



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



ERNESTO SANTOS SOUSA NETO

**INTERAÇÃO DE COMPONENTES CELULARES ESTROMAIS E
MICROVASCULARES EM TUMOR ODONTOGÊNICO
QUERATOCÍSTICO: UM ESTUDO COMPARATIVO**

Salvador

2014

ERNESTO SANTOS SOUSA NETO

**INTERAÇÃO DE COMPONENTES CELULARES ESTROMAIS E
MICROVASCULARES EM TUMOR ODONTOGÊNICO
QUERATOCÍSTICO: UM ESTUDO COMPARATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, Curso de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. JEAN NUNES DOS SANTOS

Ficha Catalográfica elaborada pela BUS – Biblioteca Universitária de Saúde da UFBA

S725 Sousa Neto, Ernesto Santos
Interação de componentes celulares estromais e microvasculares em tumor odontogênico queratocístico : um estudo comparativo / Ernesto Santos Sousa Neto. - Salvador, 2014. 89 f. : il.

*Orientador : Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia, 2014.*

1. Tumor odontogênico queratocístico. 2. Mastócitos. 3. Miofibroblastos. 4. Macrófagos . I. Universidade Federal da Bahia . Faculdade de Odontologia. II. Santos, Jean Nunes dos. III. Título.

CDU 616.31-006

A

Priscila, por seu amor, compreensão e incentivo durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

A **Jeová Deus**, pela vida e perdão por minhas falhas.

Aos **meus pais**, pela minha existência e por sempre estarem ao meu lado.

À **minha família**, por compreender que as ausências são consequência do caminho escolhido.

Ao meu orientador **Dr. Jean Nunes**, pelo estímulo, confiança, pelos ensinamentos e pelo exemplo de compromisso e seriedade pela pesquisa. Sem a sua orientação nada disso seria possível!

Às Professoras **Dra Maria Cristina Cangussú** e **Dra. Sandra Sardinha**, pela colaboração, paciência e prontidão em me ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, na pessoa da Coordenadora professora **Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho** e do Vice-Coordenador professor **Dr. Jean Nunes dos Santos**.

À amiga e colega de longas datas **Adna Barros**, por sua amizade, estímulo e confiança.

Às colegas **Rosane Borges** e **Manuela Andion**, pela boa vontade de me ajudar sempre!

Ao meu grande amigo **Daniel Luiz**, pelas palavras de encorajamento, pelo incentivo e por sempre estar disposto a me ajudar quando precisava! Sou muito grato a você!

Aos amigos da **turma de Mestrado**, pelos bons momentos vividos e pela contribuição que cada um teve, em algum momento, para o meu crescimento.

Ao coordenador do CEO/Camaçari (2012), **Dr. Thiago Novaes** que sempre esteve pronto a me ajudar.

Ao atual coordenador do CEO/Camaçari (2013/14), **Dr. Geovane Matos**, pela compreensão, boa vontade e pelo reconhecimento da importância desta etapa em minha vida.

Aos **Bolsistas** do nosso grupo de pesquisa, pela ajuda na etapa laboratorial.

À **Fiocruz-CPqGM**, pela possibilidade de execução da etapa experimental no Laboratório de Pesquisa e Biologia Molecular.

À **Suely**, secretária do mestrado, por se mostrar sempre solícita quando precisei.

