exato de Fisher), (TABELA 8).

O TGFβ1 apresentou-se com baixa expressão em 71,4% dos tumores (n=5) com baixo índice de proliferação. Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do TGFβ1 foi alta em 66,7% (n=2) dos casos (p=0,500, Teste Exato de Fisher), (TABELA 8).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, os mastócitos apresentaram a densidade total de 2,60 células/mm². Já nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50% a densidade foi maior, equivalendo a 2,60 células/mm² (p=0,841, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50% observou-se que a mediana foi de 0,00 células/mm² e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50% a mediana foi de 0,50 células/mm² (p=0,841, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50% observou-se 2,60 células/mm² e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50%, a densidade foi similar, 2,60 células/mm² (p=0,841, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 8).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, o SMA apresentou-se em 60% dos casos (n=3) expressão menor que 50%. Já nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do SMA foi maior que 50% em 40% dos casos (n=2) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 7).

O PAR-2 apresentou baixa expressão em 60% dos tumores (n=3) com conteúdo mioepitelial menor que 50%. Já nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do PAR-2 foi alta em 80% dos casos (n=4) (p=0,524, Teste Exato de Fisher), (TABELA 8).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 80% dos tumores (n=4) com expressão de calponina menor que 50%. Já nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão da IL-6 foi alta em 60% dos casos (n=3) (p=0,524, Teste Exato de Fisher), (TABELA 8).

O TGF β 1 apresentou-se com baixa expressão em 71,4% dos tumores (n=5) com conteúdo mioepitelial menor que 50%. Já nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do TGF β 1 foi alta em 66,7% dos casos (n=2) (p=0,500, Teste Exato de Fisher), (TABELA 8).

Tabela 8. Distribuição da densidade de mastócitos e da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (calponina) nos Adenomas Pleomórficos.Salvador-BA,2016.

Marcador	SMA n(%)		p valor	PAR-2 n(%)		P valor	IL-6 n(%)		P valor	TGFβ1 n(%)		P valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
	<50%	≥50%		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta					
Índice Proliferativo (Ki-67)																
Baixo (n=7)	5(71,4%)	2(28,6%)	0,500	4(57,1%)	3(42,9%)	0,200	5(71,4%)	2(28,6%)	0,500	5(71,4%)	2(28,6%)	0,500	0,50 (0,00-1,45)	0,667	2,60(1,20-6,80)	0,667
Alto(n=3)	1(33,3%)	2(66,7%)		-	3(100%)		1(33,3%)	2(66,7%)		1(33,3%)	2(66,7%)		0,00 (0,00-0,75)		2,60(1,30-3,65)	
Conteúdo Mioepitelial (Calponina)																
<50%(n=5)	3(60%)	2(40%)	1,000	3(60%)	2(40%)	0,524	4(80%)	1(20%)	0,524	2(40%)	3(60%)	0,524	0,00 (0,00-1,50)	0,841	2,60(0,00-6,80)	0,841
≥50%(n=5)	3(60%)	2(40%)		1(20%)	4(80%)		2(40%)	3(60%)		4(80%)	1(20%)		0,50 (0,00-1,50)		2,60(1,40-5,90)	

*Estatisticamente Significante (p<0.005)

5.9. 2 ADENOMA DE CÉLULAS BASAIS

Nos tumores com baixo índice de proliferação, os mastócitos apresentaram a densidade total de 1,60 células/mm². Já nos tumores com alto índice de proliferação a densidade total foi menor, equivalendo a 2,25 células/mm² (p=0,500, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 0,00 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação a densidade foi 0,25 células/mm² (p=1,000, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 1,60 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação, a densidade foi 2,00 células/mm² (p=0,667, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 9).

Nos tumores com baixo índice de proliferação, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 71,4% dos casos (n=5). Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do SMA foi menor que 50% em 100% dos casos (n=2) (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA 9).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 71,4 % dos tumores (n=5) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, em 50% dos casos (n=1), foi observada alta expressão do PAR-2 (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA 9).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 100% dos tumores (n=7) com baixo índice de proliferação. Similarmente, nos tumores com alto índice de proliferação, em 100% dos casos (n=2) foi observada baixa expressão da IL-6 (TABELA 9).

O TGFβ1 apresentou-se com alta expressão em 57,1 % dos casos (n=4) com baixo índice de proliferação. Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do TGFβ1 foi alta em 100% (n=2) dos casos (p=0,500, Teste Exato de Fisher), (TABELA 9).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, os mastócitos apresentaram a densidade total de 1,50 células/mm². Já nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50% a densidade foi maior, equivalendo a 2,20 células/mm² (p=0,667, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50% não foram observados mastócitos na região intraparenquimal e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50% a mediana foi de 0,00 células/mm² (p=0,667, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50% não foram observados mastócitos na região periparenquimal e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50%, a densidade foi 2,00 células/mm² (p=0,667, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 9).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 100 % dos casos (n=1). Já nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do SMA foi menor que 50% em 75% dos casos (n=6) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 9).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 100% dos tumores (n=1) com expressão de calponina menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do PAR-2 foi alta em 62,5% dos casos (n=5) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 9).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 100% dos tumores (n=1) com conteúdo mioepitelial menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão da IL-6 foi alta em 100% dos casos (n=8) (TABELA 9).

O TGFβ1 apresentou-se com alta expressão em 100% dos casos dos tumores (n=1) com conteúdo mioepitelial menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do TGFβ1 foi alta em 62,5% dos casos (n=5) (p=0,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 9).

Tabela 9. Distribuição da densidade de mastócitos e da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (calponina) nos Adenomas de Células Basais.Salvador-BA,2016.

Marcador	SMA n(%)		p valor	PAR-2 n(%)		p valor	IL-6 n(%)		p valor	TGFβ1 n(%)		p valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²)	p valor
	<50%	≥50%		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	
Índice Proliferativo (Ki-67)																
Baixo(n=7)	5(71,4%)	2(28,6%)	1,000	2(28,6%)	5(71,4%)	1,000	7(100%)	-	-	3(42,9%)	4(57,1%)	0,500	0,00 (0,00-0,25)	1,000	1,60(1,15—2,65)	0,667
Alto(n=2)	2(100%)	-		1(50%)	1(50%)		2(100%)	-		-	2(100%)		0,25 (0,00-0,50)		2,00(1,30-2,20)	
Conteúdo Mioepitelial (Calponina)																
<50%(n=1)	3(60%)	2(40%)	1,000	-	1(100%)	1,000	1(100%)	-	-	-	1(100%)	1,000	-	0,667	-	0,667
≥50%(n=8)	3(60%)	2(40%)		3(37,5%)	5(62,5%)		8(100%)	-		3(37,5%)	5(62,5%)		0,00(0,00-0,50)		2,00(1,00-2,87)	

*Estatisticamente Significante (p<0,005)

5.9.3 ADENOCARCINOMA POLIMORFO DE BAIXO GRAU

Nos tumores com baixo índice de proliferação, os mastócitos apresentaram a densidade total de 5,20 células/mm². Já nos tumores com alto índice de proliferação a densidade total foi menor, equivalendo a 8,20 células/mm² (p=0,400, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 0,40 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação a densidade foi 0,90 células/mm² (p=0,400, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 4,60 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação, a densidade foi 7,30 células/mm² (p=0,800, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 10).

Nos tumores com baixo índice de proliferação, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 66,7% dos casos (n=6). Já no tumor com alto índice de proliferação (n=1), a expressão do SMA foi menor que 50% (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA 10).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 100 % dos tumores (n=9) com baixo índice de proliferação. No tumor com alto índice de proliferação (n=1) foi observada alta expressão do PAR-2 (TABELA 10).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 88,9% dos tumores (n=8) com baixo índice de proliferação. No tumor com alto índice de proliferação (n=1) foi observada baixa expressão da IL-6 (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA 10).

O TGFβ1 apresentou-se com alta expressão em 66,7 % dos casos (n=6) com baixo índice de proliferação. Já no tumor com alto índice de proliferação (n=1), a expressão do TGFβ1 foi baixa (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 10).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, os mastócitos apresentaram a densidade total de 7,50 células/mm². Já nos tumores com conteúdo

mioepitelial igual ou superior a 50% a densidade foi 5,40 células/mm² (p=0,400, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, a densidade foi 0,75 células/mm² e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50% a densidade foi de 0,35 células/mm² (p=0,267, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, a densidade foi 6,75 células/mm² e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50%, a densidade foi 4,95 células/mm² (p=0,400, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 10).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50%, em 50 % dos casos (n=1). Já nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do SMA foi menor que 50% em 75% dos casos (n=6) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 10).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 100% dos tumores (n=2) com expressão de calponina menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do PAR-2 foi alta em 100% dos casos (n=8) (TABELA 10).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 100% dos tumores (n=2) com conteúdo mioepitelial menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão da IL-6 foi baixa em 87,5% dos casos (n=7) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 10).

O TGFβ1 apresentou-se com alta expressão em 100% dos casos dos tumores (n=2) com conteúdo mioepitelial menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do TGFβ1 foi alta em 62,5% dos casos (n=5) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 10).

Tabela 10. Distribuição da densidade de mastócitos e da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (calponina) nos Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau.Salvador-BA,2016.

Marcador	SMA		p valor	PAR-2		p valor	IL-6		p valor	TGFβ1 n(%)		p valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²)	p valor
	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)		n(%)	n(%)		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)					
Expressão	<50%	≥50%		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta					
Índice Proliferativo (Ki-67)																
Baixo(n=9)	6(66,7%)	3(33,3%)	1,000	-	9(100%)	-	8(88,9%)	1(11,1%)	1,000	6(66,7%)	3(33,3%)	1,000	0,40 (0,00-0,75)	0,400	4,60(0,95—8,15)	0,800
Alto(n=1)	1(100%)	-	-	-	1(100%)	-	1(100%)	-	-	1(100%)	-	-	0,90 (-)	-	7,30 (-)	-
Conteúdo Mioepitelial (Calponina)																
<50%(n=2)	1(50%)	1(50%)	1,000	-	2(100%)	-	2(100%)	-	1,000	2(100%)	-	1,000	0,75(0,60-0,90)	0,267	6,75(4,60-8,90)	0,400
≥50%(n=8)	6(75%)	2(25%)	-	-	8(100%)	-	7(87,5%)	1(12,5%)	-	7(87,5%)	1(12,5%)	-	0,35(0,00-0,70)	-	4,95(0,95-7,70)	-

*Estatisticamente Significante (p<0,005)

5.9.4 CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

Nos tumores com baixo índice de proliferação, os mastócitos apresentaram a densidade total de 7,10 células/mm². Já nos tumores com alto índice de proliferação a densidade total foi maior, equivalendo a 7,60 células/mm² (p=0,731, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 2,50 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação a densidade foi 2,85 células/mm² (p=0,945, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 2,90 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação, a densidade foi 4,75 células/mm² (p=0,445, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 11).

Nos tumores com baixo índice de proliferação, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 37,5% dos casos (n=3). Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do SMA foi menor que 50% em 100% dos casos (n=6) (p=0,031, Teste Exato de Fisher), (TABELA 11).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 50 % dos tumores (n=5) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, em 100% dos casos (n=6), foi observada alta expressão do PAR-2 (p=0,085, Teste Exato de Fisher) (TABELA 11).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 87,5% dos tumores (n=7) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, em 100% dos casos (n=6) foi observada baixa expressão da IL-6 (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA 11).

O TGFβ1 apresentou-se com alta expressão em 62,5 % dos casos (n=5) com baixo índice de proliferação. Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do TGFβ1 foi baixa em 50% (n=3) dos casos (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 11).

Tabela 11. Distribuição da densidade de mastócitos e da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) no Carcinoma Mucoepidermóide.Salvador-BA,2016.

Marcador	SMA n(%)		p valor	PAR-2 n(%)		p valor	IL-6 n(%)		p valor	TGFβ1 n(%)		p valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²)	p valor
	<50%	≥50%		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	
Expressão																
Índice Proliferativo (Ki-67)																
Baixo (n=8)	3(37,5%)	5(62,5%)	0,031	4(50%)	4(50%)	0,085	7(87,5%)	1(12,5%)	1,000	5(62,5%)	3(37,5%)	1,000	2,50(1,80-5,40)	0,945	2,90(1,301-7,60)	0,445
Alto(n=6)	6(100%)	-		-	6(100%)		6(100%)	-		3(50%)	3(50%)		2,85 (1,55-4,75)		4,75(2,97-9,25)	

*Estatisticamente Significante (p<0,

5.9.5 CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO

Nos tumores com baixo índice de proliferação, os mastócitos apresentaram a densidade total de 3,65 células/mm². Já nos tumores com alto índice de proliferação a densidade total foi maior, equivalendo a 6,85 células/mm² (p=0,400, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com baixo índice de proliferação não foi observado mastócitos nesta região e nos tumores com alto índice de proliferação a densidade foi 0,45 células/mm². Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 3,65 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação, a densidade foi 6,40 células/mm² (p=0,400, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 12).

Nos tumores com baixo índice de proliferação, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 62,5% dos casos (n=5). Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do SMA foi menor que 50% em 50% dos casos (n=1) (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA 12).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 62,5 % dos tumores (n=5) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, em 100% dos casos (n=2), foi observada alta expressão do PAR-2 (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA12).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 87,5% dos tumores (n=) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, em 100% dos casos (n=2) foi observada baixa expressão da IL-6 (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA 12).

O TGFβ1 apresentou-se com alta expressão em 100 % dos casos (n=8) com baixo índice de proliferação. Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do TGFβ1 foi baixa em 50% (n=1) dos casos (p=0,200, Teste Exato de Fisher), (TABELA 12).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, os mastócitos apresentaram a densidade total de 6,90 células/mm². Já nos tumores com conteúdo

mioepitelial igual ou superior a 50% a densidade foi 3,45 células/mm² (p=0,114, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, a mediana foi 0,00 células/mm² e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50% não foi observados mastócitos nessa região. Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, a densidade foi 6,45 células/mm² e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50%, a densidade foi 3,45 células/mm² (p=0,114, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 12).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 75 % dos casos (n=3). Já nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do SMA foi menor que 50% em 50% dos casos (n=3) (p=0,571, Teste Exato de Fisher), (TABELA 18).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 50% dos tumores (n=2) com expressão de calponina menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do PAR-2 foi alta em 83,3% dos casos (n=5) (TABELA 12).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 100% dos tumores (n=4) com conteúdo mioepitelial menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão da IL-6 foi baixa em 83,3% dos casos (n=5) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 12).

O TGFβ1 apresentou-se com alta expressão em 100% dos casos dos tumores (n=4) com conteúdo mioepitelial menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do TGFβ1 foi baixa em 83,3% dos casos (n=5) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 12).

Tabela 12. Distribuição da densidade de mastócitos e da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (calponina) nos Carcinomas Adenóides Císticos.Salvador-BA,2016.

Marcador	SMA		p valor	PAR-2		P valor	IL-6		P valor	TGFβ1 n(%)		P valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
	<50% n(%)	≥50%		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta					
Índice Proliferativo (Ki-67)																
Baixo (n=8)	5(62,5%)	3(37,5%)	1,000	3(37,5%)	5(62,5%)	1,000	7(87,5%)	1(12,5%)	1,000	8(100%)	-	0,200	-	-	3,65(2,50-5,55)	0,400
Alto(n=2)	1(50%)	1(50%)	-	-	2(100%)	-	2(100%)	-	-	1(50%)	1(50%)	-	0,45 (0,00-0,90)	-	6,40(4,90-7,90)	-
Conteúdo Mioepitelial (Calponina)																
<50%(n=4)	3(75%)	1(25%)	0,571	2(50%)	2(50%)	0,500	4(100%)	-	1,000	4(100%)	-	1,000	0,00 (0,00-0,67)	-	6,45(3,80-11,35)	0,114
≥50%(n=6)	3(50%)	3(50%)	-	1(16,7%)	5(83,3%)	-	5(83,3%)	1(16,7%)	-	5(83,3%)	1(16,7%)	-	-	-	3,45(1,50-5,20)	-

*Estatisticamente Significante (p<0,005)

5.10 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO SMA, PAR-2, IL-6, TGFβ1, E MASTÓCITOS DE ACORDO COM O ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (Ki-67) E CONTEÚDO MIOEPITELIAL (CALPONINA) ENTRE OS TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS DE GLÂNDULAS SALIVARES

5.10.1 TUMORES BENIGNOS

Nos tumores com baixo índice de proliferação, os mastócitos apresentaram a densidade total de 2,30 células/mm². Nos tumores com alto índice de proliferação a densidade total foi similar a 2,30 células/mm² (p=0,893, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com baixo índice de proliferação a mediana foi de 0,00 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação a mediana foi 0,45 células/mm² (p=0,823, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 2,30 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação, a densidade foi 2,20 células/mm² (p=0,823, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 13).

Nos tumores com baixo índice de proliferação, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 71,4% dos casos (n=10). Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do SMA foi menor que 50% em 60% dos casos (n=3) (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA 13).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 57,1 % dos tumores (n=8) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, em 80% dos casos (n=4), foi observada alta expressão do PAR-2 (p=1,603, Teste Exato de Fisher), (TABELA 13).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 87,5% dos tumores (n=12) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, em 60% dos casos (n=2) foi observada baixa expressão da IL-6 (p=0,272, Teste Exato de Fisher), (TABELA 13).

O TGFβ1 apresentou-se com baixa expressão em 57,1 % dos casos (n=8) com baixo índice de proliferação. Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do TGFβ1 foi alta em 80% (n=4) dos casos (p=0,303, Teste Exato de Fisher), (TABELA 13).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, os mastócitos apresentaram a densidade total de 2,05 células/mm². Já nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50% a densidade foi 2,30 células/mm² (p=0,898, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, a mediana foi 0,00 células/mm², similarmemente aos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50% (p=0,831, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, a densidade foi 2,05 células/mm² e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50%, a densidade foi 2,20 células/mm² (p=0,898, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 13).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 66,7% dos casos (n=4). Já nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do SMA foi menor que 50% em 69,2% dos casos (n=9) (p=0,571, Teste Exato de Fisher), (TABELA 13).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 50% dos tumores (n=3) com conteúdo mioepitelial menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do PAR-2 foi alta em 69,2% dos casos (n=9) das células mioepiteliais (p=0,617, Teste Exato de Fisher), (TABELA 13).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 83,3% dos tumores (n=5) com conteúdo mioepitelial calponina menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão da IL-6 foi baixa em 76,9% dos casos (n=10) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 13).

O TGFβ1 apresentou-se com alta expressão em 66,7% dos casos dos tumores (n=4) com expressão de calponina menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do TGFβ1 foi baixa em 53,8% dos casos (n=7) (p=0,628, Teste Exato de Fisher), (TABELA 13).

5.10.2 TUMORES MALIGNOS

Nos tumores com baixo índice de proliferação, os mastócitos apresentaram a densidade total de 5,10 células/mm². Nos tumores com alto índice de proliferação a densidade total foi similar de 8,20 células/mm² (p=0,490, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com baixo índice de proliferação a densidade foi de 0,35 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação a densidade foi 2,00 células/mm² (p=0,720, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com baixo índice de proliferação observou-se 4,25 células/mm² e nos tumores com alto índice de proliferação, a densidade foi 5,80 células/mm² (p=0,254, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 14).