À **Fapesb**, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

(Clauder Lévi- Strauss)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar, por meio da imunohistoquímica, a participação de componentes celulares estromais a exemplo dos mastócitos (*mast cell triptase*), miofibroblastos (*alfa-SMA*) e macrófagos (CD163) e componentes vasculares (CD34 e D2-40) em uma série de tumores odontogênicos queratocísticos (TOQ), na tentativa de fornecer subsídios para compreender a interação entre esses componentes e o comportamento biológico distinto desta lesão. Para fins comparativos, cistos radiculares (CRs) e folículos pericoronários (FPs) também foram incluídos. A amostra foi composta por 30 TOQs, 15 CRs e 07 FPs. Para a avaliação dos mastócitos, miofibroblastos e macrófagos, foram quantificadas as células imunorreativas aos marcadores *mast cell triptase*, *alfa-SMA* e CD163, respectivamente, em 10 campos (400x). Os índices angiogênico e linfangiogênico foram avaliados por meio da densidade microvascular (MVD) e densidade microvascular linfática (MVDL) dos microvasos marcados, respectivamente, pelos marcadores CD34 e D2-40. Foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste de correção de Tukey, para análise estatística entre os marcadores segundo o tipo de lesão. Para a análise da correlação entre os marcadores dentro da mesma lesão, utilizamos a correlação de Pearson. Para a associação, no TOQ, entre os marcadores e a presença de inflamação, utilizamos o Teste T de Student. A análise da expressão do marcador *mast cell triptase* revelou existir diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a densidade de células mastocitárias presentes nos CRs (22,7) em relação aos FPs (1,23) e TOQs (7,39), e entre a densidade de mastócitos presentes no TOQs e FPs. Houve também diferença significativa ($P < 0,05$) entre a densidade de miofibroblastos em TOQs (29,25) em relação aos CRs (4,66) e os FPs (1,50). A diferença da densidade de miofibroblastos entre os CRs e FPs não foi significativa ($p > 0,05$). A respeito dos macrófagos, não houve diferenças significativas ($p = 0,084$) entre as densidades de macrófagos presentes nos TOQs (2,31), CRs (1,42) e FPs (0,14). Na avaliação do índice angiogênico, não houve diferenças significativas da MVD entre as três lesões estudadas. No entanto, para o índice linfangiogênico, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a MVDL presentes nos TOQs (11,64) em relação aos CRs (4,19) e aos FPs (0,167). A diferença entre a MVDL dos CRs em relação aos FPs não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Não foi encontrada associação significativa ($p > 0,05$) entre os marcadores estudados com a presença de inflamação no TOQ. No presente trabalho, encontramos uma correlação positiva e moderada entre os marcadores *mast cell triptase* e o CD34 nos TOQ ($p = 0,025$). Já nos CRs encontramos uma correlação inversa e moderada entre os marcadores *SMA* x CD34 ($p = 0,017$). Nos FPs também encontramos uma correlação inversa entre os mesmos marcadores anteriores, porém forte ($p = 0,049$). Embora os componentes celulares estromais e microvasculares aqui representados por mastócitos, miofibroblastos, macrófagos CD163 positivos e vasos CD34 e D240, respectivamente, sejam importantes para manutenção do arcabouço estrutural do TOQ e CR, existiu uma interação significativa entre *mast cell triptase* e CD34 no TOQ e entre CD34 e o *alfa-SMA* no CR.

PALAVRAS-CHAVE: Tumor odontogênico queratocístico, mastócitos, miofibroblastos, macrófagos, índice angiogênico, índice linfangiogênico, *mast cell triptase*, *alfa-SMA*, CD34, CD163, D2-40.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate, by immunohistochemistry, the participation of stromal cell components such mast cell (*mast cell tryptase*), myofibroblasts (*alpha-SMA*) and macrophages (CD163) and vascular components (CD34 and D2-40) in a series of keratocysts odontogenic tumors (OKT) in an attempt to provide information to understand the interaction between these components and the biological behavior of this lesion. For comparative purposes, radicular cysts (RCs) and pericoronal follicles (PFs) were also included. The sample comprised 30 OKTs, 15 RCs and 07 PFs. For the evaluation of mast cells, myofibroblasts and macrophages, the cells immunoreactive with biomarkers mast cell tryptase, alpha-SMA and CD163 were quantified, respectively, in 10 fields (400x). The angiogenic and lymphangiogenic index were assessed by microvessel density (MVD) and lymphatic microvessel density (MVDL) of microvessels marked respectively by for CD34 and D2-40. ANOVA with post-test Tukey correction for statistical analysis between markers was used according to the type of injury. To analyze the correlation between markers within the same lesion, we used the Pearson correlation. For the association, the OKT between markers and the presence of inflammation, we used the Student's t test. The analysis of expression of *mast cell tryptase* shows any significant differences ($p < 0.05$) between the density of mast cells present in RCs (22.7) than FPs (1.23) and TOQs (7.39) and the density of mast cells present in TOQs and FPs. There was also a significant difference ($P < 0.05$) between the density of myofibroblasts in TOQs (29.25) compared to CRs (4.66) and FPs (1.50). The difference in density between the RCs of myofibroblasts and PFs was not significant ($p > 0.05$). With respect to macrophages, no significant differences ($p = 0.084$) between the densities of macrophages present in TOQs (2.31), CR (1.42) and FPs (0.14). With respect to the angiogenic index, there were no significant differences in MVD between the three lesions studied. However, for the lymphangiogenic index, a significant difference ($p < 0.05$) between MVDL present in TOQs (11.64) compared to CRs (4.19) and FPs (0.167). The difference between MVDL of CRs compared to FPs was not statistically significant ($p > 0.05$). No significant association ($p > 0.05$) between the biomarkers studied in the presence of inflammation in the OKT was found. In the present study, we found a moderate positive correlation between mast cell tryptase and CD34 markers in OKT ($p = 0.025$). Have the CR and found an inverse correlation between moderate SMA x CD34 ($p = 0.017$). In PFs also found an inverse correlation between the SMA x CD34, but strong ($p = 0.049$). Although stromal microvascular and cellular components represented here by mast cells, myofibroblasts, and CD163 positive macrophages and vessels CD34 and D240 are important for maintaining the structural framework of the OKT and RC, a significant interaction between *mast cell tryptase* x CD34 existed in OKT and between CD34 x *alpha-SMA* in RC.

KEYWORDS : keratocyst odontogenic tumor, mast cells, myofibroblasts, macrophages, angiogenic index, lymphangiogenic index, *mast cell tryptase*, alpha-SMA, CD34, CD163 and D2-40 .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** **Tumor odontogênico queratocístico.** A – numerosas células mastocitárias presentes ao longo da parede fibrosa – B – Detalhe da figura anterior mostrando células com formato variado na parede fibrosa – C – Mastócitos alongados concentrados na região mais superficial da parede fibrosa, mas também distribuídos mais profundamente – D – Detalhe da figura anterior mostrando mastócitos próximos de vasos sanguíneos. 45
- Figura 2** **Tumor odontogênico queratocístico com inflamação.** A - Mastócitos arredondados e ovalados distribuídos próximos ao epitélio de revestimentos e concentrados em meio a raras células inflamatórias crônicas – B – Raros mastócitos em meio a discreta inflamação crônica e dentro do epitélio de revestimento – C – Numerosos mastócitos de formatos variados em meio a moderada inflamação crônica – D – Poucos mastócitos em meio a marcante inflamação crônica – E – Mastócitos acumulados dentro da camada basal do epitélio de revestimento e por entre raras células inflamatórias crônicas – F – Mastócitos dendríticos na superfície epitelial e arredondados na parede fibrosa também com raras células inflamatórias crônicas. 46
- Figura 3** **Cisto radicular.** A – Mastócitos distribuídos no interior do revestimento epitelial cístico, arredondados, no lúmen cístico e no topo direito junto com células inflamatórias crônicas – B – Detalhe da figura anterior mostrando mastócitos intraepiteliais e no lúmen cístico – C – Mastócitos distribuídos ao longo do revestimento epitelial cístico, na parede fibrosa e no lúmen cístico – D – Mastócitos intraepiteliais e por entre fendas de colesterol – E – Numerosos mastócitos ao longo de significativa inflamação crônica e circundado por proliferações epiteliais semelhantes ao tumor odontogênico escamoso – F – Mastócitos distribuídos ao longo de marcante inflamação crônica e dentro dos restos epiteliais odontogênicos – G – Mastócitos ao longo de inflamação e degranulando-se – H – Detalhe da foto anterior mostrando mastócitos degranulando-se. 47
- Figura 4** A – **Tumor odontogênico queratocístico.** Mastócitos alongados e arredondados – B – **Folículo pericoronário.** Mastócito degranulando (seta). 48
- Figura 5** **Tumor odontogênico queratocístico.** A – Miofibroblastos fusiformes presentes em diferentes direções por toda a parede cística – B – Detalhe da figura anterior – C – Miofibroblastos fusiformes assumindo uma posição mais paralela em relação a superfície epitelial – D – Detalhe da figura anterior – E – Notar marcante presença de miofibroblastos fusiformes ou não, concentrados em área de tecido de granulação e a direita onde o revestimento epitelial não sofreu alteração ou modificação, observar ausência de miofibroblastos. – F – Detalhe da figura anterior – G – **Cisto radicular.** Miofibroblastos fusiformes dispostos paralelamente a superfície epitelial mais concentrados na profundidade da parede cística – H – Detalhe morfológico de um miofibroblasto fusiforme posicionado na região subepitelial. 50
- Figura 6** **Cisto radicular.** A – Observar poucos miofibroblastos paralelos ao revestimento cístico (seta) ao lado de vasos sanguíneos – B – Detalhe da figura anterior mostrando um miofibroblasto volumoso e fusiforme (seta) – C – Miofibroblastos fusiformes ao longo da parede cística – D – Detalhe da figura anterior mostrando miofibroblastos de formato ovalar e 51