Nos tumores com baixo índice de proliferação, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 56% dos casos (n=14). Já nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do SMA foi menor que 50% em 88,9% dos casos (n=8) (p=0,113, Teste Exato de Fisher), (TABELA 14).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 72% dos tumores (n=18) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, em 100% dos casos (n=9), foi observada alta expressão do PAR-2 (p=0,151, Teste Exato de Fisher), (TABELA 14).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 88% dos tumores (n=22) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, em 100% dos casos (n=9) foi observada baixa expressão da IL-6 (p=0,549, Teste Exato de Fisher), (TABELA 14).

O TGFβ1 apresentou-se com baixa expressão em 76 % dos casos (n=19) com baixo índice de proliferação. Nos tumores com alto índice de proliferação, a expressão do TGFβ1 foi baixa em 55,6% (n=5) dos casos (p=0,395, Teste Exato de Fisher), (TABELA 14).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, os mastócitos apresentaram a densidade total de 7,00 células/mm². Já nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50% a densidade foi 4,40 células/mm² com tendência a diferença significativa (p=0,051, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal dos mastócitos, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, a densidade foi 0,30 células/mm² e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50%, a mediana foi 0,00 células/mm² (p=0,494, Teste de Mann-Whitney). Quanto à densidade periparenquimal, nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, a densidade foi 6,45 células/mm² e nos tumores com conteúdo mioepitelial igual ou superior a 50%, a densidade foi 4,25 células/mm² (p=0,091, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 14).

Nos tumores com conteúdo mioepitelial menor que 50%, o SMA apresentou-se com expressão menor que 50% em 66,7% dos casos (n=4). Já nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do SMA foi menor que 50% em 64,3% dos casos (n=9) (p=1,00, Teste Exato de Fisher), (TABELA 14).

O PAR-2 apresentou alta expressão em 66,7% dos tumores (n=4) com expressão de calponina menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a

50%, a expressão do PAR-2 foi alta em 92,9% dos casos (n=13) das células mioepiteliais (p=0,202, Teste Exato de Fisher), (TABELA 14).

A IL-6 exibiu baixa expressão em 100% dos tumores (n=6) com expressão de calponina menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão da IL-6 foi baixa em 87,5% dos casos (n=12) (p=1,000, Teste Exato de Fisher), (TABELA 14).

O TGF β 1 apresentou-se com baixa expressão em 100% dos casos dos tumores (n=6) com expressão de calponina menor que 50%. Nos tumores com conteúdo mioepitelial maior ou igual a 50%, a expressão do TGF β 1 foi baixa em 71,4% dos casos (n=10) (p=0,267, Teste Exato de Fisher), (TABELA 14).

Tabela 13. Distribuição da densidade de mastócitos e da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (calponina) nos Tumores Benignos.Salvador-BA,2016.

Marcador	SMA		p valor	PAR-2		P valor	IL-6		P valor	TGFβ1 n(%)		P valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
	<50% n(%)	≥50%		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta					
Índice Proliferativo (Ki-67)																
Baixo (n=14)	10(71,4)	4(28,6%)	1,000	6(42,9%)	8(57,1%)	0,603	12(85,7)	2(14,3%)	0,272	8(57,1%)	6(42,9%)	0,303	0,00(0,00-1,42)	0,823	2,30(0,60-5,90)	0,823
Alto(n=5)	3(60%)	2(40%)		1(20%)	4(80%)		3(60%)	2(40%)		1(20%)	4(80%)					
Conteúdo Mioepitelial (Calponina)																
<50%(n=6)	4(66,7%)	2(33,3%)	0,571	3(50%)	3(50%)	0,500	5(83,3%)	1(16,7%)	1,000	2(33,3%)	4(66,7%)	0,628	0,00 (0,00-1,45)	0,831	2,05(0,00-6,35)	0,898
≥50%(n=13)	9(69,2%)	4(30,8%)		4(30,8%)	9(69,2%)		10(76,9)	3(23,1%)		7(53,8%)	6(46,2%)					

*Estatisticamente Significante (p<0,005)

Tabela 14. Distribuição da densidade de mastócitos e da expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGFβ1 de acordo com o índice de proliferação (Ki-67) e conteúdo mioepitelial (calponina) nos Tumores Malignos.Salvador-BA,2016.

Marcador	SMA		p valor	PAR-2		P valor	IL-6		P valor	TGFβ1 n(%)		P valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²)	p valor
	n(%)	≥50%		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	
Índice Proliferativo (Ki-67)																
Baixo (n=25)	14(56%)	11(44%)	0,113	7(28%)	18(72%)	0,151	22(88%)	3(12%)	0,549	19(76%)	6(24%)	0,395	0,35(0,00-1,80)	0,720	4,25(1,75-7,22)	0,254
Alto(n=9)	8(88,9%)	1(11,1%)	-	-	9(100%)	-	9(100%)	-	-	5(55,6%)	4(44,4%)	-	2,00(0,55-3,75)	-	5,80(3,65-8,05)	-
Conteúdo Mioepitelial (Calponina)																
<50%(n=6)	4(66,7%)	2(33,3%)	1,000	2(33,3%)	4(66,7%)	0,202	6(100%)	-	1,000	6(100%)	-	0,267	0,30 (0,00-0,42)	0,494	6,45(4,30-9,80)	0,091
≥50%(n=14)	9(64,3%)	5(35,7%)	-	1(7,1%)	13(92,9)	-	12(85,7)	2(14,3%)	-	10(71,4)	4(28,6%)	-	0,00(0,00-0,42)	-	4,25(1,42-6,40)	-

*Estatisticamente Significante (p<0,005)

5.11 COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO PAR-2, IL-6, TGFβ1, SMA E A DENSIDADE DE MASTÓCITOS NOS TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES

5.11.1 ADENOMA PLEOMÓRFICO

Nos tumores com baixa expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 3,65 células/mm², e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 3,35 células/mm² (p=0,762, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal de mastócitos, nos tumores com baixa expressão de PAR-2 a densidade foi 0,25 células/mm² e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade foi 0,75 células/mm² (p=0,610, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 2,95 células/mm² nos tumores com baixa expressão do PAR-2 e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade de mastócitos foi 2,60 células/mm² (p=0,610, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 15).

Nos tumores com baixa expressão da IL-6, a densidade total de mastócitos foi 2,50 células/mm², e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 5,15 células/mm² (p=0,476, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal de mastócitos, nos tumores com baixa expressão de IL-6 a mediana foi 0,00 células/mm² e nos tumores com alta expressão do IL-6, a densidade foi 1,50 células/mm² (p=0,114, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 2,50 células/mm² nos tumores com baixa expressão do IL-6 e nos tumores com alta expressão do IL-6, a densidade de mastócitos foi 3,65 células/mm² (p=0,762, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 15).

Nos tumores com baixa expressão da TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 5,00 células/mm², e nos tumores com alta expressão do TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 2,00 células/mm² (p=0,610, Teste de Mann-Whitney). Em relação à

densidade intraparenquimal de mastócitos, nos tumores com baixa expressão de TGFβ1 a mediana foi 0,25 células/mm² e nos tumores com alta expressão do TGFβ1, a densidade foi 0,70 células/mm² (p=1,000, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 3,65 células/mm² nos tumores com baixa expressão do TGFβ1 e nos tumores com alta expressão do IL-6, a densidade de mastócitos foi 1,30 células/mm²(p=0,476, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 15).

Nos tumores com baixa expressão de SMA, a densidade total de mastócitos foi 2,50 células/mm², e nos tumores com alta expressão do SMA, a densidade total de mastócitos foi 6,05 células/mm² (p=0,352, Teste de Mann-Whitney). A densidade intraparenquimal de mastócitos teve como mediana 0,25 células/mm² e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade foi 0,75 células/mm² (p=0,610, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 2,50 células/mm² nos tumores com baixa expressão de SMA e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade de mastócitos 5,30 células/mm²(p=0,476, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 15).

Tabela 15. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1, SMA e a densidade de mastócitos nos Adenomas Pleomórficos. Salvador-BA, 2016.

Marcadores	Densidade de Mastócitos Total (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
PAR-2						
Baixa	3,65(0,35-7,77)	0,762	0,25 (0,00-1,17)	0,610	2,95(0,00-0,74)	1,000
Alta	3,35(1,80-6,97)		0,75 (0,00-1,52)		2,60(1,80-5,45)	
IL-6						
Baixa	2,50(1,05-6,52)	0,476	0,00 (0,00-0,72)	0,114	2,50(0,00-6,40)	0,762
Alta	5,15(1,02-8,52)		1,50 (0,37-1,57)		3,65(0,65-6,95)	
TGFβ1						
Baixa	5,00(1,80-6,75)	0,610	0,25(0,00-1,50)	1,000	3,65(1,80-6,40)	0,476
Alta	2,00(0,35-7,62)		0,70(0,00-1,55)		1,30(0,00-6,42)	
SMA						
Baixa	2,50(1,05-5,17)	0,352	0,25(0,00-1,42)	0,610	2,50(0,00-3,92)	0,476
Alta	6,05(1,47-8,52)		0,75(0,00-1,57)		5,30(1,17-7,25)	

*Estatisticamente significante (p<0,05)

5.11.2 ADENOMA DE CÉLULAS BASAIS

Nos tumores com baixa expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 2,30 células/mm², e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 1,55 células/mm² (p=0,167, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal de mastócitos, nos tumores com baixa expressão de PAR-2 a densidade foi 0,50 células/mm² e nos tumores com alta expressão do PAR-2, não foi observado mastócitos nesta região. A densidade de mastócitos periparenquimais foi 2,20 células/mm² nos tumores com baixa expressão do PAR-2 e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade de mastócitos foi 1,55 células/mm² (p=0,262, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 16).

Nos ABs todos os tumores apresentaram baixa expressão de IL-6, sendo a densidade total de mastócitos 2,20 células/mm², a densidade intraparenquimal teve como mediana 0,00 células/mm² e a densidade de mastócitos periparenquimais foi 1,80 células/mm² (TABELA 16).

Nos tumores com baixa expressão da TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 0,80 células/mm², e nos tumores com alta expressão do TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 2,25 células/mm² (p=0,095, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal de mastócitos, nos tumores com baixa expressão de TGFβ1 não foi observado mastócitos e nos tumores com alta expressão do TGFβ1, a densidade foi 0,25 células/mm² (p=0,262, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 0,80 células/mm² nos tumores com baixa expressão do TGFβ1 e nos tumores com alta expressão do IL-6, a densidade de mastócitos foi 2,00 células/mm² (p=0,167, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 16).

Nos tumores com baixa expressão de SMA, a densidade total de mastócitos foi 1,60 células/mm², e nos tumores com alta expressão do SMA, a densidade total de mastócitos foi 2,90 células/mm² (p=0,333, Teste de Mann-Whitney). Nos tumores com baixa expressão de SMA, a densidade intraparenquimal de mastócitos teve como mediana 0,00 células/mm² e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade foi 0,25 células/mm² (p=1,000, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 1,60 células/mm² nos tumores com baixa expressão de SMA e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade de mastócitos 2,65 células/mm² (p=0,222, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 16).

Tabela 16. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1, SMA e a densidade de mastócitos nos Adenomas de Células Basais.Salvador-BA,2016.

Marcadores	Densidade de Mastócitos Totais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
PAR-2						
Baixa	2,30(2,25-2,95)	0,167	0,50 (0,25-0,50)	-	2,20(2,00-2,65)	0,262
Alta	1,55(0,80-2,20)		-		1,55(0,80-2,20)	
IL-6						
Baixa	2,20(1,15-2,95)	-	0,00(0,00-0,50)	-	1,80(1,15-2,65)	-
Alta	-		-		-	
TGFβ1						
Baixa	0,80(0,40-1,50)	0,095	-	-	0,80(0,40-1,50)	0,167
Alta	2,25(1,60-3,60)		0,25(0,00-0,50)		2,00(1,60-3,10)	
SMA						
Baixa	1,60(1,65-5,50)	0,333	0,00(0,00-0,25)	1,000	1,60(1,15-2,00)	0,222
Alta	2,90 (2,20-3,60)		0,25(0,00-0,50)		2,65(2,20-3,10)	

*Estatisticamente significante (p<0,05)

5.11.3 ADENOCARCINOMA POLIMORFO DE BAIXO GRAU

No APGB, todos os tumores apresentaram alta expressão do PAR-2, sendo a densidade total de mastócitos 5,50 células/mm², a densidade intraparenquimal de

mastócitos 0,45 células/mm² e a densidade periparenquimal 4,95 células/mm² (TABELA 17).

Nos tumores com baixa expressão da IL-6, a densidade total de mastócitos foi de 5,80 células/mm², a densidade intraparenquimal de mastócitos foi de 0,45 células/mm² e a densidade periparenquimal foi de 4,95 células/mm² e no único tumor com alta expressão do PAR-2 não foram observados mastócitos (TABELA 17).

Nos tumores com baixa expressão da TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 8,10 células/mm², e nos tumores com alta expressão do TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 0,30 células/mm² (p=0,117, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal de mastócitos, nos tumores com baixa expressão de TGFβ1 a mediana foi 0,60 células/mm² e nos tumores com alta expressão do TGFβ1, a densidade foi 0,30 células/mm² (p=0,383, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 7,30 células/mm² nos tumores com baixa expressão do TGFβ1 e nos tumores com alta expressão do IL-6, a mediana foi de 0,00 células/mm² (p=0,117, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 17).

Nos tumores com baixa expressão de SMA, a densidade total de mastócitos foi 5,00 células/mm², e nos tumores com alta expressão do SMA, a densidade total de mastócitos foi 8,20 células/mm² (p=0,333, Teste de Mann-Whitney). Nos tumores com baixa expressão de SMA, a densidade intraparenquimal de mastócitos teve como mediana 0,50 células/mm² e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade teve como mediana 0,00 células/mm² (p=0,383, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 4,60 células/mm² nos tumores com baixa expressão de SMA e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade de mastócitos 8,20 células/mm² (p=0,017, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 17).

Tabela 17. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1, SMA e a densidade de mastócitos no Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau.Salvador-BA,2016.

Marcadores	Densidade de Mastócitos Totais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
PAR-2						
Baixa	-	-	-	-	-	0,262
Alta	5,50(2,32-8,20)	-	0,45(0,00-0,90)	-	4,95(1,42-8,12)	-
IL-6						
Baixa	5,80(4,00-8,21)	-	0,50(0,15-0,91)	-	5,30(3,25-8,15)	-
Alta	-	-	-	-	-	-
TGFβ1						
Baixa	8,10(5,10-8,20)	0,117	0,60(0,20-0,90)	0,383	7,30(4,60-8,15)	0,117
Alta	0,30(0,15-3,05)	-	0,30(0,15-0,40)	-	0,00(0,00-2,65)	-
SMA						
Baixa	5,00(1,65-5,50)	0,333	0,50(0,35-0,75)	0,383	4,60(0,95-4,95)	0,017
Alta	8,20(8,15-9,00)	-	0,00(0,00-0,45)	-	8,20(8,15-8,55)	-

*Estatisticamente significante (p<0,05)

5.11.4 CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

Nos tumores com baixa expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 7,25 células/mm², e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 6,30 células/mm² (p=0,503, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal de mastócitos, nos tumores com baixa expressão de PAR-2 a densidade foi 5,25 células/mm² e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade foi 2,50 células/mm² (p=0,199, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 3,65 células/mm² nos tumores com baixa expressão do PAR-2 e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade de mastócitos foi 3,70 células/mm²(p=0,710, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 18).

Nos tumores com baixa expressão da IL-6, a densidade total de mastócitos foi 6,70 células/mm², e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 7,40 células/mm² (p=1,000, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal de mastócitos, nos tumores com baixa expressão de IL-6 a

densidade foi 2,85 células/mm² e nos tumores com alta expressão do IL-6, a densidade foi 1,80 células/mm² (p=0,114, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 3,65 células/mm² nos tumores com baixa expressão do IL-6 e nos tumores com alta expressão do IL-6, a densidade de mastócitos foi 5,60 células/mm²(p=1,000, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 18).

Nos tumores com baixa expressão da TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 6,20 células/mm², e nos tumores com alta expressão do TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 9,85 células/mm² (p=0,295, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal de mastócitos, nos tumores com baixa expressão de TGFβ1 a mediana foi 2,10 células/mm² e nos tumores com alta expressão do TGFβ1, a densidade foi 4,00 células/mm² (p=0,295, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 3,60 células/mm² nos tumores com baixa expressão do TGFβ1 e nos tumores com alta expressão do IL-6, a densidade de mastócitos foi 5,95 células/mm²(p=0,295, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 18).

Nos tumores com baixa expressão de SMA, a densidade total de mastócitos foi 7,40 células/mm², e nos tumores com alta expressão do SMA, a densidade total de mastócitos foi 6,65 células/mm² (p=0,825, Teste de Mann-Whitney). Nos tumores com baixa expressão de SMA, a densidade intraparenquimal de mastócitos foi 2,10 células/mm² e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade foi 5,25 células/mm² (p=0,076, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 5,60 células/mm² nos tumores com baixa expressão de SMA e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade de mastócitos 1,50 células/mm²(p=0,260, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 18).

Tabela 18. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6 e TGFβ1 e a densidade de mastócitos no Carcinoma Mucoepidermóide.Salvador-BA,2016.

Marcadores	Densidade de Mastócitos Totais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
PAR-2						
Baixa	7,25(6,42-19,02)	0,503	5,25(2,62-9,67)	0,199	3,65(1,25-10,25)	0,710
Alta	6,30(5,25-11,00)		2,50(1,90-3,75)		3,70(2,10-7,90)	
IL-6						
Baixa	6,70(5,52-11,80)	1,000	2,85(2,02-5,32)	0,308	3,65(1,40-8,05)	1,000
Alta	7,40(7,40-7,40)		1,80(1,80-1,80)		5,60(5,60-5,60)	
TGFβ1						
Baixa	6,20(5,50-8,90)	0,295	2,10(1,80-4,40)	0,295	3,60(1,10-5,80)	0,295
Alta	9,85(5,67-16,22)		4,00(1,92-7,12)		5,95(1,60-11,95)	
SMA						
Baixa	7,40(5,55-11,00)	0,825	2,10(1,80-3,75)	0,076	5,60(3,25-7,90)	0,260
Alta	6,65(4,40-18,95)		5,25(3,15-9,67)		1,50(1,15-9,27)	

*Estatisticamente significativa (p<0,05)

5.11.5 CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO

Nos tumores com baixa expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 3,40 células/mm², e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 4,90 células/mm² (p=0,517, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal, não foram observados mastócitos nessa região. A densidade de mastócitos periparenquimais foi 3,40 células/mm² nos tumores com baixa expressão do PAR-2 e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade de mastócitos foi 4,90 células/mm²(p=0,517, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 19).