- fusiforme ao lado de inflamação crônica – E – Concentração de miofibroblastos fusiformes paralelos a superfície epitelial e dispostos na profundidade da parede cística – F – Miofibroblastos fusiformes na parede cística – G – **Folículo pericoronário**. Miofibroblasto fusiforme.
- Figura 7** **Tumor odontogênico queratocístico**. A – Presença de macrófagos CD163 positivos ao longo da parede fibrosa e no revestimento epitelial cístico – B – Notar célula CD163 positiva (setas) dentro do revestimento epitelial cístico – C – Lesão modificada por tecido de granulação e inflamação crônica marcante mostrando células CD163 positivas quer na parede fibrosa quer na superfície epitelial – D – Numerosos macrófagos CD163 positivos em área com inflamação crônica – E – **Cisto radicular**. Poucos macrófagos na parede fibrosa (setas) – F – **Folículo pericoronário**. Macrófagos CD163 positivos da parede do folículo. 53
- Figura 8** **Tumor odontogênico queratocístico** – A – Numerosos vasos sanguíneos CD34 positivos próximos ou não ao revestimento epitelial cístico – B – Vasos sanguíneos concentrados próximos a revestimento epitelial cístico – C – **Cisto radicular**. Tecido de granulação com vasos neoformados – D – **Folículo pericoronário**. Vasos sanguíneos CD34 positivos na parede fibrosa do folículo. 55
- Figura 9** **Tumor Odontogênico queratocístico**. A – Camada basal e suprabasal do revestimento epitelial cístico positivo ao D2-40; notar vasos também positivos na parede fibrosa – B – Vasos linfáticos D2-40 positivos – C – Revestimento epitelial cístico com células basais e suprabasais, bem como vasos e células estromais positivos ao D2-40 – D – Detalhe da figura anterior – E e F – Revestimento epitelial cístico com brotamentos epiteliais positivos ao D2-40; notar que a profundidade atinge até mais do 1/3 do revestimento epitelial. 57
- Figura 10** **Cisto radicular**. A – Revestimento epitelial cístico com positividade das células epiteliais em todos os seus extratos ao D2-40 – B e C – Tecido de granulação com vasos linfáticos D2-40 positivos – D – **Folículo pericoronário**. Revestimento epitelial e remanescentes epiteliais positivos ao D2-40 – E - Pequeno vaso linfático positivo ao D2-40. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Especificidade, clone, tratamento para recuperação antigênica, diluição e controle dos anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico.	38
Tabela 2	Distribuição das características clínicas e demográficas dos pacientes com tumor odontogênico queratocístico e cisto radicular.	42
Tabela 3	Distribuição das características clínicas e demográficas dos pacientes que foram removidos os folículos pericoronários.	43
Tabela 4	Resultado da análise estatística ANOVA da densidade média dos mastócitos/mm ²	44
Tabela 5	Resultado da análise estatística ANOVA da densidade média dos miofibroblastos/mm ²	49
Tabela 6	Resultado da análise estatística ANOVA da densidade média dos macrófagos/mm ²	52
Tabela 7	Resultado da análise estatística ANOVA da MVD média/mm ²	54
Tabela 8	Resultado da análise estatística ANOVA da LMVD média/mm ²	56
Tabela 9	Resultado da Correlação de Pearson ajustada entre os marcadores dentro de uma mesma lesão.	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Interval Plot Of <i>Mastcell Triptase; Alfa - SMA</i> Vs Lesão	47
Gráfico 2 Interval Plot of CD163 vs lesão	47
Gráfico 3 Interval Plot of CD34; D240 vs lesão	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Alfa-SMA	Sigla em inglês para alfa actina de músculo liso.
AM	Ameloblastoma.
AMD	Ameloblastoma desmoplásico.
AMS	Ameloblastoma sólido.
AMU	Ameloblastoma unicístico.
CD34	Do inglês <i>cluster of differentiation</i> 34, traduzido como grupamento de diferenciação 34.
CD163	Do inglês <i>cluster of differentiation</i> 163, traduzido como grupamento de diferenciação 163.
CF	Cisto folicular.
CG	Cisto gengival
CP	Cisto periapical
CPL	Cisto periodontal lateral
COC	Cisto odontogênico calcificante
CR	Cisto radicular
CXCL	Cicloxigenase
D2-40	Anticorpo monoclonal mouse anti-humano
EGF	Sigla na língua inglesa para fator de crescimento epidérmico
FA	Fibroma ameloblástico
FGF	Sigla na língua inglesa para fator de crescimento fibroblástico
FP	Folículo pericoronário
GP	Granuloma piogênico
IL	Interleucina
MC	Mastócito
M-CSF	Sigla em inglês para fator de estimulação de colônias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular

MF	Miofibroblasto
MMP	Metaloproteinase da matriz
MVC	Sigla em inglês para contagem microvascular
MVD	Sigla em inglês para densidade microvascular
MVV	Sigla em inglês para volume microvascular
MO	Mixoma odontogênico
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
PDGF	Sigla em inglês para fator de crescimento derivado de plaqueta
PGE	Prostaglandina E
RANK	Sigla em inglês para receptor ativador do fator nuclear
ROI	Sigla em inglês para intermediário do oxigênio reativo
TAM	Sigla em inglês para macrófagos associados a tumores
TGF- β	Sigla em inglês para fator de crescimento transformador-beta
TNF	Sigla em inglês para fator de necrose tumoral
TOA	Tumor odontogênico adenomatóide
TO	Tumor odontogênico
TOQ	Tumor odontogênico queratocístico
VEGF	Sigla em inglês para fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Sigla em inglês para receptor do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	MASTÓCITOS	19
2.1.1	MASTÓCITOS EM TUMORES ODONTOGÊNICOS	21
2.2	MIOFIBROBLASTOS	22
2.2.1	MIOFIBROBLASTOS EM TUMORES ODONTOGÊNICOS	24
2.3	MACRÓFAGOS	26
2.3.1	MACRÓFAGOS EM TUMORES ODONTOGÊNICOS	29
2.4	ANGIOGÊNESE	29
2.4.1	ANGIOGÊNESE EM TUMORES ODONTOGÊNICOS	31
2.5	LINFANGIOGÊGESE	33
2.5.1	LINFANGIOGÊNESE EM TUMORES ODONTOGÊNICOS	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	37
4.2	SELEÇÃO DOS CASOS	37
4.3	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	37
4.4	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	39
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41

5	RESULTADOS	42
5.1	IMUNOEXPRESSÃO <i>MAST CELL TRIPTASE</i>	43
5.2	IMUNOEXPRESSÃO DO <i>ALFA-SMA</i>	48
5.3	IMUNOEXPRESSÃO DO CD163	52
5.4	IMUNOEXPRESSÃO DO CD34	54
5.5	IMUNOEXPRESSÃO DO D2-40	55
5.6	INFILTRADO INFLAMATÓRIO	60
5.7	CORRELAÇÃO DE PEARSON	60
5.7.1	TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSCITO	62
5.7.2	CISTO RADICULAR	62
5.7.3	FOLÍCULO PERICORONÁRIO	60
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO	100