Nos tumores com baixa expressão da IL-6, a densidade total de mastócitos foi 4,90 células/mm², e nos tumores com alta expressão do PAR-2, a densidade total de mastócitos foi 3,00 células/mm² (p=0,600, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal, não foram observados mastócitos nesta região. A densidade de mastócitos periparenquimais foi 4,90 células/mm² nos tumores com baixa

expressão do IL-6 e nos tumores com alta expressão do IL-6, a densidade de mastócitos foi 3,00 células/mm² (p=0,600, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 19).

Nos tumores com baixa expressão da TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 3,90 células/mm², e nos tumores com alta expressão do TGFβ1, a densidade total de mastócitos foi 4,90 células/mm² (p=1,000, Teste de Mann-Whitney). Em relação à densidade intraparenquimal, não foram observados mastócitos nessa região. A densidade de mastócitos periparenquimais foi 3,90 células/mm² nos tumores com baixa expressão do TGFβ1 e nos tumores com alta expressão do IL-6, a densidade de mastócitos foi 4,90 células/mm² (p=1,000, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 19).

Nos tumores com baixa expressão de SMA, a densidade total de mastócitos foi 4,75 células/mm², e nos tumores com alta expressão do SMA, a densidade total de mastócitos foi 4,40 células/mm² (p=0,352, Teste de Mann-Whitney). Nos tumores com baixa expressão de SMA, a densidade intraparenquimal de mastócitos teve como mediana 0,00 células/mm² e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade foi 0,90 células/mm² (p=0,610, Teste de Mann-Whitney). A densidade de mastócitos periparenquimais foi 4,75 células/mm² nos tumores com baixa expressão de SMA e nos tumores com alta expressão de SMA, a densidade de mastócitos 4,40 células/mm² (p=0,610, Teste de Mann-Whitney), (TABELA 19).

Tabela 19. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1,SMA e a densidade de mastócitos no Carcinoma Adenóide Cístico.Salvador-BA,2016.

Marcadores	Densidade de Mastócitos Totais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
PAR-2						
Baixa	3,40(2,70-4,20)	0,517	0,00(0,00-0,00)	-	3,40(2,70-4,20)	0,517
Alta	4,90(3,45-7,45)		-		4,90(3,45-7,00)	
IL-6						
Baixa	4,90(2,70-7,45)	0,600	0,00(0,00-0,00)	-	4,90(2,70-7,00)	0,600
Alta	3,00(3,00-3,00)		-		3,00(-)	
TGFβ1						
Baixa	3,90(2,50-7,45)	1,000	0,00(0,00-0,00)	-	3,90(2,50-7,00)	1,000
Alta	4,90(4,90-4,90)		-		4,90(-)	
SMA						
Baixa	4,75(2,75-9,72)	0,610	0,00(0,00-0,22)	0,762	4,75(2,75-9,05)	0,610
Alta	4,40(0,97-4,97)		0,90(0,90-0,90)		4,40(0,97-4,97)	

*Estatisticamente significativa (p<0,05)

Os tumores foram ainda agrupados em tumores benignos e malignos, mas não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a densidade de mastócitos e a expressão do PAR-2, IL-6,TGFβ1 e SMA nos dois grupos (TABELA 20 e 21).

Tabela 20. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1,SMA e a densidade de mastócitos nos Tumores Benignos de glândula salivar.Salvador-BA,2016.

Marcadores	Densidade de Mastócitos Totais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
PAR-2						
Baixa	2,30(1,40-5,90)	0,967	0,50(0,00-0,50)	0,902	2,20(0,00-5,90)	0,902
Alta	2,30(0,97-5,67)		0,00(0,00-1,50)		2,30(0,97-4,17)	
IL-6						
Baixa	2,20(1,40-3,60)	0,357	0,00(0,00-0,50)	0,100	2,20(0,80-3,10)	0,469
Alta	5,15(1,02-8,52)		1,50(0,37-1,57)		3,65(0,65-6,95)	
TGFβ1						
Baixa	2,40(0,40-6,05)	1,000	0,00(0,00-1,00)	0,549	2,40(0,40-5,30)	0,780
Alta	2,25(1,47-5,02)		0,25(0,00-1,45)		2,00(1,12-3,80)	
SMA						
Baixa	2,20(1,10-3,35)	0,282	0,00(0,00-0,95)	0,639	1,80(0,40-2,60)	0,179
Alta	4,75(1,65-6,97)		0,25(0,00-1,52)		3,90(1,65-6,35)	

*Estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 21. Comparação entre a expressão de PAR-2, IL-6, TGFβ1, SMA e a densidade de mastócitos nos Tumores Malignos de glândula salivar.Salvador-BA,2016.

Marcadores	Densidade de Mastócitos Totais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Intraparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor	Densidade de Mastócitos Periparenquimais (células/mm ²) Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p valor
PAR-2						
Baixa	6,20(3,40-7,40)	1,000	1,80(0,00-5,40)	0,476	3,40(1,70-5,60)	0,503
Alta	5,70(3,86-8,82)		0,55(0,00-2,02)		4,75(2,65-7,95)	
IL-6						
Baixa	5,95(4,90-8,80)	0,188	0,75(0,00-2,50)	0,348	4,75(2,00-7,90)	0,317
Alta	3,00(1,50-5,20)		0,00(0,00-0,90)		3,00(1,50-4,30)	
TGFβ1						
Baixa	5,60(3,90-8,20)	0,802	0,60(0,00-1,80)	0,180	1,50(0,15-5,50)	0,780
Alta	6,05(2,92-12,95)		1,50(0,15-5,50)		4,60(2,90-7,60)	
SMA						
Baixa	5,70(3,30-8,82)	0,925	0,75(0,00-2,02)	0,749	4,60(2,67-7,37)	1,000
Alta	6,20(3,90-8,20)		0,00(0,00-5,10)		4,90(1,30-8,20)	

*Estatisticamente significante (p<0,05)

5.12 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PAR-2, IL-6, TGFβ1 E A MARCAÇÃO MIOFIBROBLÁSTICA (SMA) NOS TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES

5.12.1 ADENOMA PLEOMÓRFICO

No AP, nos tumores com baixa expressão de SMA (n=6), a expressão do PAR-2 foi baixa em 50% dos casos (n=3). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=4), a expressão do PAR-2 foi alta em 75% dos casos (n=3) (p=0,571, Teste Exato de Fisher) (TABELA 22).

Nos tumores com baixa expressão de SMA (n=6), a expressão de IL-6 foi baixa em 83,3% dos casos (n=5). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=4), a expressão do PAR-2 foi alta em 75% dos casos (n=3) (p=0,190, Teste Exato de Fisher) (TABELA 22).

A expressão do TGFβ1 foi baixa em 83,3% dos casos (n=5) dos tumores com baixa expressão de SMA (n=6). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=4), a expressão do TGFβ1 foi alta em 50% dos casos (n=3) (p=1,000, Teste Exato de Fisher) (TABELA 22).

Tabela 22. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblástica(SMA) nos Adenomas Pleomórficos. Salvador-Ba, 2016.

Marcador Expressão	PAR-2 n (%)			IL-6 n (%)			TGFβ1 n (%)		
	Baixa	Alta	p valor	Baixa	Alta	p valor	Baixa	Alta	p valor
SMA									
Baixa (n=6)	3(50%)	3(50%)	0,571	5(83,3%)	1(16,7%)	0,190	4(66,7%)	2(33,3%)	1,000
Alta (n=4)	1(25%)	3(75%)		1(25%)	3(75%)		2(50%)	2(50%)	

* Estatisticamente significativa (p<0,05)

Teste Exato de Fisher

5.12.2 ADENOMAS DE CÉLULAS BASAIS

No AB, nos tumores com baixa expressão de SMA (n=7), a expressão do PAR-2 foi alta em 85,7% dos casos (n=6). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=2), a expressão

do PAR-2 foi baixa em 100% dos casos (n=2) (p=0,083, Teste Exato de Fisher) (TABELA 23).

Nos tumores com baixa expressão de SMA (n=7), a expressão de IL-6 foi baixa em 100% dos casos (n=7). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=2), a expressão do PAR-2 foi baixa em 100% dos casos (n=3) (TABELA 23).

A expressão do TGFβ1 foi alta em 71,4% dos casos (n=5) dos tumores com baixa expressão de SMA (n=7). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=2), a expressão do TGFβ1 foi alta em 50% dos casos (n=3) (p=1,000, Teste Exato de Fisher) (TABELA 23).

Tabela 23. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblástica(SMA) nos Adenomas de Células Basais. Salvador-Ba, 2016.

Marcador Expressão	PAR-2 n (%)			IL-6 n (%)			TGFβ1 n (%)		
	Baixa	Alta	p valor	Baixa	Alta	p valor	Baixa	Alta	p valor
SMA									
Baixa (n=7)	1(14,3%)	6(85,7%)	0,083	7(100%)	-	-	2(28,6%)	5(71,4%)	1,000
Alta(n=2)	2(100%)	-		2(100%)	-		1(50%)	1(50%)	

* Estatisticamente significativa (p<0,05)

Teste Exato de Fisher

5.12.3 ADENOCARCINOMA POLIMORFO DE BAIXO GRAU

No APBG, nos tumores com baixa expressão de SMA (n=7), a expressão do PAR-2 foi alta em 100% dos casos (n=7). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=3), a expressão do PAR-2 foi alta em 100% dos casos (n=3) (TABELA 24).

Nos tumores com baixa expressão de SMA (n=7), a expressão de IL-6 foi baixa em 85,7% dos casos (n=7). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=3), a expressão do PAR-2 foi baixa em 100% dos casos (n=3) (p=1,000, Teste Exato de Fisher) (TABELA 24).

A expressão do TGFβ1 foi baixa em 57,1% dos casos (n=4) dos tumores com baixa expressão de SMA (n=7). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=3), a expressão do TGFβ1 foi baixa em 100% dos casos (n=3) (p=0,475, Teste Exato de Fisher) (TABELA 24).

Tabela 24. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblástica(SMA) nos Adenocarcinomas Polimorfos de Baixo Grau. Salvador-Ba, 2016.

Marcador Expressão	PAR-2 n (%)		p valor	IL-6 n (%)		p valor	TGFβ1 n (%)		p valor
	Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta	
SMA									
Baixa (n=7)	-	7(100%)	-	6 (85,7%)	1(14,3%)	1,000	4(57,1%)	3(42,9%)	0,475
Alta(n=3)	-	3(100%)		3(100%)	-		3(100%)	-	

* Estatisticamente significante (p<0,05)

Teste Exato de Fisher

5.12.4 CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

No CME, nos tumores com baixa expressão de SMA (n=9), a expressão do PAR-2 foi alta em 88,9% dos casos (n=8). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=5), a expressão do PAR-2 foi baixa em 60% dos casos (n=3) (p=0,095, Teste Exato de Fisher) (TABELA 25).

Nos tumores com baixa expressão de SMA (n=9), a expressão de IL-6 foi baixa em 88,9% dos casos (n=8). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=5), a expressão do PAR-2 foi baixa em 100% dos casos (n=5) (p=1,000, Teste Exato de Fisher) (TABELA 25).

A expressão do TGFβ1 foi baixa em 66,7% dos casos (n=6) dos tumores com baixa expressão de SMA (n=9). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=5), a expressão do TGFβ1 foi alta em 60% dos casos (n=3) (p=0,580, Teste Exato de Fisher) (TABELA 25).

Tabela 25. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblástica(SMA) nos Carcinomas Mucoepidermóides. Salvador-Ba, 2016.

Marcador Expressão	PAR-2 n (%)		p valor	IL-6 n (%)		p valor	TGFβ1 n (%)		p valor
	Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta	
SMA									
Baixa (n=9)	1(11,1%)	8(88,9%)	0,095	8(88,9%)	1(11,1%)	1,000	6(66,7%)	3(33,3%)	0,580
Alta (n=5)	3(60%)	2(40%)		5(100%)	-		2(40%)	3(60%)	

* Estatisticamente significante (p<0,05)

Teste Exato de Fisher

5.12.5 CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO

No CAC, nos tumores com baixa expressão de SMA (n=6), a expressão do PAR-2 foi alta em 66,7% dos casos (n=4). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=4), a expressão do PAR-2 foi alta em 75% dos casos (n=3) (p=1,000, Teste Exato de Fisher) (TABELA 26).

Nos tumores com baixa expressão de SMA (n=9), a expressão de IL-6 foi baixa em 83,3% dos casos (n=5). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=4), a expressão do PAR-2 foi baixa em 100% dos casos (n=4) (p=1,000, Teste Exato de Fisher) (TABELA 26).

A expressão do TGFβ1 foi baixa em 100% dos casos (n=6) dos tumores com baixa expressão de SMA (n=6). Nos tumores com alta expressão de SMA (n=4), a expressão do TGFβ1 foi baixa em 75% dos casos (n=3) (p=0,400, Teste Exato de Fisher) (TABELA 26).

Tabela 26. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e a marcação miofibroblástica (SMA) nos Carcinomas Adenóides Císticos. Salvador-Ba, 2016.

Marcador Expressão	PAR-2 n (%)		p valor	IL-6 n (%)		p valor	TGFβ1 n (%)		p valor
	Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta	
SMA									
Baixa (n=6)	2(33,3%)	4(66,7%)	1,000	5(83,3%)	1(16,7%)	1,000	6(100%)	-	0,400
Alta(n=4)	1(25%)	3(75%)		4(100%)	-		3(75%)	1(25%)	

* Estatisticamente significante (p<0,05);Teste Exato de Fisher.

Em adição, os tumores foram agrupados em tumores benignos e malignos, mas não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a expressão do PAR-2, IL-6 e TGF β 1 e a marcação miofibroblástica pelo SMA nos dois grupos (TABELA 27 e 28).

Tabela 27. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGF β 1 e a marcação miofibroblástica (SMA) nos Tumores Benignos de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016

Marcador Expressão	PAR-2 n (%)		p valor	IL-6 n (%)		p valor	TGF β 1 n (%)		p valor
	Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta	
SMA									
Baixa (n=13)	12(92,3%)	1(7,7%)	0,71	1(7,7%)	6(46,2%)	1,000	4(30,8%)	9(69,2%)	0,617
Alta(n=6)	3(50%)	3(50%)		3(50%)	3(50%)		3(50%)	3(50%)	

* Estatisticamente significativa ($p < 0,05$); Teste Exato de Fisher

Tabela 28. Comparação entre a expressão do PAR-2, IL-6, TGF β 1 e a marcação miofibroblástica (SMA) nos Tumores Malignos de glândulas salivares. Salvador-Ba, 2016.

Marcador Expressão	PAR-2 n (%)		p valor	IL-6 n (%)		p valor	TGF β 1 n (%)		p valor
	Baixa	Alta		Baixa	Alta		Baixa	Alta	
SMA									
Baixa (n=22)	3(13,6%)	19(86,4%)	0,211	19(86,4%)	3(13,6%)	0,537	16(72,7%)	6(27,3%)	0,714
Alta(n=12)	4(33,3%)	8(66,7%)		12(100%)	-		8(66,7%)	4(33,3%)	

* Estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Teste Exato de Fisher

5.13 RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO PAR-2, IL-6, TGF β 1, SMA E OS PARÂMETROS CLÍNICOS.

Os dados da relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGF β 1 e SMA com os parâmetros clínicos no AP, AB, APBG, CME e CAC podem ser observados nas tabelas 29, 30, 31, 32 e 33, respectivamente. Vale ressaltar que para alguns parâmetros do AP, AB, APBG e CAC, não foi possível a aplicação de testes para análise estatística devido ao tamanho da amostra.

Tabela 29. Relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e SMA com os parâmetros clínicos dos casos de AP.
Salvador-Ba, 2016.

MARCADOR EXPRESSÃO	PAR-2			IL-6			TGFβ1			SMA		
	ALTA (n)	BAIXA (n)	P	ALTA (n)	BAIXA (n)	P	ALTA (n)	BAIXA (n)	P	<50% (n)	>50% (n)	P
Sexo												
M	2	1	1,000	1	2	1,000	1	2	1	2	1	1,000
F	4	3		3	4		3	4		4	3	
Idade												
<40 ANOS	4	1	0,524	2	3	1,000	2	3	1	2	3	0,262
≥40 ANOS	2	3		2	3		2	3		4	1	
Localização												
Glândula maior	3	4	0,200	1	6	0,033	3	4	1	5	2	0,500
Glândula menor	3	0		0	3		1	2		1	2	
Tamanho												
<3 cm	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
≥3 cm	2	1		2	1		1	2		1	2	
Não disponível	4	3		2	5		3	4		5	2	

* Estatisticamente signigficante(p<0,05);Teste Exato de Fisher

Tabela 30. Relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e SMA com os parâmetros clínicos dos casos de AB.Salvador-Ba, 2016.

MARCADOR	PAR-2			IL-6			TGFβ1			SMA		
	ALTA (n)	BAIXA (n)	P	ALTA (n)	BAIXA (n)	P	ALTA (n)	BAIXA (n)	P	<50% (n)	>50% (n)	P
Sexo												
M	2	1	0,762	0	3	-	2	1	0,762	2	1	0,583
F	4	2		0	6		4	2		5	1	
Idade												
<40 ANOS	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
≥40 ANOS	5	3		0	8		5	3		6	2	
Não disponível	1	0		0	1		1	0		1	0	
Localização												
Glândula maior	5	3	1,000	0	8	-	5	3	1,000	6	2	0,778
Glândula menor	1	0		0	1		1	0		1	0	
Tamanho												
<3 cm	2	2	1,000	0	4	-	3	1	0,400	2	2	1,000
≥3 cm	1	0		0	1		0	1		1	0	
Não disponível	3	1		0	4		3	1		0	4	

* Estatisticamente significante(p<0,05); Teste Exato de Fisher

Tabela 31. Relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e SMA com os parâmetros clínicos dos casos de APBG.Salvador-Ba, 2016.

Marcador	PAR-2			IL-6			TGFβ1			SMA		
	ALTA (n)	BAIXA (n)	P	ALTA (n)	BAIXA (n)	P	Alta (n)	Baixa (n)	P	<50% (n)	>50% (n)	P
Sexo												
M	3	0	-	0	3	1,000	1	3	-	2	1	0,708
F	7	0		1	6		2	6		5	2	
Idade												
<40 ANOS	2	0	-	1	1	0,200	1	2	1	1	1	1,000
≥40 ANOS	8	0		0	8		2	7		6	2	
Localização												
Glândula maior	1	0	-	0	1	1,000	0	1	1	1	0	0,700
Glândula menor	9	0		1	8		3	8		6	3	
Tamanho												
<3 cm	3	0	-	0	3	1,000	1	3	1	3	0	0,464
≥3 cm	6	0		1	5		2	5		3	3	
Não disponível	1	0		0	1		0	1		1	0	

* Estatisticamente signigficante(p<0,05); Teste Exato de Fisher

Tabela 32. Relação entre a imunexpressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e SMA com os parâmetros clínicos dos casos de CME.Salvador-Ba, 2016.