1. INTRODUÇÃO

O Tumor Odontogênico Queratocístico (TOQ) é originado a partir de remanescentes epiteliais da lâmina dentária e durante muito tempo foi considerado um cisto odontogênico de desenvolvimento. Devido às características clínicas e patológicas desta lesão, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugeriu o termo tumor odontogênico queratocístico, uma vez que melhor descreve sua natureza neoplásica (BARNES et al., 2005; ALAEDDINI et al., 2009; GADBAIL et al., 2013). O TOQ pode estar associado à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide, também denominada Síndrome de Gorlin-Goltz (MANFREDI et al., 2004; FIGUEROA et al., 2010; HAKIM et al., 2010; RAMOS et al., 2014; MEHTA et al., 2014).

Quanto à sua localização anatômica, estudos revelam acometimento mais frequente na mandíbula, sendo a região de ramo a mais comumente afetada (SOUZA et al., 2010, GURGEL et al., 2010; MELO et al., 2013). Quanto ao sexo, a maioria dos casos é diagnosticada em pessoas do sexo masculino, com picos de incidência entre a segunda e terceira décadas de vida (JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006).

Histologicamente, os TOQs apresentam revestimento epitelial com 5 a 8 camadas de células, cuja camada basal apresenta células baixas, cubóides, dispostas em paliçada, com núcleo hipercromático e superfície paraceratinizada e corrugada (BARNES et al., 2005; KOLAR et al., 2006; GONZÁLEZ-ALVA et al., 2008; MELO et al., 2013). Os TOQs apresentam a junção epitélio-conjuntivo plana, sendo frequente o destacamento do epitélio (JORDAN, 2003; BARNES et al., 2005; GURGEL et al., 2010; MELO et al., 2013).

O TOQ é conhecido por sua natureza agressiva e sua alta taxa de recidiva, especialmente em comparação com outros cistos odontogênicos de desenvolvimento (ALAEDDINI et al., 2009; MENDES; CARVALHO; VAN DER WALL, 2010; GADBAIL et al., 2013). Sua capacidade para invasão e seu crescimento destrutivo podem estar relacionados com fatores biológicos desconhecidos integrados no estroma e parênquima, dando a esta lesão este comportamento biológico específico (KOLA et al., 2006; TSUNEKI et al., 2008, ALAEDDINI et al., 2009; GADBAIL et al., 2013).

Os mastócitos (MCs) são células importantes do sistema imune inato e adquirido, abundantes em nosso organismo, conhecidas principalmente por dar início às reações alérgicas (GALLI, et al., 2011; AKIN, 2014; WERNER-BUSSE et al., 2014). Eles participam também no processo de angiogênese, reparação e remodelação tecidual (FOUILLoux, et al., 2005; RIBATTI; CRIVELLATO, 2012; STOCKMANN et al., 2014). Estudos têm indicado

que os MCs podem estar envolvidos na gênese de tumores, bem como na sua progressão, principalmente devido a sua capacidade de liberar fatores pró-angiogênicos (RIBATTI; CRIVELLATO, 2012; MARICHAL et al, 2013; ULLAH et al, 2013; STOCKMANN et al, 2014).

Os miofibroblastos (MFs) são células especializadas com características de fibroblastos e células musculares lisas (DESMOULIERE et al., 2005; ANGADI et al, 2011). São células com capacidade contrátil e capacidade de sintetizar diversos componentes da matriz extracelular, como colágenos tipo I e III. Através da secreção de proteases, citocinas e fatores pró-angiogênicos, os MFs têm sido relacionados com a progressão e desenvolvimento de diversos tumores (DESMOULIERE et al., 2005; DE WEVER et al, 2008; CHEN et al., 2009; EYDEN et al, 2009; MANGIA, et al, 2011), incluindo cistos e tumores odontogênicos (TOs), como o TOQ (VERED et al., 2005; ALAEDDINI et al., 2009; NONAKA et al., 2012; NADALIN et al., 2012; RAMOS et al., 2014). Apesar disso, a origem dos MFs ainda é objeto de investigação, porém estudos sugerem que a triptase liberada pelos MCs seja capaz de induzir a proliferação de fibroblastos e a sua transdiferenciação em MFs (MANGIA et al., 2011).

Outra célula encontrada no microambiente tumoral em elevada quantidade são os macrófagos (BALKWILL et al., 2005; ALLAVENA et al., 2008; GUZMÁN-MEDRANO et al, 2012). Embora diversos estudos mostrem que os macrófagos possam destruir células tumorais *in vitro*, atualmente é aceito que os macrófagos também participam na promoção do crescimento tumoral (MONTONAVI et al., 2005; GORDON; TAYLOR, 2005; SICA et al., 2006; ALLAVENA et al., 2008; MONTANAVI et al, 2010; GUZMÁN-MEDRANO et al, 2012; MEDREK et al, 2012).

Macrófagos associados a tumores (TAMs) derivam de monócitos circundantes no sangue, que diferenciam-se em macrófagos maduros dentro do microambiente tumoral (MONTONAVI et al., 2005; GORDON; TAYLOR, 2005; ALLAVENA et al., 2008; WANG et al, 2011; MEDREK et al, 2012). Em condições patológicas como infecções e câncer, os macrófagos apresentam como uma importante característica biológica a expressão de diferentes funções decorrentes de diferentes sinais microambientais (MONTONAVI et al., 2005; GORDON; TAYLOR, 2005; ALLAVENA et al., 2008; MEDREK et al, 2012). Em resposta a citocinas e produtos microbianos, essa população celular expressa propriedades funcionais especializadas, polarizando-se em macrófagos M1 e M2 que, por sua vez, poderão promover ou não a progressão de neoplasias (MONTONAVI et al., 2005; GORDON;

TAYLOR, 2005; SICA et al, 2006; ALLAVENA et al., 2008; CHEN et al, 2011; BARROS et al, 2012; EDIN et al, 2012).

Um outro fator que pode contribuir para o potencial de invasão, agressividade e iniciação tumoral é a angiogênese, uma vez que este processo promove a formação de novos vasos sanguíneos que, por sua vez, fornecem oxigênio e nutrientes necessários para as células tumorais se desenvolverem (FOLKMAN; KALLURI, 2006; MARGARITescu et al, 2010; UCUZIAN et al., 2010; KATO, 2010; FILKEN et al, 2010; KALURI, 2011; GADBAIL et al, 2013). A angiogênese é um processo complexo regulado por diversas vias de sinalização intercelulares, com funções tanto pró-angiogênicas como anti-angiogênicas, que pode ser mensurada pela determinação do índice angiogênico (UCUZIAN et al., 2010; KATO, 2010).

Embora exista uma vasta quantidade de estudos sobre angiogênese como um mecanismo de crescimento do tumor, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na formação de vasos linfáticos, processo denominado linfangiogênese (VLEUGEL et al., 2004; SCHOPPMANN et al, 2006; MOHAMMED et al, 2007; WANG; OLIVER, 2010; CHRISTIANSEN; DETMAR, 2011; GOMES et al, 2013). Devido ao fato da presença de metástase linfonodal ser um dos critérios utilizados para avaliar o prognóstico de lesões malignas, a identificação do fenômeno de linfangiogênese no estroma tumoral pode servir de subsídio para avaliar o potencial de agressividade de lesões (MOHAMMED et al, 2007; MARINHO et al., 2008; ESPINOSA et al., 2010; CHRISTIANSEN; DETMAR, 2011).

Sabendo-se que os MCs são capazes de influenciar a diferenciação/ transdiferenciação de fibroblastos em MFs (MANGIA et al., 2011) e estão presentes em tumores e cistos odontogênicos (LOMBARDI; MORGAN, 1995; VERED et al., 2005; FREGNANI et al., 2009; NONAKA et al., 2012; DE ASSIS et al., 2012; NETTO et al., 2012) e que a presença de macrófagos (BALKWILL et al., 2005; ALLAVENA et al., 2008; BARROS et al, 2012), angiogênese e linfangiogênese no estroma tumoral pode estar relacionada com o desenvolvimento de tumores (MOHAMMED et al, 2007; MARINHO et al., 2008; ESPINOSA et al., 2010; CHRISTIANSEN; DETMAR, 2011), incluindo neoplasias e cistos odontogênicos (GUZMÁN-MEDRANO et al, 2012; BRACKS et al, 2014), o presente trabalho tem como objetivo estudar a participação desses componentes celulares e suas possíveis relações com os processos de angiogênese e linfangiogênese em uma série de TOQ. Para fins comparativos, cistos radiculares (CRs) e folículos pericoronários (FPs) foram incluídos no estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MASTÓCITOS