MARCADOR EXPRESSÃO	PAR-2			IL-6			TGFβ1			SMA		
	ALTA (n)	BAIXA (n)	p valor	ALTA (n)	BAIXA (n)	p valor	ALTA (n)	BAIXA (n)	p valor	<50% (n)	>50% (n)	p valor
Sexo												
M	3	1	1,000	1	3	0,286	0	4	0,085	3	1	1,000
F	7	3		0	10		6	4		6	4	
Idade												
<40 ANOS	3	2	1,000	0	5	1,000	3	2	0,558	3	2	0,222
≥40 ANOS	5	2		1	6		2	5		6	1	
Não disponível				0	2		1	1		1	1	
Localização												
Glândula maior	6	2	0,547	1	7	1,000	2	6	0,222	6	2	0,547
Glândula menor	2	2		0	4		3	1		2	2	
Não disponível	2	0		0	2		1	1		2	0	
Tamanho												
<3 cm	1	0	1,000	0	1	1,000	1	0	0,455	1	0	1,000
≥3 cm	6	4		1	9		4	6		6	4	
Não disponível	3	0		0	2		1	2		2	1	

* Estatisticamente signigficante(p<0,05); Teste Exato de Fisher

Tabela 33. Relação entre a imunoeexpressão do PAR-2, IL-6, TGFβ1 e SMA com os parâmetros clínicos dos casos de CAC.Salvador-Ba, 2016.

MARCADOR EXPRESSÃO	PAR-2			IL-6			TGFβ1			SMA		
	ALTA (n)	BAIXA (n)	p valor	ALTA (n)	BAIXA (n)	p valor	ALTA (n)	BAIXA (n)	p valor	<50% (n)	>50% (n)	p valor
Sexo												
M	5	3	1,000	1	7	1,000	1	7	1,000	6	2	0,133
F	2	0		0	2		0	2		0	2	
Idade												
<40 ANOS	2	0	1,000	0	2	1,000	0	2	1,000	0	2	0,133
≥40 ANOS	5	3		1	7		1	7		6	2	
Localização												
Glândula maior	3	1	1,000	1	3	1,000	0	4	-	2	2	1,000
Glândula menor	2	1		0	3		0	3		2	1	
Não disponível	2	1		0	3		1	2		2	1	
Tamanho												
<3 cm	1	0	1,000	0	1	1,000	0	1	-	1	0	-
≥3 cm	3	0		1	2		0	3		3	0	
Não disponível	3	3		0	6		1	5		2	4	

*Estatisticamente significante(p<0,05);Teste Exato de Fisher

6 DISCUSSÃO

Para compreender a interação tumor-estroma é importante definir o papel de cada célula estromal no desenvolvimento tumoral. Dentre estas células, destacam-se os mastócitos, cujo papel é complexo e por isso tem sido amplamente estudado. No presente trabalho, avaliamos a contribuição dos mastócitos na diferenciação miofibroblástica e proteínas relacionadas, em neoplasias de glândulas salivares com e sem conteúdo mioepitelial e com alto e baixo índice proliferativo, a fim de contribuir para o conhecimento do perfil biológico dessas neoplasias.

Os mastócitos são células derivadas da medula óssea, que desempenham importantes funções e, atualmente, estudos têm associado os mastócitos ao desenvolvimento e prognóstico de diversos tumores como câncer de pâncreas (MA *et al.*, 2013, AMMENDOLA *et al.*, 2014), próstata (FLEISCHMANN *et al.*, 2009; JOHANSSON *et al.*, 2010; GLOBALA *et al.*, 2014), rim (WATANBE *et al.*, 2012), ovário (CHAN *et al.*, 2005), mama (XIANG *et al.*, 2010; MANGIA *et al.*, 2011; MARECH *et al.*, 2014), pulmão (OZDEMIR *et al.*, 2015), fígado (SUZUKI *et al.*, 2015) e em melanomas (HÖLZEL *et al.*, 2016). No entanto, em tumores de glândula salivar são raros os estudos envolvendo esta população celular (KATOPODI *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2013; JAAFARI-ASHKAVANDI e ASHRAF, 2014).

No presente trabalho, os mastócitos foram detectados em todos os tumores de glândula salivar, o que está de acordo com trabalhos prévios (KATOPODI *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2013; JAAFARI-ASHKAVANDI e ASHRAF, 2014), sendo observada diferença estatisticamente significativa na densidade total de mastócitos entre tumores malignos e benignos. Esta densidade foi mais elevada nos tumores malignos, destacando-se o CME. Estes achados estão em concordância com aqueles escritos por

Vidal et al., (2013), que observaram uma maior densidade de mastócitos no CME quando comparado aos CAC, APBG e AP. Os autores comentam que apesar desse achado não contribuir para distinção morfológica entre os tumores de glândula salivar, ele poderia ser usado para identificar diferenças no comportamento biológico entre o CME e os demais tumores de glândula salivar.

No nosso estudo, os mastócitos estavam localizados próximos a vasos sanguíneos, como mostram diferentes trabalhos prévios (KATOPODI et al., 2004; CONTI *et al.*, 2007, MALTBY, KHAZAIE e MCNAGNY, 2009; ANTONIADES *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2013; PYZIAK *et al.*, 2013), e predominantemente em regiões periparenquimais, independente do tipo histológico do tumor. Esses achados estão em conformidade com o trabalho realizado anteriormente por Vidal et al., (2013), e outros autores que também encontraram uma maior concentração de mastócitos em áreas peritumorais (THEOHARIDES e CONTI, 2004; JOHANSSON *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2013; JAAFARI-ASHKAVANDI e ASHRAF, 2014; GLOBA *et al.*, 2014; Malfettone *et al.*, 2015).

Estudos realizados em câncer de próstata têm revelado associação entre a distribuição de mastócitos e o prognóstico tumoral, com mastócitos intratumorais relacionados ao melhor prognóstico, enquanto mastócitos peritumorais estão associados ao pobre prognóstico (FLEISCHMANN *et al.*, 2009; JOHANSSON *et al.*, 2010). No nosso estudo, o AB apresentou o menor número de mastócitos periparenquimais entre as neoplasias estudadas e o CME apresentou as maiores concentrações de mastócitos totais, como peri e intraparenquimais, sugerindo o possível papel dessas células na agressividade tumoral. Tais achados estão em concordância com o trabalho realizado pelo nosso grupo (VIDAL *et al.*, 2013), o qual avaliou a densidade de mastócitos e vasos sanguíneos em tumores de glândula salivar e encontraram uma maior

concentração de mastócitos periparenquimais em todos os tumores estudados e uma quantidade maior de mastócitos, tanto peri quanto intraparenquimais nos casos de CME. Por outro lado, o CAC exibiu o menor número de mastócitos intraparenquimais, achado similar ao encontrado no nosso estudo e aqueles de Jaafari-Ashkavandi e Ashraf (2014).

Um achado interessante observado no nosso estudo foi a presença marcante de mastócitos na pseudo-cápsula do AP, as quais parecem contribuir para a formação dessa estrutura em AP. Um estudo prévio sugeriu que os mastócitos contribuíam para a expansão e crescimento de tumores odontogênicos benignos, por mediar a síntese de colágeno (DE ASSIS et al., 2012).

No presente estudo, quando considerado o índice proliferativo, tumores benignos com alto índice proliferativo (26,3%), apresentaram a densidade de mastócitos totais, intra e periparenquimais similares à densidade encontrada nos tumores com baixo índice proliferativo (73,7%). Já os tumores malignos com alto índice proliferativo (26,5%) apresentavam maior densidade de mastócitos totais, intra e periparenquimais, que os tumores malignos com baixo índice proliferativo (73,5%). Apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa, é possível sugerir que a alta densidade de mastócitos desempenha um papel importante nos processos associados à proliferação celular e carcinogênese nos tumores malignos de glândula salivar. A despeito disso, Watanabe *et al.* (2011) mostraram uma proporção inversa entre a densidade de mastócitos intratumorais e a apoptose de células no carcinoma de células renais, bem como um alto índice proliferativo, invasão local e metástase em alguns desses casos. O envolvimento da triptase liberada pelos mastócitos na proliferação celular tem sido descrita também em vários tipos de câncer, como câncer de cólon (YOSHII *et al.*, 2005; MALFETTONE *et al.*, 2013), próstata (FLEISCHMANN *et al.*, 2009; JOHANSSON *et al.*, 2010; GLOBALA *et al.*, 2014), pâncreas (STROUCH *et al.*, 2010, AMMENDOLA *et al.*, 2014),

mama (XIANG et al., 2010; MARECH et al., 2014), pulmão (OZDEMIR et al., 2015) e fígado (SUZUKI et al., 2015).

As células mioepiteliais têm sido alvo de inúmeras pesquisas, uma vez que participam do processo neoplásico, benigno e maligno, da maioria dos tumores envolvendo as glândulas salivares (NGYUYEN et al., 2000; GUDJONSSON *et al.*, 2005; NAGAO *et al.*, 2012; CHITTURI *et al.*, 2015), e expressam alto índice de inibidores da angiogênese, desempenhando função negativa no crescimento tumoral (NGYUYEN et al., 2000; BARSKY e KARLIN, 2006; COSTA et al., 2008; CARDOSO et al., 2009).

No nosso estudo, os tumores malignos com conteúdo mioepitelial menor que 50% (30%) apresentavam maior densidade de mastócitos totais, intra e periparenquimais que os tumores com conteúdo mioepitelial $\geq 50\%$ (70%), apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa. Esses achados corroboram com outros autores da literatura, que afirmam que as células mioepiteliais atuam como um supressor de tumor (NGYUYEN et al., 2000; CHITTURI *et al.*, 2015), promovendo defesa importante contra a invasão do câncer, por secretarem substâncias que inibem a angiogênese, invasão e metástase (ZARBO *et al.*, 2002; DEUGNIER *et al.*, 2002), e reforça o conhecimento do papel dos mastócitos no crescimento tumoral (MANGIA et al., 2011; DE ASSIS et al., 2012; VIDAL et al., 2013). Diante desses resultados, sugerimos que os mastócitos têm um papel importante no desenvolvimento tumoral, especialmente nos tumores com baixo conteúdo mioepitelial e, conseqüentemente, nos tumores malignos com maior agressividade tumoral. Em contraste, os tumores benignos com conteúdo mioepitelial menor que 50% (31,6%) apresentavam menor densidade de mastócitos e não foi possível estabelecer esta associação.

Recentemente, um estudo prévio relatou a influência dos mastócitos sobre os fibroblastos, presentes no microambiente tumoral e a sua contribuição para a carcinogênese (MANGIA et al., 2011). Em adição, Sousa-Neto et al., (2016) estudaram a presença de mastócitos e miofibroblastos em tumores odontogênicos, observando uma grande quantidade destas células no tumor odontogênico queratocístico; eles sugeriram que estas células podem contribuir para o crescimento destes tumores, através da liberação de proteases e remodelação da matriz extracelular.

No presente estudo, quando comparada à densidade de mastócitos com a expressão do SMA nos tumores de glândula salivar, tumores benignos e malignos com alta expressão de SMA apresentaram maior densidade de mastócitos totais e periparenquimais, com destaque para a densidade periparenquimal no APBG ($p=0,017$). No entanto, quando realizada a dupla marcação imunohistoquímica a fim de verificar a distribuição espacial destas células, não foi possível estabelecer uma relação entre a presença de alta densidade de mastócitos com a presença de miofibroblastos, pois em áreas *hot spot* de mastócitos não foi encontrado miofibroblastos adjacentes nos tumores estudados, exceto em um caso de CAC. Esses achados diferem daqueles encontrados por Mangia et al.,(2011) em câncer de mama, que avaliaram a presença de mastócitos e miofibroblastos nas regiões peritumorais e intratumorais dos tumores, e observaram que os fibroblastos SMA+ foram correlacionados com alta densidade de mastócitos intactos na região peritumoral e com alta densidade de mastócitos degranulados na região tumoral; demonstrando que a interação entre os mastócitos e fibroblastos exerce um papel essencial na progressão do tumor, como a indução da diferenciação miofibroblástica, via triptase em sinergia com outros mediadores. No entanto, tratando-se de neoplasias de glândulas salivares, há uma necessidade de mais pesquisas

envolvendo a inter-relação entre o papel dos mastócitos e seus mediadores na diferenciação miofibroblástica.

Neste estudo, quando comparada à expressão miofibroblástica com o índice proliferativo e conteúdo mioepitelial dos tumores, não foi possível estabelecer associação significativa, tendo em vista que a marcação do SMA foi predominantemente baixa, independente do índice proliferativo e conteúdo mioepitelial dos tumores, exceto no CME, em que tumores com baixo índice proliferativo apresentaram maior expressão de SMA ($p=0,031$). Esses achados estão de acordo com aqueles descritos por Sobral et al.,(2004) em CME com diferentes graus de malignidade, onde a marcação do SMA foi mais intensa nos tumores de baixo grau quando comparado aqueles com intermediário e alto grau. No nosso estudo, o SMA apresentou baixa expressão na maioria dos casos de CME, com destaque para os tumores de baixo grau de malignidade, em que a expressão foi baixa em 75% dos casos. Entretanto, outros autores na literatura afirmam que os miofibroblastos atuam como promotores tumorais, participando da carcinogênese, progressão neoplásica, angiogênese e metástase (KALLERMAN et al., 2007; SUROWIAK et al., 2007; MANGIA et al., 2011; GUPTA, METGUD e GUPTA et al., 2015; JAYARAJ et al., 2015; GUPTA, RAMANI e CHANDRASEKAR, 2015) em diferentes neoplasias como câncer de mama (MANGIA et al., 2011), próstata (AUGSTEN et al., 2009; WANG et al., 2010) e carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço (ZHANG et al., 2006).

Outro achado interessante observado no presente estudo foi que apesar da baixa expressão de SMA predominante em todos os tumores estudados, um caso de CAC sólido chamou a atenção pelo conteúdo excessivo de miofibroblastos. Esse achado poderia ser extrapolado por aqueles encontrados por Guan et al., (2014) ao estudarem dezoito CACs com diferentes graus de malignidade, e encontram maior expressão de

SMA nos CACs sólidos quando comparados aos sub-tipos cribriforme e tubular. Adicionalmente, os miofibroblastos foram relacionados ao padrão de crescimento agressivo do CAC devido sua alta expressão de MMP-2 e da quimiocina CXCL12 (GUAN et al., 2014). Sugerimos que estudos com maior número de casos de CAC sólido sejam realizados, para que possa ser estabelecida uma possível relação entre a expressão do SMA e o comportamento agressivo do CAC sólido.

A participação de proteínas e mediadores, especialmente o PAR-2, IL-6 e TGF β 1, na diferenciação miofibroblástica e progressão tumoral tem sido alvo de algumas pesquisas (GANDOUR-EDWARDS et al., 1995; MANGUITA et al., 2010; DUCHESNE et al. 2011; DONG et al., 2011; WANG et al., 2011; KAUFFMANN e HOLLEMBERG, 2012; HUGO et al., 2012; WOJTUKIEWICZ et al., 2015). No entanto, o estudo desses mediadores em tumores de glândula salivar ainda é uma área pouco explorada na literatura atual.

PARs são uma sub-família de proteínas G composta por 4 membros, designados PAR 1-4. Em particular, o PAR-2 é ativado por múltiplas enzimas *tripsina-like*, incluindo tripsina e triptase liberada pelos mastócitos. O PAR-2 está envolvido na iniciação da proliferação celular em vários tipos de câncer e facilita a migração celular, angiogênese, interações celulares com fibroblastos, células endoteliais e células vasculares e metástase (YOSHII et al, 2005; STROUCH et al., 2010; WATANABE et al., 2012; WOJTUKIEWICZ et al., 2015; LIDFELDT et al., 2015).

A ativação do PAR-2 é um evento oncogênico e pode facilitar a progressão do câncer ao promover a proliferação de células, migração e invasão de algumas neoplasias, como no câncer de cólon (MALFETONE et al., 2013), mama (LIDFELDT et al., 2015), próstata (WILSON et al., 2004), pâncreas (IKEDA et al., 2003; XIE et al., 2015), cérvix uterino (SANCHEZ-HERNANDEZ et al., 2008) e carcinoma

escamocelular oral (AL-ERYANI et al., 2015). De acordo com Kularathna et al., (2014), o PAR-2 é um evento importante em múltiplos estágios da progressão tumoral e está associada a dor no câncer.

No nosso trabalho, o PAR-2 mostrou alta expressão na maioria dos casos dos tumores estudados, com destaque para os tumores malignos APBG (100%), CME (71,4%) e CAC (70%), no entanto, a diferença de marcação entre os tumores não foi estatisticamente significativa, mesmo quando considerado o índice proliferativo e conteúdo mioepitelial. A imunomarcação do PAR-2 foi predominantemente citoplasmática nas células tumorais, em concordância com os achados de Malfettone *et al.*, (2013) e de Xie *et al.*, (2015), que observaram em câncer de cólon e próstata, respectivamente, marcação citoplasmática e membranas das células tumorais. Xie et al.,(2015) num estudo imunohistoquímico e de PCR, afirmaram que a ativação do PAR-2 pode promover a invasão e migração das células do câncer pancreático por aumento da expressão da MMP-2. Em outro estudo, Amendola et al., (2014) afirmaram que a ativação do PAR-2 via triptase liberada pelos mastócitos estimula angiogênese e crescimento tumoral, por via parácrina, contribuindo para invasão tumoral e metástase. Diante dos nossos resultados, sugerimos que o PAR-2 desempenha um importante papel no desenvolvimento tumoral nas neoplasias de glândula salivar, especialmente nos tumores malignos, APBG, CME e CAC.

Malfettone et al., (2013) avaliaram a relação de mastócitos e PAR-2 em 115 casos de câncer de cólon retal, por dupla marcação. Eles observaram que a alta densidade de mastócitos nas margens invasivas do tumor estava associada a estágios avançados do câncer e fortemente correlacionada com a expressão do PAR-2. O PAR-2 mostrou alta imunoreatividade nas regiões de alta densidade de mastócitos, sendo que a superexpressão do PAR-2 estava associada com estágio avançado do TNM, tumores

pobrememente diferenciados e com invasão linfovascular. No presente estudo, quando comparamos a expressão do PAR-2 com a densidade de mastócitos, encontramos que tumores, tanto benignos (63,2%) como malignos (79,4%) com alta expressão de PAR-2 apresentaram alta densidade de mastócitos periparenquimais e baixa densidade de mastócitos intraparenquimais; sendo que, nos tumores malignos com alta expressão de SMA (35,3%), a expressão do PAR-2 foi alta na maioria dos casos (66,7%), e nos tumores benignos com alta expressão de SMA (31,6%), a expressão de PAR-2 foi alta na metade dos casos. Apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa, diante desses achados, sugerimos que a alta densidade de mastócitos periparenquimais, concomitante a alta expressão de PAR-2 cooperam para o crescimento tumoral e especulamos que os mastócitos, via PAR-2, também poderiam desempenhar um importante papel na diferenciação miofibroblática nos tumores malignos de glândula salivar. No entanto, mais estudos em tumores de glândula salivar são necessários para esclarecer esta relação.

Kularathna et al., (2014), na sua ampla revisão sobre PAR-2, discutem o fato que a maioria dos estudos avaliando a participação do PAR-2 na progressão tumoral são realizados a partir de linhagens de células tumorais *in vitro*. Em contraste, poucos estudos têm testado os efeitos da ativação do PAR-2 na progressão tumoral *in vivo* em ratos (*null mice*) ou antagonistas do PAR-2. Estes estudos *in vivo* demonstram evidências contraditórias da função exercida pelo PAR-2 na sinalização da progressão tumoral, o que reflete a grande complexidade do microambiente tumoral e suas interações com o tumor e células do hospedeiro *in vivo*. Portanto, os autores concluem que para melhor compreensão na função do PAR-2 mediando a sinalização na progressão tumoral e os efeitos do antagonismo da sinalização, estudos *in vivo* são necessários.

A IL-6 é uma citocina imunomoduladora com múltiplas atividades biológicas (AGGARWAL et al., 2006; HEIKKILA et al., 2008; GROBLEWSKA et al., 2012), sendo

secretada no microambiente tumoral por vários tipos de células, como os mastócitos, fibroblastos, monócitos, linfócitos e células tumorais (HUGO et al., 2012). A IL-6 é importante na patogênese e desenvolvimento tumoral (RIBATTI et al., 2009; HUGO et al., 2012; SHIN et al., 2014), e promove o crescimento do tumor, por inibição da apoptose e indução da angiogênese (NAUGLI, KARIN, 2008).

No nosso estudo, a IL-6 exibiu predominantemente baixa expressão, independente do índice proliferativo e conteúdo mioepitelial, em todos os tumores de glândula salivar estudados, embora esta diferença não tenha sido significativa. No AP, a imunomarcação da IL-6 foi citoplasmática e membranar nas células epiteliais, mioepiteliais e células externas dos ductos, sendo evidente intensa marcação estromal. É importante ressaltar, que entre os tumores estudados, o AP foi o tumor que apresentou o maior número de casos (40%) com alta expressão de IL-6. Esses achados concordam com aqueles descritos por Gandour-Edwards et al.(1995) que observaram alta reatividade da IL-6 no AP e Andreasen et al., (2015) que também observaram, no AP, intensa expressão de IL-6 no citoplasma dos ductos e marcação discreta nas células mioepiteliais. É importante ressaltar que no nosso estudo, o AB não exibiu imunomarcação para IL-6. No entanto, outro estudo mostrou moderada reatividade da IL-6 no AB (GANDOUR-EDWARDS et al., 1995).

O APBG e o CAC apresentaram ausência de marcação em 90% dos casos para IL-6, ocorrendo expressão da IL-6 em apenas um caso de cada tumor (10%). No APBG, a marcação foi evidente em áreas focais de matriz estromal. O único caso de CAC sólido apresentou alta expressão citoplasmática de IL-6, e intensa marcação estromal, diferentemente dos CAC cribriformes que não apresentaram marcação. O CME apresentou baixa expressão na maioria dos casos (92,9%), com marcação predominantemente estromal. Outros autores encontraram alta reatividade da IL-6 no APBG, diferindo dos nossos achados, apesar de ser em um pequeno número de casos (n=4), e baixa reatividade a IL-6 no CME e CAC, semelhante ao presente estudo. Tendo em vista a intensa marcação de IL-6

encontrada em um caso de CAC sólido dos nossos resultados, sugerimos que mais casos de CAC sólidos precisam ser estudados para se estabelecer uma possível relação entre a IL-6 e a maior agressividade dos CACs sólidos.

No estudo realizado por Gallo et al., (2002) numa linhagem celular de AP, a IL-6 estimulou a proliferação celular das células ductais por mecanismo autócrino. Outros autores mostram que a IL-6 induz a TEM, como por exemplo, em câncer de mama (SULLIVAN et al., 2009).

Quanto à intensa marcação estromal da IL-6 encontrada nos tumores de glândula salivar do presente trabalho, ela pode estar relacionada à interação entre a IL-6 e a TEM na invasão tumoral (HUGO et al., 2007).

No presente trabalho, quando comparamos a expressão de IL-6 com a densidade de mastócitos e a expressão de miofibroblastos, encontramos que tumores benignos com alta expressão de IL-6 (21,1%) apresentaram maior expressão de mastócitos totais, peri e intraparenquimais, e nos tumores benignos com alta expressão de SMA (31,6%), 50% dos casos apresentaram alta expressão de IL-6, apesar desse resultado não ter sido estatisticamente significativo. Entretanto, no presente trabalho, tumores malignos com alta expressão de IL-6 (8,8%) apresentaram menor densidade de mastócitos peri e intra parenquimais, e nos tumores malignos com alta expressão de SMA (35,3%), a expressão da IL-6 foi baixa em 100% dos casos. Em estudo recente em cultura de células de câncer de mama, Hugo et al.,(2012) demonstraram que mastócitos ativados secretam IL-6, que promove a proliferação de fibroblastos, e estes, por mecanismo de *feed-back* positivo secretam IL-6 que induz o aumento do número de mastócitos. Os fibroblastos estromais, via aferente, secretam IL-6 promovendo crescimento e invasão tumoral via TEM. Em adição, a secreção de IL-6 pelo tumor, via eferente, leva a diferenciação miofibroblástica, contribuindo assim para o crescimento tumoral. Diante dos nossos achados, sugerimos que a IL-6 parece contribuir para o desenvolvimento de tumores benignos com baixo índice

proliferativo e conteúdo mioepitelial menor que 50%, no entanto, não está claro o papel desta citocina nos tumores malignos de glândula salivar.

Recentemente, tem sido descrito na literatura que a IL-6 atua na inibição da angiogênese em CAC (SHIN et al., 2014). Já outro estudo realizado por Mochizuki et al., (2015), os autores mostraram que a inibição do receptor da IL-6 em CME, exerce um efeito anti-tumoral, podendo contribuir no tratamento deste tumor. Interessantemente, estudos em melanoma mostram que a IL-6 inibe o crescimento tumoral em estágios iniciais do câncer, no entanto, estimula a proliferação celular em tumores metastáticos ou em estágios avançados (LU et al., 1992; FLORENES et al., 1999; HOEJBERG et al., 2012). Portanto, sugerimos que novos estudos sejam realizados em tumores de glândula salivar para descrever o papel da IL-6 no crescimento tumoral e carcinogênese nesses tumores.

O TGF β 1 é um membro da família de fator de crescimento TGF β e atua na carcinogênese como regulador crítico. Apresenta comportamento dual, atuando como supressor tumoral nas fases iniciais das neoplasias e promovendo progressão tumoral, invasão e metástase nos estágios mais avançados (PASCHE et al., 2001; LEWIS et al., 2004; MICHL et al., 2005; FORINO et al., 2006; DO TV et al., 2008; CHEN et al., 2014).

Um estudo realizado por Hwang et al.,(2014) mostrou que o TGF β 1 promove o crescimento tumoral e contribui para um fenótipo mais invasivo. Outro estudo realizado em cultura de células de carcinoma escamocelular oral mostrou que o TGF β 1 induz um fenótipo miofibroblástico, resultando em aumento da invasão tumoral (LEWIS et al.,2015). O TGF β 1 vem sendo estudado em tumores de glândula salivar e tem sido associado a carcinogênese dessas neoplasias (SOBRAL et al, 2004; MANGUITA et al., 2010; DONG et al., 2011; WANG et al., 2011; DONG et al., 2013; WANG et al., 2014).

No presente trabalho, os tumores benignos com alto índice proliferativo (26,3%) e conteúdo mioepitelial menor que 50% (31,6%) apresentaram alta expressão do TGF β 1. Nos tumores malignos, esta relação mostrou-se inversa, mas não houve diferença

estatisticamente significativa. Esses achados estão de acordo com aqueles descritos por Cao et al.,(2009) que afirmaram que o TGF β 1 pode inibir o crescimento do CME. Em adição, no estudo realizado por Sobral et al (2004), a maioria das células do CME foram negativas ao TGF β 1, especialmente nos tumores de alto grau de malignidade que não expressaram TGF β 1. No entanto, nossos achados divergem daqueles descritos por Chen et al., (2014), que afirmaram que a ação parácrina do TGF β 1 na MEC cria um ambiente favorável para o crescimento tumoral e metástase em câncer de ovário.

No presente trabalho quando comparada a expressão do TGF β 1 com a densidade de mastócitos, nos tumores malignos, a alta expressão do TGF β 1 estava relacionada a maior densidade de mastócitos, enquanto nos tumores benignos esta relação mostrou-se inversa., no entanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, tendo em vista que, muitos estudos mostram um importante papel dos mastócitos (CONTI et al., 2007;MALTBY, KHHAZAIE e MCNAGNY, 2009; JOHANSSON et al., 2010; XIANG et al., 2010; MANGIA et al., 2011; VIDAL et al., 2013; e TGF β 1(MUKAI et al., 1998; HWANG et al., 2014;CHEN et al., 2014) no crescimento tumoral, sugerimos que nos tumores malignos de glândula salivar com alta expressão concomitante de TGF β 1 e mastócitos, se estabelece um microambiente favorável ao desenvolvimento tumoral.

Por outro lado, no nosso estudo, nos tumores malignos com alta expressão de SMA (35,3%), a expressão do TGF β 1 mostrou-se baixa na maioria dos tumores (66,7%) e nos tumores benignos com alta expressão de SMA (31,6%), a expressão do TGF β 1 mostrou-se alta na metade dos tumores benignos, no entanto, sem diferença estatisticamente significativa. Esses achados estão em concordância àqueles descritos por Sobral et al.(2004) no estudo de vinte e cinco casos de CME, que encontraram expressão positiva de TGF β 1 apenas em quatro casos CME, sendo negativa em todos os casos de alto grau de malignidade. Esses achados diferem daqueles descritos por Wang et al. (2011) que verificaram que o TGF β 1 influencia a invasão e metástase no CME. Similarmente, Guo et

al. (2002) e Dong et al. (2011) afirmaram que o TGF β 1 está associado ao mau prognóstico no CAC.

No presente estudo, a análise da expressão das proteínas aqui estudadas e da marcação dos mastócitos e miofibroblastos nos diferentes tipos histológicos do CME não mostrou diferença estatística. No CME, tumores de baixo grau apresentaram menores IMs para SMA, IL-6 e TGF β 1, enquanto que para PAR-2 e mastócitos os índices foram maiores. Tumores de alto grau exibiram IMs maiores para SMA, PAR-2 e IL-6 em metade dos casos estudados e alta densidade de mastócitos periparenquimais em todos os casos. Sugerimos que os mastócitos e o PAR-2 parecem apresentar participação no desenvolvimento de CME. Esses achados corroboram com aqueles encontrados por Vidal et al.(2013) que observaram alta densidade de mastócitos no CME, sendo a densidade periparenquimal elevada em todos os casos, e WATANABE et al.(2011) que enfatizaram a importância dos mastócitos triptase positivos e PAR-2 na carcinogênese e prognóstico tumoral do carcinoma de células renais.

Ao comparar os dados clínicos, como: sexo, idade, localização e tamanho com a expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGF β 1 não foram observadas diferenças significantes. Portanto, sugerimos que novos estudos sejam realizados em tumores de glândula salivar, para associar a expressão do SMA, PAR-2, IL-6 e TGF β 1 com as características clínicas.

Por fim, os resultados desse trabalho apontam para uma possível participação dos mastócitos no desenvolvimento e progressão tumoral dos tumores malignos de glândula salivar, com alto índice proliferativo e conteúdo mioepitelial menor que 50%, assim como especulamos uma possível participação da proteína PAR-2 na carcinogênese dos tumores de glândula salivar. Em adição, a relação entre os mastócitos e a diferenciação miofibroblástica não foi possível ser estabelecida, por meio da técnica imunohistoquímica, em tumores de glândula salivar. Sugerimos que novos estudos sejam realizados visando compreender o mecanismo pelo qual os mastócitos e proteínas relacionadas, PAR-2, IL-6 e TGF β 1 podem estar relacionadas ao crescimento e progressão desses tumores.

7 CONCLUSÕES

- A densidade de mastócitos mostrou-se mais elevada nos tumores malignos de glândula salivar que nos benignos, em especial no CME, sendo esta densidade significativamente maior na região periparenquimal que na intraparenquimal. Foi observada uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre a densidade de mastócitos intra e periparenquimais nos tumores benignos de glândula salivar.
- Os tumores malignos de glândula salivar com alto índice proliferativo e conteúdo mioepitelial menor que 50% apresentaram maior densidade de mastócitos totais, intra e periparenquimais que os tumores malignos com baixo índice proliferativo e conteúdo mioepitelial maior que 50%.
- O SMA apresentou baixa expressão na maioria dos tumores de glândula salivar, independente do índice proliferativo e conteúdo mioepitelial, com exceção para o CME, em que os tumores com baixo índice proliferativo apresentaram expressão do SMA predominantemente alta, com diferença estatisticamente significativa.
- Tumores benignos e malignos com alta expressão de SMA apresentaram alta expressão de mastócitos totais e periparenquimais quando comparados aos tumores benignos e malignos com baixa expressão de SMA, com diferença estatisticamente significativa para a densidade de mastócitos periparenquimais no APBG. No entanto, a relação entre os mastócitos e a diferenciação miofibroblástica não foi possível ser estabelecida, por meio da dupla marcação, em tumores de glândula salivar.
- O PAR-2 apresentou predominantemente alta expressão nos tumores de glândula salivar estudados; A IL-6 apresentou baixa expressão na maioria dos tumores de glândula salivar, independente do índice proliferativo e conteúdo mioepitelial; A alta expressão do TGF β 1 está relacionada a maior densidade de mastócitos nos tumores malignos de glândula salivar, sem diferença estatisticamente significativa;

Nos tumores malignos com alta expressão de SMA, a expressão do TGF β 1 mostrou-se baixa na maioria dos tumores, no entanto, sem diferença estatisticamente significativa.

- Não foi possível estabelecer uma associação estatisticamente significativa entre as proteínas aqui estudadas (PAR-2, IL-6, TGF β 1) com o índice proliferativo e conteúdo mioepitelial, assim como com a densidade de mastócitos e a diferenciação miofibroblástica.
- Sugerimos que novos estudos sejam realizados visando compreender o mecanismo pelo qual os mastócitos e proteínas (PAR-2, IL-6 e TGF β 1) relacionadas a diferenciação miofibroblástica, podem estar relacionadas ao crescimento e progressão dos tumores de glândula salivar.

REFERÊNCIAS

1. ABE R, DONNELLY SC, PENG T, BUCALA R, METZ CN. Peripheral blood fibrocytes: Differentiation pathway and migration to wound sites. **J Immunol**, v 166, n 12 p 7556-62, 2001.
2. ABRAHÃO AC, NETTO JDE N, PIRES FR, SANTOS TC, CABRAL MG. Clinicopathological characteristics of tumours of the intraoral minor salivary glands in 170 Brazilian patients. **Br J Oral Maxillofac Surg**. v 54, n1, p30-4,2016.
3. ADAMS, A.; WARNER, K.; NÖR, J. E. Salivary gland cancer stem cells. **Oral Oncology**, v. 49, n. 9, p. 845–53, set. 2013.
4. ADBELKARIM S, SHORT J, GUO J, STEINBERG SF. Protease-activated receptor-1 mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblast and cardiomyocytes. **Circ Res.**, v 91, 532-539, 2002.
5. AIGNER L, BOGDAHN U. TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. **Cell Tissue Res**. v 331, n 1, p 225-41, 2008.
6. AGGARWAL BB, SHISHODIA S, SANDUR SK. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochem Pharmacol**. v 72, p 1605–1621, 2006.
7. AGGARWAL BB, GEHLOT P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Curr Opin Pharmacol**. v 9, p 351–369, 2009.
8. AL-ERYANI K, CHENG J, ABÉ T, MARUYAMA S, YAMAZAKI M, BABKAIR H, ESSA A, SAKUT. Protease-activated receptor 2 modulates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. **Hum Pathol**. v 46, n 7, p 991-9, 2015.

9. ALVES, F. A.; PEREZ, D. E. C.; ALMEIDA, O. P.; LOPES, M. A.; KOWALSKI, L. P. Pleomorphic Adenoma of the Submandibular Gland: Clinicopathological and Immunohistochemical Features of 60 Cases in Brazil. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.**, São Paulo, v.128, p. 1400-1403, 2002.
10. AMBARTSUMIAN NS, GRIGORIAN MS, LARSEN IF, KARLSTROM O, SIDENIUS N, RYGAARD J, GEORGIEV G, LUKANIDIN E. Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. **Oncogene** v 13, p 1621,1996.
11. AMMENDOLA M, LEPORINI C, MARECH I, GADALETA CD, SCOGNAMILLO G, SACCO R, SAMMARCO G, DE SARRO G, RUSSO E, RANIERI G. Targeting mast cells tryptase in tumor microenvironment: a potential antiangiogenetic strategy. **Biomed Res Int.**v 2014:154702, 2014.
12. AMMENDOLA M, SACCO R, SAMMARCO G, DONATO G, ZUCCALÀ V, LUPOSELLA M, PATRUNO R, MARECH I, MONTEMURRO S, ZIZZO N, GADALETA CD, RANIERI G. Mast cells density positive to tryptase correlates with angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma patients having undergone surgery. **Gastroenterol Res Pract.**v 2014:951957, 2014.
13. AMIT, M. et al. International collaborative validation of intraneural invasion as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Head & Neck** p. 1–8, 2014.
14. ANDREASEN S, THERKILDSEN MH, GRAUSLUND M, FRIIS-HANSEN L, WESSEL I, HOMØE P. Activation of the interleukin-6/Janus kinase/STAT3 pathway in pleomorphic adenoma of the parotid gland. **APMIS.** v123, n 8, p706-15, 2015.

15. ARATHI, N.; BAGE, A. M. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of parotid gland: a rare occurrence. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 103-5, 2009.
16. ARAÚJO CP, GURGEL CA, RAMOS EA, FREITAS VS, BARBOSA ADE A JR, RAMALHO LM, DOS SANTOS JN. Accumulation of CD1a-positive Langerhans cells and mast cells in actinic cheilitis. **J Mol Histol**. v 41, n 6,p 357-65, 2010.
17. ASANO-KATO N, FUKAGAWA K, OKADA N, DOGRU M, TSUBOTA K, FUJISHIMA H. Tryptase increases proliferative activity of human conjunctival fibroblasts through protease-activated receptor-2. **Invest Vis Sci**. v 46, p 4622-4626, 2005.
18. AUCLAIR, P. L.; GOODE, R. K.; ELLIS, G.L. Mucoepidermoid Carcinoma of Intraoral Salivary Glands: Evaluation and Application of Grading Criteria in 143 Cases. **Cancer**, v. 69, n. 8, p. 2021-2030, 1992.
19. AU SR, AU KATHERINE, SAGGERS GC, KARNE N, EHRLICH HP. Rat mast cells communicate with fibroblasts via gap junction intercellular communications. **J Cell Biochem.**, v 100, p 1170-1177, 2007.
20. AUGSTEN, M; HAGGLOF, C; OLSSON E et al. Cxcl14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. **Proc Natl Acad Sci USA** v 106, p 3414-3419,2009.
21. BAI, S. et al. Salivary mucoepidermoid carcinoma: a multi-institutional review of 76 patients. **Head and Neck Pathology**, v. 7, n. 2, p. 105–12, jun. 2013.
22. BARROS AC, GURGEL CAS, GOMES MC, AGRA IMG, KRUSCHEWSKY LS, SANTOS JN. Minor salivary gland tumors in a South American population. **Arch Oncol**, v 18, n 3, p 56-9, 2010.

23. BARSKY, S.H., KARLIN, N.J.. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*; v.10, p. 249-260, 2006.
24. BATLLE M,PÉREZ-VILLA F,LAZARO A, GARCIA-PRAS E, RAMIREZ J, ORTIZ J, ORÚS J, ROQUÉ M, HERAS M, ROIG E. Correlation between mast cell density and myocardial fibrosis in congestive heart failure patients. *Transplant Proc.*, v 39,n 7, 2347-9, 2007.
25. BATSAKIS JG, EL-NAGGAR AK. Myoepithelium in salivary and mammary neoplasms is host-friendly. *Adv Anat Pathol.* v 6, n 4, p 218-26, 1999.
26. BELLONE S, WATTS K, CANE' S, PALMIERI M, CANNON MJ, BURNETT A, ROMAN JJ, PECORELLI S, SANTIN AD. High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* v 98, p 92–8,2005.
27. BIERIE B, MOSES HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer.* v 6, n 7,p 506-20, 2006.
28. BOAHENE, D. K. O.; OLSEN, K. D.; LEWIS, J. E.; PINHEIRO, A.D.; PANKRATZ, V. S.; BAGNIEWSKI S. M. Mucoepidermoid Carcinoma of the Parotid Gland: The Mayo Clinic Experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 130, p. 849-856, 2004.
29. BOWMICK NA, NEILSON EG, MOSES HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* v 432, p 332-7, 2004.
30. BRADLEY, P. J. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 12, p. 127–132, 2004.

31. BRAZÃO-SILVA, M. T. et al. Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland: a clinicopathological study of 49 cases and of metallothionein expression with regard to tumour behaviour. *Histopathology*, v. 63, n. 6, p. 802–9, dez. 2013.
32. BRIGHTLING CE, BRADDING P, PAVORD ID, WARDLAW AJ. New insights into the role of the mast cell in asthma. *Clin Exp Allergy.*, v33, n 5, p 550-6, 2003.
33. BROWN, DC; GATTER, KC. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathol.** v 40, n 1, p 2-11, 2002.
34. BUDI EH, MUTHUSAMY BP, DERYNCK R. The insulin response integrates increased TGF- β signaling through Akt-induced enhancement of cell surface delivery of TGF- β receptors. **Science Signaling.** v 29, n 8: ra96, 2015.
35. CALLEJO C A, CISA L E, ROMAGOSA P V, MAÑÓS P M. Basal cell adenoma in maxillary sinus: unusual presentation. **Acta Otorrinolaringol Esp.** v 63, n1, p 65-7, 2012.
36. CALON, A; TAURIELLO, DVF; BATLLE, E. TGF- β in CAF-mediated tumor growth and metastasis. **Seminars in Cancer Biology** v 25, p 15–22, 2014.
37. CAO YT, ZHAO D, YANG S, WANG XY, GAO QH, XUAN M, CAO JF. Expression and significance of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- β 1 in mucoepidermoid carcinoma with different malignant degree. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.** v 40, n 5, p 881-4, 2009.
38. CARDOSO, S.V.; SOUZA, K.C.; FARIA, P.R.; EISENBERG, A.L.; DIAS, F.L.; LOYOLA, A.M. Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary gland neoplasms with diverse metastatic behavior. **BMC Cancer.** v 9, p 391, 2009.

39. CARLINI, M. J.; DALURZO, M. C.; LASTIRI, J. M.; SMITH, D. E.; VASALLO, B. C.; PURICELLI, L. I.; LAURÍA DE CIDRE, L. S. Mast cell phenotypes and microvessels in non-small cell lung cancer and its prognostic significance. **Hum Pathol.** v.41, p. 697-705, 2010.
40. CARVALHO, Y.R., ARAUJO, N.S., ARAUJO, V.C., SESSO, A. Polymorphous low-grade adenocarcinoma. An ultrastructural and immunohistochemical study. **Rev. Odontol UNESP**, v. 22, p. 19-29, 1993.
41. CHAN JK, MAGISTRIS A, LOIZZI V, LIN F, RUTGERS J, OSANN K, DISAIA PJ, SAMOSZUK M. Mast cell density, angiogenesis, blood clotting, and prognosis in women with advanced ovarian cancer. **Gynecol Oncol.** V 99, n1, p20- 25, 2005
42. CHEN L, MORY Y, ZILBERSTEIN A, REVEL M. Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interferon- β . **Proc Natl Acad Sci** v 85, p 8037-41, 1988.
43. CHEN Z, MALHOTRA PS, THOMAS GR, ONDREY FG, DUFFEY DC, SMITH CW, ENAMORADO I, YEH NT, KROOG GS, RUDY S, MCCULLAGH L, MOUSA S, QUEZADO M, HERSCHER LL, VAN WAES C. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. **Clin Cancer Res.** v 5, p 1369-1379, 1999.
44. CHEN, K; WEI, H; LING, S; YI, C. Expression and significance of transforminggrowthfactor- β 1 in epithelial ovarian cancer and its extracellular matrix. **OncolLett.** v 8, n 5, p 2171-2174, 2014.
45. CHIDZONGA, M. M.; LOPEZ PEREZ, V. M.; PORTILLA-ALVAREZ, A. L. Salivary gland tumours in Zimbabwe: report of 282 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v. 24, n. 4, p. 293-7, 1995.

46. CHITTURI RT, VEERAVARMAL V, NIRMAL RM, REDDY BV. Myoepithelial Cells (MEC) of the Salivary Glands in Health and Tumours. **J Clin Diagn Res.** v9, n3,p ZE14-8, 2015.
47. CONTI, P.; CASTELLANI, M. L.; KEMPURAJ, D.; SALINI, V.; VECCHIET, J.; TETÈ, S.; MASTRANGELO, F.; PERRELLA, A.; DE LUTTIIS, M. A.; TAGEN, M.; THEOHARIDES, T. C. Role of mast cells in tumor growth. **Ann Clin Lab Sci.**, v. 37, n. 4, p. 315-22, 2007.
48. COSTA AF, DEMASI AP, BONFITTO VL, BONFITTO JF, FURUSE C, ARAÚJO VC, METZE K, ALTEMANI A. Angiogenesis in salivary carcinomas with and without myoepithelial differentiation. **Virchows Arch.** v.453, n.4, 359-67, 2008.
49. COUSSENS L, WERB Z. Inflammation and cancer. **Nature.** v 420, p 860–7, 2002 .
50. DANIELS, J. S.; ALI, I.; AL BAKRI, I. M.; SUMANGALA, B. Pleomorphic adenoma of the palate in children and adolescents: a report of 2 cases and review of the literature. **J Oral Maxillofac Surg.**, Arábia Saudita, v. 65, n. 3, p. 541-9, 2007.
51. DARDICK, I., OSTRYNSKI, V., EKEN, J.K., LEUNG, R., BURFORD-MASON, A.P. Immunohistochemical and ultrastructural correlates of muscle-actin expression in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas based on comparison of formalin and methanol fixation. **Virchow Archiv;** v. 421, p. 95-104, 1992.
52. DARDICK, I. **Color Atlas/Text of Salivary Gland Pathology.** New York: Igaku-Shoin Medical Publishers, 1996, 274p.

53. DE ASSIS CALDAS PEREIRA F, GURGEL CA, RAMOS EA, VIDAL M, PINHEIRO AL, JURISIC V, et al. Distribution of mast cells in benign odontogenic tumors. **Tumour Biol.** v 33,n 2, p 455–61, 2012.
54. DE OLIVEIRA, F. A. et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian DE OLIVEIRA RODINI, C.; BATISTA, A. C.; LARA, V. S. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 97, n. 1, p. 59-63, 2004.
1. DESMOULIERE A, GUYOT C, GABBIANI G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **Int Dev Biol.** v 48, p 509-517, 2004.
 2. DEUGNIER MA, TEULIÈRE JA, FARALDO MF, THIERY JP, GLUKHOVA MA. The importance of being a myoepithelial cell. **Breast Cancer Res.** v 4, p 224-30, 2002.
 3. DIENZ O, RINCON M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. **Clin Immunol.** v 130, p 27–33, 2009.
 4. DIXON IMC, CUNNINGTON. Mast Cells and Cardiac Fibroblasts. Accomplices in Elevation of collagen synthesis in Modulation of Fibroblast Phenotype. **Hypertension.** v 58, p 142-144, 2011.
 5. DOS SANTOS HT, DE ANDRADE BA, EGAL ES, FILHO ER, MARIANO FV, ALTEMANI A. Plasmacytoid-Type Cellular Differentiation in Polymorphous Low-Grade Adenocarcinoma. **Int J Surg Pathol.** 2016.

6. DONG L, WANG YX, LI SL, YU GY, GAN YH, LI D, WANG CY. TGF β 1 promotes migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. **J Dent Res.** v 90, n 6, p 804-809, 2011.
7. DONG L, GE XI-YUAN, WANG YI-XIANG, YANG LIN-QIAN, LI SHENG-LIN, YU GUANG-YAN, GAO Y, FU JIA. Transforming growth factor- β and epithelial–mesenchymal transition are associated with pulmonary metastasis in adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol.** v 49, n11, p1051-8, 2013.
8. DONG, W. et al. Aberrant sonic hedgehog signaling pathway and STAT3 activation in papillary thyroid cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 7, p. 1786–1793, 2014.
9. DO TV, KUBBA LA, DU H, et al. Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor-beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition. **Mol Cancer Res.** v 6, p 695–705, 2008.
10. DUBERGÉ T, BÉNÉZERY K, RESBEUT M, AZRIA D, MINSAT M, ELLIS S, TEISSIER E, ZACCARIOTTO A, CHAMPETIER C, COWEN D. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: A retrospective series of 169 cases. **Cancer Radiother.** v 16, n 4, p 247-56, 2012.
11. DUCHESNE E, TREMBLAY MH, CÔTÉ, CH. Mast cell tryptase stimulates myoblast proliferation; a mechanism relying on protease-activated receptor-2 and cyclooxygenase-2. **BMC Musculoskelet Disord.**, v 12, p 235, 2011.
12. DULTRA, F., BARROS, A., SCHAEER-BARBOSA, H., FIGUEIREDO, A., GURGEL, C., RAMOS, E., CARVALHO, A., SANTOS, J. Immunohistochemical assessment of CD1a-positive Langerhans cells and their

- relationship with E-cadherin in minor salivary gland tumors. **J Oral Pathol Med.**; 2012.
13. EGEBLAD M, LITTLEPAGE LE, WERB Z. The fibroblastic coconspirator in cancer progression. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.** v. 70, 383-388,2005.
14. ELLIS GL, AUCLAIR PL. American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology (US). **Tumors of the salivary glands.** Washington, DC: American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology, 2008; xiii, 524.
15. EL-NAGAR, A.K.; HUVOS, A.G. Adenoid Cystic Carcinoma. In : Barnes, L., Everson, J.M., Reichart, P., Sidransky, D. **World Health Organization Classification of Tumours – Pathology and genetics of Head and Neck Tumours,** Lyon – IARC Press , p. 221-2,2005.
16. EPIVATIANOS A, ZARABOUKAS, POULOPOULOS, HARRISON JD. Immunohistochemical study of fibroblasts and mast cells in chronic submandibular sialadenitis. **Oral Dis.**, v14, p 259-263,2008
17. EUSTACE D, HAN X, GOODING R, ROWBOTTOM A, RICHES P, HEYDERMAN E. Interleukin-6 (IL-6) functions as an autocrine growth factor in cervical carcinomas in vitro. **Gynecol Oncol.** v 50, n 1, p 15-9, 1993.
18. EVANS, H.L., BATSAKIS, J.G. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary glands: a study of 14 cases of a distinctive neoplasm. **Cancer.** v. 53, p. 935-42, 1984.
19. EYDEN B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. **J Cell Mol Med.** v 12, p 22-37, 2008.

20. EYDEN B, MANERJEE SS, SHENJERE P, FISHER C. The myofibroblast and its tumors. **J Clin Pathol.** v 62, p 236-249, 2009.
21. FANG KC, WOLTERS PJ, STEINHOFF M, BIDGOL A, BLOUNT JL, CAUGHEY GH. Mast cell expression of gelatinases A and B is regulated by kit ligand and TGF-beta. **J Immunol.**, v 162, p 5528-35,1999.
22. FOMETE B, ADEBAYO ET, ONONIWU CN. Management of salivary gland tumors in a Nigerian tertiary institution. **Ann Afr Med.** v14, n3, p148-54,2015.
23. FORINO M, TORREGROSSA R, CEOL M et al. TGFbeta-1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture. **Int J Exp Pathol.** v 87, p 197-208, 2006.
24. FLEISCHMANN A, SCHLOMM T, KOLLERMANN J, SEKULIC N, HULAND H, MIRLACHER M, SAUTER G, SIMON R, ERBERSDOBLER A. Immunological microenvironment in prostate cancer: high mast cell densities are associated with favorable tumor characteristics and good prognosis.**Prostate.** v 69, n 9, p 976-81, 2009.
25. FLORENES VA, LU C, BHATTACHARYA N, et al. Interleukin-6dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. **Oncogene** v 18, p 1023-32, 1999.
26. FRANCO OE, SHAW A, STAND DW, HAYWARD SW.**Seminars in Cell & Developmental Biology.** V 21, p 33-39, 2010.
27. FUJIMOTO D, HIRONO Y, GOI T, KATAYAMA K, HIROSE K, YAMAGUCHI A.Expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in gastric cancer.**J Surg Oncol** v93, p139-44,2006.

28. FURUSE C, MIGUITA L, ROSA ACG, SOARES AB, MARTINEZ EF, ALTEMANI A, ARAUJO VC. Study of growth factors and receptors in carcinoma ex pleomorphic adenoma. **J Oral Pathology**. v 39, p 540-547, 2010.
29. GABBIANI G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol**. v 200, p 500–3, 2003
30. GALLO O, BANI D, TOCCAFONDI G, ALMERIGOGNA F, STORCHI OF. Characterization of a novel cell line from pleomorphic adenoma of the parotid gland with myoepithelial phenotype and producing interleukin-6 as an autocrine growth factor. **Cancer** .v 70, p 559–68, 1992.
31. GANDOUR-EDWARDS R, KAPADIA SB, GUMERLOCK PH, BARNES L. Immunolocalization of interleukin-6 in salivary gland tumors. **Hum Pathol**. v 26, p 501-503, 1995.
32. GIANNINI, P. J.; SHETTY, K. V.; HORAN, S. L.; REID, W. D.; LITCHMORE, L. L. Adenoid cystic carcinoma of the buccal vestibule: A case report and review of the literature. **Oral Oncol**, v. 42, p. 1029-1032, 2006.
33. GLOBA T, SAPTEFRȚI L, CEAUȘU RA, GAJE P, CIMPEAN AM, RAICA M. Mast cell phenotype in benign and malignant tumors of the prostate. **Pol J Pathol**. v 65, n 2, p 147-53, 2014.
34. GNEEP, D.R., CHEN, J.C., WARREN, C. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland. An immunohistochemical and clinicopathologic study. **Am J Surg Pathol**.; v. 12, p. 461-8, 1988.
35. GOMES, A. P, JOHANN, J. E, LOVATO, G. G, FERREIRA, A. M. Comparative analysis of the mast cell density in normal oral mucosa, actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Braz Dent J**. v. 19, n. 3, p. 186-9, 2008.

36. GOODE, R. K.; AUCLAIR, P. L.; ELLIS, G. L. Mucoepidermoid Carcinoma of the Major Salivary Glands: Clinical and Histopathologic Analysis of 234 Cases with Evaluation of Grading Criteria. **Cancer**, Washington, v. 82, n 7, p. 1217-24, 1998.
37. GONZÁLEZ-GARCÍA R; NAM-CHA SH; MUÑOZ-GUERRA MF; GAMALLO-AMAT C. Basal cell adenoma of the parotid gland. Case report and review of the literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v 11, n2, E206-9,2006.
38. GROBLEWSKA M, MROCZKO B, WERESZCZYŃSKA-SIEMIATKOWSKA U, KEDRA B, LUKASZEWICZ M, BANIUKIEWICZ A, SZMITKOWSKI M. Serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) levels in colorectal adenoma and cancer patients. **Clin Chem Lab Med**. v 46, p 1423–8, 2008.
39. GROBLEWSKA M, MROCZKO B, SOSNOWSKA D, SZMITKOWSKI M. Interleukin 6 and C-reactive protein in esophageal cancer. **Clin Chim Acta**. v 413,n 19-20, p 1583-90, 2012.
40. GUAN H, TAN J, ZHANG F, GAO L, BAI L, QI D, DONG H, ZHU L, LI X, LIU T. Myofibroblasts from salivary gland adenoid cystic carcinomas promote cancer invasion by MMP2 and CXCL12. **Histopathology**. v 66, n 6, p 781-90, 2014.
41. GUO F, JIAN XC, CHENG RX..Expression of TGF beta 1 and TGF beta RI proteins in tissues of salivary adenoid cystic carcinoma. **Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao**. v 27, n 3, p 229-32, 2002.
42. GUPTA N; BAL A; GUPTA AK; RAJWANSHI A. Basal cell adenoma: a diagnostic dilemma on fine needle aspiration cytology. **Diagn Cytopathol**. v 39, n 12, p 913-6, 201a.

43. GUPTA V, RAMANI P, CHANDRASEKAR. A clinico-pathological and immunohistochemical study of salivary gland tumours: A 5 year Indian experience. **Int J Oral Maxillofac Pathol** v3, p15-22, 2012b.
44. HARRIS M, AHMED A. The ultrastructure of tubular carcinoma of the breast. **J Pathol** . v 123, p79–83, 1977.
45. HEBDA PA, COLLINS MA, THARP MD. Mast cell and myofibroblast in wound healing. **Dermatol. Clin.**,v 11, p 685–696, 1993.
46. HEIKKILA K, EBRAHIM S, LAWLOR DA. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. **Eur J Cancer**. v 44, p 937–945,2008.
47. HELLE M, BRAKENHOFF JP, DE GROOT ER, AARDEN LA. Interleukin-6 is involved in in-terleukin 1-induced activities. **Eur J Immunol**. v 18, p 957–9,1988.
48. HELLE M, BOEIJE L, PASCUAL-SALCEDO D, AARDEN L. Differential induction of interleukin-6 production by monocytes, endothelial cells and smooth muscle cells. **Prog Clin Biol Res**. v 367, p 61–71, 1991.
49. HERZOG EL, BUCALA R. Fibrocytes in health and disease. **Exp Hematol.**, v 38, n 7, p 548-56, 2010.
50. HOEJBERG L, BASTHOLT L, SCHMIDT H. Interleukin-6 and melanoma. **Melanoma Res** v 22, p 327–33, 2012.
51. HÖLZEL M, LANDSBERG J, GLODDE N, BALD T, ROGAVA M, RIESENBERG S, BECKER A,JÖNSSON G, TÜTING T. A Preclinical Model of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor-like Melanoma Is Characterized by Infiltrating Mast Cells. **Cancer Res**. v 76, n 2, p 251-63, 2016.

52. HU, M; PELUFFO, G; CHEN, H; GELMAN, R; SCHNITT, S; POLYAK, K.
Role of cox-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. **Proc Natl Acad Sci USA** v 106, p 3372-3377,2009.
53. HUGO HJ, LEBRET S, TOMASKOVIC-CROOK E, AHMED N, BLICK T, NEWGREEN DF, THOMPSON EW, ACKLAND ML. Contribution Fibroblast and Mast Cell (Afferent) and Tumor (Efferent) IL-6 Effects within the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenviron** v 5, n1, p 83-93, 2012.
54. HUGO H, ACKLAND ML, BLICK T, LAWRENCE MG, CLEMENTS JA, WILLIAMS ED et al Epithelial–mesenchymal and mesenchymal– epithelial transitions in carcinoma progression. **J Cell Physiol** v 213, p 374–383, 2007.
55. HWANG, YS; PARK, K K; CHUNG, WY. Stromal transforming growth factor-beta 1 is crucial for reinforcing the invasive potential of low invasive cancer. **Archives of oral biology**. v 29, p 687 – 94 , 2014.
56. IEZZI G, PIATTELLI A, RUBINI C, ARTESE L, GOTERI G, PERROTTI V, CARINCI F.Expression of transforming growth factor beta1 in ameloblastomas.**J Craniofac Surg**.v 19,n 6,p 1618-21, 2008.
57. IKEDA O, EGAMI H, ISHIKO T, et al. Expression of proteinase activated receptor-2 in human pancreatic cancer: a possible relation to cancer invasion and induction of fibrosis. **Int J Oncol** v 22, p 295-300, 2003.
- INOUE T, PLIETH D, VENKOV CD, XU C, NEILSON EG. Antibodies against macrophages that overlap in specificity with fibroblasts. **Kidney Int** v 67, p 2488, 2005.

58. JAAFARI-ASHKAVANDI Z, ASHRAF MJ. Increased mast cell counts in benign and malignant salivary gland tumors. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.** v8, n1, p15-20, 2014.
59. JABER, M. A. Intraoral minor salivary gland tumors: a review of 75 cases in a Libyan population. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**,v. 35, p. 150–154, 2006.
60. JANG M; PARK D; LEE SR; HAHM CK; KIM Y; KIM Y; PARK CK; TAE K; PARK MH; PARK YW. Basal cell adenoma in the parotid gland: CT and MR findings. **AJNR Am J Neuroradiol.** v 25, n 4, p 631-5,2004.
61. JAYARAJ G; SHERLIN HJ, RAMANI P; PREMKUMAR P; NATESAN A. Stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Indian J Cancer.* v52, n1, p87-92, 2015.
62. JOHANSSON A, RUDOLFSSON S, HAMMARSTEN P, HALIN S,PIETRAS K, JONES J, STTATIN P, EGEVAD L, GRANFORS T, WIKSTROM P, BERGH A. Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. **Am J Pathol.** v 177, p 1031-1041, 2010.
63. KANAUIA SK, SINGH A, NAUTIYAL S, ASHUTOSH K. Basal Cell Adenoma of Parotid Gland: Case Report and Review of Literature. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.** v 67, n4, p430-3, 2015.
64. KALLURI R, NEILSON EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest.** v 112, p 1776–84, 2003.
65. KAUFMANN R, HOLLENBERG MD. Proteinase-Activated Receptors (PARs) and Calcium Signaling in Cancer. **Adv Exp Med Biol.** v. 740, p 979-1000, 2012.

66. KELLERMAN MG, SOBRAL LM, DA SILVA SD, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**. v 51,p 849–53, 2007.
67. KHAN, A. J.; DIGIOVANNA, M. P.; ROSS, D. A.; SASAKI, C. T.; CARTER, D.; SON, Y. H.; HAFFTY, B. G. Adenoid Cystic Carcinoma: A Retrospective Clinical Review. **Int. J. Cancer**, v. 96, p. 149–158, 2001.
68. KIM DK, OH SY, KWON HC, LEE S, KWON KA, KIM BG, KIM SG, KIM SH, JANG JS, KIM MC, KIM KH, HAN JY, KIM HJ. Clinical significances of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in operable gastric cancer. **BMC Cancer**. v 9, p 155–63,2009.
69. KISHIMOTO T. Interleukin-6: discovery of pleiotropic cytokine. **Arthritis Res Ther** v 573, p 8:S2, 2006.
70. KUNZ-SCHUGHART LA, KNUECHEL R. Tumor-associated fibroblasts. Part I. Active stromal participants in tumor development and progression? **Histol Histopathol** v 17, n 25, p 599-621, 2002.
71. KRISHNAMURTHY, VAIDHYANATHAN e MAJHI. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the parotid gland. **J Cancer Res Ther**. v7, n 1, p 84-7, 2011.
72. KULARATHNA PK, PAGEL CN, MACKIE EJ. Tumour progression and cancer-induced pain: a role for protease-activated receptor-2? **Int J Biochem Cell Biol**. v 57, p 149-56, 2014.
73. LINGAM, R. K.; DAGHIR, A. A.; NIGAR, E.; ABBAS, S. A.; KUMAR, M. Pleomorphic adenoma (benign mixed tumour) of the salivary glands: its diverse clinical, radiological, and histopathological presentation. **Br J Oral Maxillofac Surg**. v. 49:14-20. 2009.

74. LOYOLA, AM; ARAÚJO VC; SOUSA, SOM. Ausência de diferenciação mioepitelial em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares menores. **J Bras Patol.** v35, n 4,p 190-194,1999.
75. LU C, VICKERS MF, KERBEL RS. Interleukin 6: a fibroblast derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. **Proc Natl AcadSci U S A** v 89, p 9215–9, 1992.
76. LUKSIC I, VIRAG M, MANOJLOVIC A, MACAN D. Salivary gland tumors: 25 years of experience from a single institution in Croatia. **J Craniomaxillofac Surg.** v 40, n 3, p 75-81, 2012.
77. LUKŠIĆ, I. et al. Intraoral adenoid cystic carcinoma: is the presence of perineural invasion associated with the size of the primary tumour, local extension, surgical margins, distant metastases, and outcome? **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery.** v. 52, n. 3, p. 214–8, mar. 2014.
78. LUNA, M.A., BATSAKIS, J.G., ORDONEZ, N.G., MACKAY, B., TORTOLEDO, M.E. Salivary gland adenocarcinomas: a clinicopathologic analysis of three distinctive types. **Semin Diagn Pathol.**; v.4, p. 117-35, 1987.
79. LUNA, M. A. Salivary Mucoepidermoid Carcinoma: Revisited. **Adv Anat Pathol**, v. 13, n. 6, p. 293-307, Nov. 2006.
80. LEWIS MP, LYGOE KA, NYSTROM ML, et al. Tumourderived TGF-beta1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/ SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. **Br J Cancer.** v 90, p 822–32, 2004.
81. LIDFELDT J, BENDAHL PO, FORSARE C, MALMSTRÖM P, FERNÖ M, BELTING M. Protease. Activated Receptors 1 and 2 Correlate Differently with Breast Cancer Aggressiveness Depending on Tumor ER Status. **PLoS One.**v 10, n 8, p e0134932, 2015.

82. MA Y, ULLRICH SE. Intratumoral mast cells promote the growth of pancreatic cancer. **Oncoimmunology** v 2, n10, p e25964, 2013.
83. MALFETTONE A, SILVESTRIS N, SAPONARO C, et al. High density of tryptase-positive mast cells in human colorectal cancer: a poor prognostic factor related to protease-activated receptor 2 expression. **J Cell Mol Med.** v 17, n 8, p 1025-37, 2013.
84. MALTBY S, KHAZAIE K, MCNAGNY K. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immunomodulation. **Biochim Biophys Acta**, v 1796, p 19–26, 2009.
85. MANGIA A, MALFETTONE A, ROSSI R, PARADISO A, RANIERI G, SIMONE G, RESTA L. Tissue remodeling in breast cancer: human mast cell tryptase as an initiator of myofibroblast differentiation. **Histopathol.**, v 58, p 1096-1106, 2011.
86. MARCOS, J. A. G.; CALDERÓN-POLANCO, J. C.; POBLET, E.; VERA, J. L.; ARROYO-RODRÍGUEZ, S.; GALDEANO-ARENAS, M.; DEAN-FERRER, A. Primary Adenoid Cystic Carcinoma of the Mandible: Case Report and Review of the Literature. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, p. 2609-2615, 2008.
87. MARECH I, AMMENDOLA M, SACCO R, CAPRIUOLO GS, PATRUNO R, RUBINI R, LUPOSELLAM, ZUCCALÀ V, SAVINO E, GADALETA CD, RIBATTI D, RANIERI G. Serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density evaluation in early breast cancer patients: possible translational significance. **BMC Cancer.** v 24, n14, p534, 2014.
88. MASSAGUÉ J, SEOANE J, WOTTON D. Smad transcription factors. **Genes Dev.** v 119, n 23, p 2783-810, 2005.

89. MCHUGH, J. B.; VISSCHER, D. W.; BARNES, E. L. Update on selected salivary gland neoplasms. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 133, n. 11, p. 1763-74, 2009.
90. MCHUGH CH, ROBERTS DB, EL-NAGGAR AK, HANNA EY, GARDEN AS, KIES MS, WEBER RS, KUPFERMAN ME. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. **Cancer**. V118, n16, p 3928-36, 2012.
91. MCLARTY JL, MELÉNDEZ GC, BROWER GL, JANICKI JS, LEVICK SP. Tryptase/Protease Activated Receptor 2 Interactions Induce Selective Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Collagen Synthesis by Cardiac Fibroblasts. **Hypertension**, v 58, p 264-70, 2011.
92. MENDENHALL, W. M.; MENDENHALL, C. M.; WERNING, J. W.; MALYAPA, R. S.; MENDENHALL, N. P. Salivary Gland Pleomorphic Adenoma. *Am J Clin Oncol*, Gainesville, v. 31, n. 1, p. 95-99, Feb. 2008.
93. METZ CN. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. **Cell Mol Life Sci.**, v 60, n 7, p 1342-50, 2003.
94. MICHAILEDIOU, E. Z.; MARKOPOULOS, A. K.; ANTONIADES, D. Z. Mast cells and angiogenesis in oral malignant and premalignant lesions. **Open Dent J.**, Grécia, v. 28, n. 2, p. 126-32, 2008.
95. MICHL P, RAMJAUN AR, PARDO OE, et al. CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. **Cancer Cell**. v 7, p 521-32, 2005.
96. MIGUITA L, MARTINEZ EF, ARAUJO NS, ARAUJO VC. FGF-2, TGFβ1, PDGF-A and respective receptors expression in pleomorphic adenoma

- myoepithelial cells: as in vivo and in vitro study. **J Appl Oral Sci.** v 18, n1, p 83-91, 2010.
97. MILLS, S.E., GARLAND, T.A., ALLEN JR., M.R. Low-grade papillary adenocarcinoma of palatal salivary gland origin. **Am J Surg Pathol.**; v.8, p. 367-74, 1984.
98. MOCHIZUKI D, ADAMS A, WARNER KA, ZHANG Z, PEARSON AT, MISAWA K, MCLEAN SA, WOLF GT, NÖR JE. Anti-tumor effect of inhibition of IL-6 signaling in mucoepidermoid carcinoma. **Oncotarget.** v 6, n 26, p 22822-35, 2015.
99. MOJTAHEDI Z, KHADEMI B, HASHEMI SB, ABTAHI SMB, GHASEMI MA, FATTAHI MJ, GHADERI A. Serum Interleukin-6 Concentration, but not Interleukin-18, is associated with head and neck squamous cell carcinoma progression. **Pathol Oncol Res.** v 17, p 7-10, 2011.
100. MOSKALUK, C. A. Adenoid cystic carcinoma: clinical and molecular features. **Head and Neck Pathology**, v. 7, n. 1, p. 17–22, mar. 2013.
101. MROCZKO B, GROBLEWSKA M, GRYKO M, KĘDRA B, SZMITKOWSKI M. Diagnostic usefulness of serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in the differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. **J Clin Lab Anal.** v 24, p 256–61, 2010.
102. MUKAI, M; SADAHIRO, S; TOKUNAGA, N, et al: The expression of MMP-2 and TIMP-2 in patients with colorectal adenocarcinoma invaded to the submucosal and proper muscle layer. **Oncol Rep** v 5, p 335-340, 1998.
103. MURRAY DB, MCLARTY-WILLIAMS J, NAGALLA KT, JANICKI JS. Tryptase activates isolated adult cardiac fibroblasts via protease activated receptor-2 (PAR-2). **J Cell Commun. Signal.**, v 6, p 45-51, 2012.

104. NAGAO K; MATSUZAKI O; SAIGA H; SUGANO I; SHIGEMATSU H; KANEKO T, et al. Histopathologic studies of basal cell adenoma of the parotid gland. **Cancer.** v 50, p 736-45, 1982.
105. NAGAO T, SATO E, INOUE R, OSHIRO H, TAKAHASHI RH, NAGAI T, et al. Immunohistochemical Analysis of Salivary Gland Tumours: Application for Surgical Pathology Practice. **Acta Histochem Cytochem.** v 45, p 269–82, 2012.
106. NAUGLER WE, KARIN M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends Mol Med** v 14, p 109–19, 2008.
107. NEGRIER S, PEROL D, MENETRIER-CAUX C, ESCUDIER B, PALLARDY M, RAVAUD A, DOUILLARD JY, CHEVREAU C, LASSET C, BLAY JY; GROUPE FRANCAIS D'IMMUNOTHERAPIE. Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6. **J Clin Oncol.** v 23, p 1044–5, 2005.
108. NGUYEN, M., LEE, M.C., WANG, J. L., TOMLINSON, J.S., SHAO, Z.M., ALPAUGH, M.L., BARSKY, S.H. The human myoepithelial cell displays a multifaceted anti-angiogenic phenotype. **Oncogene** .; v. 19, p. 3449-59, 2000.
109. NICOLATOU, O, KAKARANTZA-ANGELOPOULOS, E, ANGELOPOULOS, A.P, ANGELOPOULOS, S. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the palate: report of a case with electron microscopy. **J Oral Maxillofac Surg.**; v.46, p. 1008-13, 1988.
110. NIELSEN BS, RANK F, LOPEZ JM, BALBIN M, VIZOSO F, LUND LR, DANO K, LOPEZ-OTIN C. Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. **Cancer Res.** v 61, p 7091, 2001.

111. NIKAI, H., EL-BARDAIE, A.M., TAKATA, T., OGAWA, I., IJUHIN, N. Histologic evaluation of myoepithelial participation in salivary gland tumors. **Int. J. Oral Maxillofac Surg.**; v. 15, p. 597-605, 1986.
112. NOEL A, JOST M, MAQUOI E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. **Semin Cell Dev Biol.**, v 19, p 52-60, 2008.
113. NORBERG, L.E., BURFORD-MASON, A.P., DARDICK, I. Cellular differentiation and morphologic heterogeneity in polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland. **J Oral Pathol.**; v. 20, p. 373-9, 1991.
114. NORRBY, K. Mast cells and angiogenesis. **APMIS.** v. 110, n, 5, p. 355-71, 2002.
115. ORIMO A, WEINBERG RA. Stromal fibroblasts in cancer. A novel tumor-promoting cell type. **Cell Cycle** . v 5, p 1597–601, 2006.
116. ORIMO, A; GUPTA, PB; SGROI, DC et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated sdf-1/cxcl12 secretion. **Cell** v121, p 335-348, 2005.
117. OYANAGI J, KOJIMA N, SATO H, HIGASHI S, KIKUCHI K, SAKAI K, MATSUMOTO K, MIYAZAK K. Inhibition of transforming growth factor- β signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. **Experimental Cell Research.** v 326, p 267–279, 2014.
118. OZDEMIR O. The role of mast cell density in tumor-associated angiogenesis and survival of squamous cell carcinoma of the lung. **J Cancer Res Ther.** v 11, n 4, p 1041, 2015
119. PASCHE B. Role of transforming growth factor beta in cancer. **J Cell Physiol** v 186, p 153–68, 2001.

120. PATEL TD, VAZQUEZ A, MARCHIANO E, PARK RC, BAREDES S, ELOY JA. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the head and neck: A population-based study of 460 cases. **Laryngoscope**. v 125, n7, p 1644-9, 2015.
121. PINTOR, M. F.; FIGUEROA, L.; MARTÍNEZ, B. Polymorphous low grade adenocarcinoma: Review and case report. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 12, n. 8, p. 549-51, 2007.
122. QUDDUS, M.R., HENLEY, J.D., AFFIFY, A.M., DARDICK, I., GNEPP, D.R. Basal cell adenocarcinoma of the salivary gland: an ultrastructural and immunohistochemical study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**; v. 87, p. 485-492, 1999.
123. RADISKY DC, KENNY PA, BISSELL MJ. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? **J Cell Biochem**. v 101, p 830–9, 2007.
124. RADWAN-OCZKO M, BORATYŃSKA M, ZIETEK M, ZOŁEDZIEWSKA M, JONKISZ A. The relationship of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism, its plasma level, and gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens. **J Periodontol**. v.77, p.865-73, 2006.
125. RANGANATHAN P, AGRAWAL A, BLUSHAN et al. Expression profiling of genes by TGFβ: differential regulation in normal and tumor cells. **BMC Genomics**. v 8, p 98, 2007.
126. RAPIDIS, A. D. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. **Oral Oncology**, v. 41, n. 3, p. 328–35, mar. 2005

127. RAPIDIS, A. D.; GIVALOS, N.; GAKIOPOULOU, H.; STAVRIANOS, S. D.; FARATZIS, G.; LAGOIANNIS, G. A.; KATSILIERIS, I.; PATSOURIS, E. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. **Oral Oncol** v. 43, n. 2, p. 130-136, 2006.
128. RAVISHANKARAN P, KARUNANITHI R. Clinical significance of preoperative serum interleukin- 6 and C-reactive protein level in breast cancer patients. **World J Surg Oncol.** v 9, p 18–23,2011.
129. RAY A, TATTER SB, SANTHANAM U, HELFGOTT DC, MAY LT, SEHGAL PB. Regulation of expression of interleukin-6.Molecular and clinical studies. **Ann N Y Acad Sci.** v 557, p 353-61, 1989.
130. RIBATTI D, CRIVELLATO E. The controversial role of mast cells in tumor growth. **Int Rev Cell Mol Biol.**, v 275, p 89–131, 2009.
131. RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E.; MOLICA, S. Mast cells and angiogenesis in haematological malignancies. **Leuk Res.** v. 33, n. 7, p. 876-9, 2009.
132. ROCHE WR. The nature and significance of tumor-associated mast cells. **J Pathol.**,v 148, p 175- 82,1986.
133. ROJAS, I. G.; SPENCER, M. L.; MARTÍNEZ, A.; MAURELIA, M, A.; RUDOLPH, M. I. Characterization of mast cell subpopulations in lip cancer. **J Oral Pathol Med.** v. 34, n. 5, p.268-73, 2005.
134. RUÍZ-GODOY, L.; SUÁREZ, L.; MOSQUEDA, A.; MENESES, A. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the parotid gland: Case report and review of the literature. **Med Oral Patol Or Oral Cir Bucal,** v. 12, p. 30-3, 2007.

- 135.SANCHEZ-HERNANDEZ PE, RAMIREZ-DUENAS MG, ALBARRAN-SOMOZA B,et al. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in cervical cancer proliferation. **Gynecol Oncol** v108, p19-26, 2008.
- 136.SANTIAGO JJ, DANGERFIELD AL, RATTAN SG, BATHE KL, CUNNINGTON RH, RAIZMAN JE, BEDOSKY KM, FREED DH, KARDAMI E, DIXON IM. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. **Dev Dyn** . v 239,p 1573-1584, 2010.
- 137.SARRAZY V, BILLET F, MICALLEF L, COULOMB B, DESMOULIÈRE A.Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments.**Wound Repair Regen**. v19 ,Suppl 1:s10-5, 2011.
- 138.SEEMAYER TA, LAGACE´ R, SCHU´RCH W, et al. Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma. A possible host response to neoplasia. **Am J Surg Pathol**. v 3,p 525–33, 1979.
139. SEETHALA, R.R., HUNT, J.L., BALOCH, Z.W., LIVOLSI, V.A., BARNES, E.L. Adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation: a report of 11 cases and a review of the literature. **Am J Surgical Pathol**, v. 31, p. 1683-1694, 2007.
140. SHEN, C. et al. Treatment outcomes and prognostic features in adenoid cystic carcinoma originated from the head and neck. **Oral Oncology**, v. 48, n. 5, p. 445–9, maio 2012.
141. SHIN DY, JANG KS, KIM BY, CHOI JE, YOON H, KO YH, JEONG HS. Comparison of adenoid cystic carcinomas arising from the parotid gland vs. the submandibular gland: focus on systemic metastasis and tumor-associated blood vessels. **J Oral Pathol Med**. v 43, n 6, p441-7, 2014.

142. SLOOTWEG, P.L., MULLER, H. Low-grade adenocarcinoma of the oral cavity. A comparison between the terminal duct and the papillary type. **J Cranio-Max-Fac Surg.**; v. 15, p. 359-64, 1987.
143. SOARES, E. C. S.; FILHO, F. P. C.; COSTA, F. W. G.; VIEIRA, A. C. M. J.; ALVES, A. P. N. N. Adenoid cystic carcinoma of the tongue: Case report and literature review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 13, n. 8, p. 475-8, 2008.
144. SOARES, A. B.; ARAÚJO, V. C.; JULIANO, P. B.; ALTEMANI, A. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. **J Oral Pathol Med**. v. 38, n. 8, p. 623-629, 2009.
145. SOBRAL AP, LODUCCA SV, NUNES FD, DE ARAÚJO NS, KOWALSKI LP, DE ARAÚJO VC. Relationship between major and minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma malignancy grading and presence of stromal myofibroblasts: immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med**. v 33, n 6, p 335-9, 2004.
146. SOBRAL LM, ZECCHIN KG, AQUINO SN, LOPES MA, GRANER E, COLETTA RD. Isolation and characterization of myofibroblast cell lines from oral squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**. v 25, n 4, p 1013-20, 2011a.
147. SOBRAL LM, BUFALINO A, LOPES MA, GRANER E, SALO T, COLETTA RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. **Oral Oncol**. v 47, n9, p 840-6, 2011b.
148. SOUSA-NETO ES, CANGUSSU MC, GURGEL CA, GUIMARÃES VS, RAMOS EA, XAVIER FC, CURY PR, CARNEIRO JÚNIOR B, LEONARDI R, DOS SANTOS JN. Interaction of stromal and microvascular components in keratocystic odontogenic tumors. **J Oral Pathol Med**. 2016 (article in press).

149. STENMAN, G.; PERSSON, F.; ANDERSSON, M. K. Diagnostic and therapeutic implications of new molecular biomarkers in salivary gland cancers. **Oral Oncology**, v. 50, n. 8, p. 683–90, ago. 2014.
150. STROUCH MJ, CHEON EC, SALABAT MR, KRANTZ SB, GOUNARIS E, MELSTROM LG, DANGI-GARIMELLA S, WANG E, MUNSHI HG, KHAZAIE K, BENTREM DJ. Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. **Clin Cancer Res.**, v 16, p 2257-65, 2010.
151. SULLIVAN NJ, SASSER AK, AXEL AE, VESUNA F, RAMAN V, RAMIREZ N, OBERYSZYN TM, HALL BM. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. **Oncogene**, v 28, p 2940–2947, 2009.
152. SUROWIAK P, MURAWA D, MATERNA V, et al. Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. **Anticancer Res.** v 27, p 2917–24, 2007.
153. SUZUKI S, ICHIKAWA Y, NAKAGAWA K, KUMAMOTO T, MORI R, MATSUYAMA R, TAKEDA K, OTA M, TANAKA K, TAMURA T, ENDO I. High infiltration of mast cells positive to tryptase predicts worse outcome following resection of colorectal liver metastases. **BMC Cancer.** v 4, n 15, p840, 2015.
154. TAKEDA, Y. Malignant myoepithelioma of minor salivary gland origin. **Acta Pathol.**; v.42, p. 518-22, 1992.
155. TANG L, JENNINGS TA, EATON JW. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. **Proc Natl Acad Sci**, v 95, n 15, p 8841-6, 1998.

156. TARSITANO, A. et al. Metastasizing “benign” pleomorphic salivary adenoma: A dramatic case-report and literature review. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, p. 1–4, 14 jan. 2014.
157. THEOHARIDES TC, CONTI P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. **Trends Immunol.**,v 25, p 235–241,2004.
- 158.THODE C, JØRGENSEN TG, DABELSTEEN E, MACKENZIE I, DABELSTEEN S. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.** v 40, n 3,p 201-7, 2011.
159. TOMITA M, MATSUZAKI Y, ONITSUKA T. Correlation between mast cells and survival rates in patients with pulmonary adenocarcinoma. **Lung Cancer.**, v 26, p 103-8,1999.
160. TRIANTAFILLIDOU, K. et al. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. **Oral Diseases**, v. 12, n. 4, p. 364–70, jul. 2006a.
161. TRIANTAFILLIDOU, K.; DIMITRAKOPOULOS, J.; IORDANIDIS, F.; KOUFOGIANNIS, D. Management of Adenoid Cystic Carcinoma of Minor Salivary Glands. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 64, p. 1114-1120, 2006b.
162. TROSMAN, S. et al. Unknown primary mucoepidermoid carcinoma: Diagnosis and treatment. **Head & Neck**, v. 9409, n. 216, p. E22-25, maio 2014.
- 163.TSUSHIMA, H; KAWATA, S; TAMURA, S; ITO, N; SHIRAI, Y; KISO, S, et al. High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. **Gastroenterology.** v. 110, n. 2, p 375–82,1996.

164. VAIDYA AD, PANTVAIDYA GH, METGUDMATH R, KANE SV, D'CRUZ AK. Minor salivary gland tumors of the oral cavity: a case series with review of literature. **J Cancer Res Ther.** v 8, suppl 1; S111-5, 2012.
165. VAKKILA J, LOTZE M. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Nat Rev Immunol.** v 4, p 641–8, 2004.
166. VANMEIR E, SAWAMURA Y, DISERENS AC, HAMOUMF, de TRIBOLET N. Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro. **Cancer Res.** v 50, p 6683–8, 1990.
167. VARGHESE, B. T.; SEBASTIAN, P.; ABRAHAM, E. K.; MATHEWS, A. Pleomorphic adenoma of minor salivary gland in the parapharyngeal space. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 1, n. 2, 2003.
168. VASCONCELOS AC, FELIPE N, MEURER L, SALVADORI G, SOUZA LB, VARGAS PA, MARTINS MD. Clinicopathological analysis of salivary gland tumors over a 15-year period. **Braz Oral Res.** v 30, n 1, 2016.
169. VIDAL MT, DE OLIVEIRA ARAÚJO IB, GURGEL CA, PEREIRA FDE A, VILAS-BÔAS DS, RAMOS EA, AGRA IM, BARROS AC, FREITAS VS, DOS SANTOS JN. Density of mast cells and microvessels in minor salivary gland tumors. **Tumour Biol.** v 34, n 1, p 309-16, 2013.
170. VIDYALAKSHMI, S.; ARAVINDHAN, R. Adenoid cystic carcinoma of the buccal mucosa: a case report with review of literature. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 8, n. 3, p. 266–8, 2014.
171. WANG J, CHEN J, ZHAND K, ZHAO Y, NOR JE, WU J. TGFβ1 regulates the invasive and metastatic potencial of mucoepidermoid carcinoma cells. **J Oral Pathol Med.** V 40, p 762-768, 2011.

172. WANG, J; YING, G; WANG, J et al. Characterization of phosphoglycerate kinase-1 expression of stromal cells derived from tumor microenvironment in prostate cancer progression. **Cancer Res** v 70, p 471-480, 2010.
173. WANG YF, MA SR, WANG WM, HUANG CF, ZHAO ZL, LIU B, ZHANG WF, ZHAO YF, ZHANG L, SUN ZJ .Inhibition of survivin reduces HIF-1 α , TGF- β 1 and TFE3 in salivary adenoid cystic carcinoma. **PLoS One.** v 9, n 12:e114051,2014.
174. WANG XD, MENG LJ, HOU TT, ZHENG C, HUANG SH. Frequency and distribution pattern of minor salivary gland tumors in a northeastern Chinese population: a retrospective study of 485 patients. **J Oral Maxillofac Surg.** v 73, n 1, p 81-9,2015.
175. WASIUK A, DE VRIES VC, HARTMANN K, ROERS A, NOELLE RJ. Mast cells as regulator of adaptive immunity response. **Clin Exp Immunol.** v 155, n 2, p 140-6, 2009.
176. WATANABE SI, MIYATA Y, MATSUO T, MOCHIZUKI Y, NISHIKIDO M, HAYASHI T, SAKAI H. High density of tryptase-positive mast cells in patients with renal cell carcinoma on hemodialysis: correlation with expression of stem cell factor and protease activated receptor-2. **Hum Pathol.**, v 43, n 6, p 888-97,2012.
177. WEI, Q. et al. IMP3 expression is associated with poor survival in cervical squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, v. 45, n. 11, p. 2218-24, jul. 2014.
178. WIKSTROM P, STATTIN P, FRANCK-LISSBRANT I, DAMBER JE, BERGH A. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis: metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. **Prostate.** v 37, n1, p 19-29, 1998.

179. WILLIS BC, DU BOIS RM, BOROK Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. **Proc Am Thorac Soc** 2006; 3:377–82.
180. WILSON SR, GALLAGHER S, WARPEHA K, HAWTHORNE SJ. Amplification of MMP-2 and MMP-9 production by prostate cancer cell lines via activation of protease-activated receptors. **Prostate** v60, p168-74, 2004.
181. WIPFF PJ, RIFKIN DB, MEISTER JJ, HINZ B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. **J Cell Biol.** v 179, n 6, p 1311-23, 2007.
182. WOJTUKIEWICZ MZ, HEMPEL D, SIERKO E, TUCKER SC, HONN KV. Protease-activated receptors (PARs)--biology and role in cancer invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev.** v 34, n4, p 775-96, 2015.
183. XIE L, DUAN Z, LIU C, ZHENG Y, ZHOU J. Protease-activated receptor 2 agonist increases cell proliferation and invasion of human pancreatic cancer cells. **Exp Ther Med.** v 9, n1, p 239-244, 2015.
184. YADAV AB; NARWAL A; DEVI A; KUMAR S; YADAV SK . Basal Cell Adenoma of Palate, a Rare Occurrence with Review of Literature. **J Dent (Shiraz).** v16, n3, p 291-5, 2015.
185. YAN, R. et al. Suppression of growth and migration by blocking the Hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells. **Cellular Oncology**, v. 36, n. 5, p. 421–35, out. 2013.
186. YOSHII M, JIKUHARA A, MORI S, IWAGAKI H, TAKAHASHI HK, NISHIBORI M, TANAKA N. Mast cell tryptase stimulates DLD-1 carcinoma through prostaglandin- and MAP kinase-dependent manners. **J Pharmacol Sci.**, v 98, p 450-8, 2005.

187. XIANG, M.; GU, Y.; ZHAO, F.; LU, H.; CHEN, S.; YIN, L. Mast cell tryptase promotes breast cancer migration and invasion. **Oncol Rep.** v. 23, n. 3, p. 615-9, 2010.
188. XING F, SAIDOU J, WATABE K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. **Front Biosci.** v 15, p 166-179, 2011.
189. ZAKRZEWSKA I, POZAŃSKI J. Changes of serum IL-6 and CRP after chemotherapy in patients with ovarian carcinoma. **Pol Merkuriusz Lek.** v 11, p 210–3, 2011.
190. ZARBO RJ. Salivary Gland Neoplasia: A Review for the Practicing Pathologist. **Modern Pathology.** v 15, p 298-323,2002.
- 191.ZHANG, W; MATRISIAN, LM; HOLMBECK, K; VICK, CC; ROSENTHAL, EL. Fibroblast-derived mt1-mmp promotes tumor progression in vitro and in vivo. **BMC Cancer** v 6, p 52, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

Tumor	Caso	Tipo Histológico	Sexo	Idade	Localização	Tamanho
AP	3228/10	-	F	55	submandibular	não disp
AP	8727/10	-	F	31	parótida	não disp
AP	1322/10	-	F	45	submandibular	não disp
AP	1952/06	-	M	57	submandibular	não disp
AP	6590/00	-	M	21	palato mole	3cm
AP	1168/10	-	F	21	parótida	não disp
AP	1648/98	-	F	23	palato duro	4 cm
AP	2300/11	-	F	45	palato mole	não disp
AP	10704/10	-	M	28	parótida	não disp
AP	4689/11	-	F	67	parótida	5,5x3,5x2cm
AB	415/05	-	M	não disp	língua	0,5cm
AB	413/08	-	F	71	parótida	2,6x2,5cm
AB	1049/98	-	F	53	parótida	2x1,7cm
AB	3236/11	-	F	80	parótida	6x5x2,5cm
AB	10106/10	-	F	55	parótida	não disp
AB	8839/11	-	M	76	parótida	2,5x1,6x1,5cm
AB	4350/08	-	M	40	parótida	não disp
AB	494/10	-	F	57	parótida	não disp
AB	13458/10	-	F	68	parótida	não disp
APBG	7283/99	-	F	34	gengiva sup	3cm
APBG	3014/06	-	F	49	submandibular	0,8cm
APBG	1998/04	-	F	73	língua	4x3x1,2cm
APBG	665/01	-	F	62	palato	3,5cm
APBG	4138/03	-	F	37	palato mole	3cm
APBG	4178/05	-	M	74	palato	6cm
APBG	5944/97	-	M	60	palato duro	1x1cm
APBG	6464/05	-	M	57	palato duro	1,8cm
APBG	7698/10	-	F	45	palato duro	não disp
APBG	1099/11	-	F	63	palato	4,2x3,4x2,2cm
CAC	7705/10	cribriforme	M	73	submandibular	não disp
CAC	3084/11	cribriforme	M	60	não disp	2,5x1,8x1,5cm
CAC	4175/11	cribriforme	M	47	gengiva	3,7x3,2x2,6cm
CAC	13285/10	cribriforme	M	47	não disp	não disp
CAC	6491/08	Sólido	M	78	parótida	4,5x3x2,7 cm
CAC	9469/11	cribriforme	M	59	lábio sup	3,9x2,7x1,4cm
CAC	2532/10	cribriforme	F	34	parótida	não disp
CAC	8156/10	cribriforme	F	33	parótida	não disp
CAC	6929/10	cribriforme	M	59	não disp	não disp
CAC	1550/11	cribriforme	M	41	mucosa jugal	não disp
CME	9842/05	intermediário	F	33	parótida	10x9,5x3,5cm
CME	4037/10	baixo	F	40	palato	não disp

CME	10946/09	baixo	F	Não disp	Não disp	não disp
CME	3884/06	baixo	F	51	parótida	6,5x4,5x3cm
CME	3974/04	baixo	F	20	submandibular	4,4x3,2x2cm
CME	547/03	baixo	M	48	parótida	6,5x5x3,5cm
CME	7091/04	intermediário	M	22	parótida	6,5x5,5x5cm
CME	1216/04	baixo	F	71	palato	1cm
CME	2948/04	alto	M	31	parótida	4,5x3,5x3,2cm
CME	11348/06	intermediário	F	Não disp	Não disp	não disp
CME	3380/12	Intermediário	F	35	língua	4,5x3x2,3cm
CME	3645/06	baixo	F	78	submandibular	3,5x2x1,5cm
CME	5434/06	alto	M	44	submandibular	11,5x5x2cm
CME	4363/12	baixo	F	35	língua	4,5x3x2,3cm

ANEXO 2. Tabela de escores de intensidade de marcação, de porcentagem de marcação e de índice de marcação.

ESCORE	INTENSIDADE DE MARCAÇÃO
0	Sem coloração
1	Fraca/Discreta
2	Moderada
3	Intensa

ESCORE	PORCENTAGEM DE MARCAÇÃO
0	0-10%
1	11-25%
2	26-50%
3	51-75%
4	76-100%

Intensidade de Marcação X Porcentagem de Marcação=Índice de Marcação

ESCORE	EXPRESSÃO	ÍNDICE DE MARCAÇÃO
-	Negativa	0
+1	Baixa	1- 4
+2	Alta	5 -8
+3	Superexpressão	9- 12

ANEXO 3. Índices de Marcação (IM) da Calponina, Ki-67, SMA, PAR2, IL-6 e TGFβ1 nos tumores de glândula salivar.

		AP(n=10)	AB(n=9)	CAC(n=10)	CME(n=14)	APBG(n=10)
Calponina	-	0	0	0	14	0
	<50%	5	1	4	0	2
	≥50%	5	8	6	0	8
Ki-67	-	2	1	0	2	0
	+1	5	6	8	6	9
	+2	2	1	2	2	1
	+3	1	1	0	4	0
SMA	-	0	0	0	0	0
	<50%	6	7	6	9	7
	≥50%	4	2	4	5	3
PAR-2	-	3	1	0	2	0
	+1	1	2	3	2	0
	+2	1	2	4	0	10
	+3	5	4	3	10	0
IL-6	-	4	9	9	6	9
	+1	2	0	0	7	0
	+2	1	0	0	0	1
	+3	3	0	1	1	0
TGFβ1	-	5	0	5	4	6
	+1	1	3	4	4	1
	+2	3	6	0	4	3
	+3	1	0	1	2	0

(- = negativo; +1 = baixa expressão; +2 = alta expressão; +3 = superexpressão)