O ambiente tumoral é circundado por um infiltrado de células inflamatórias, como linfócitos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos (CRIVELLATO; RIBATTI, 2007; RIBATTI et al., 2009; MALTBY et al, 2009; MARICHAL et al, 2013). Tais células se comunicam através de uma complexa rede de vias de sinalização intracelulares, mediada por moléculas de superfície de adesão, citocinas e seus receptores (CRIVELLATO; RIBATTI, 2007; RIBATTI et al., 2009; MALTBY et al, 2009).

As células inflamatórias estimulam a proliferação de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos, sendo um importante mecanismo para a progressão tumoral e da metástase (ULLAH et al, 2013). Tumores agressivos, como o melanoma, carcinoma da mama e o adenocarcinoma colo-retal estão associados a uma resposta do hospedeiro composta de várias células inflamatórias, especialmente MCs e macrófagos (CRIVELLATO; RIBATTI, 2007; RIBATTIA et al., 2009).

Um estudo prévio demonstrou que os MCs estão relacionados ao desenvolvimento de TOs, sendo um importante componente de seu estroma (DE ASSIS et al., 2012). Os MCs são células do tecido conjuntivo que, no estágio maduro, contém em seu interior uma grande quantidade de mediadores, como a histamina, citocinas e proteinases. Eles armazenam grandes quantidades de serinoprotease ativa pré-formadas, como a triptase e quimase, em seus grânulos secretores (CAUGHEY, 2007; METCALFE, BARAM, MEKORI, 2007; RIBATTIA et al., 2009; NETTO et al., 2012).

O papel mais conhecido dos MCs é na reação alérgica (AKIN et al, 2014; WERNER-BUSSE et al, 2014), porém eles desempenham também a função de proteção, estando envolvidos no processo de cicatrização e na defesa contra organismos patogênicos (MANGIA et al., 2011 GALLI, et al, 2011; AKIN, 2014; WERNER-BUSSE et al, 2014). Um dos papéis de importância dos MCs é na dinâmica do crescimento tumoral, interagindo com o seu microambiente, contribuindo para a progressão do tumor (MANGIA et al, 2011; DE ASSIS et al., 2012; NETTO et al., 2012; STOCKMANN et al, 2014).

Através de uma de suas proteinases, a triptase, os MCs exercem efeitos poderosos sobre os fibroblastos (FRUNGIERI et al., 2002; MANGIA et al, 2011; BRAZIN et al, 2014).

Tal proteinase é um potente mitógeno, estimulando síntese de colágeno em pulmão e na derme (ABE et al., 1998; MANGIA et al., 2011; CHEN et al, 2014).

Estudos realizados em carcinoma mamário mostraram que no microambiente do estroma tumoral havia presença significativa de MCs. Os MCs se infiltram no estroma do tecido desde as etapas iniciais de carcinogênese e aumentam significativamente no carcinoma invasivo (ZUDAIRE et al., 2006; MANGIA et al., 2011; BRAZIN et al, 2014).

Concomitantemente ao aumento do número de MCs no tecido tumoral, tem sido observado o aumento da quantidade de MFs. Mediadores liberados pelos MCs, a exemplo da triptase, durante a sua degranulação, são capazes de modificar o microambiente do estroma tumoral, induzindo a proliferação de fibroblastos e sua transdiferenciação em MFs (HARTMANN, 1992; MANGIA et al., 2011).

O papel proteolítico das enzimas mastocitárias (triptase e quimase) na angiogênese tem sido estabelecido. A triptase atua estimulando a proliferação de células endoteliais vasculares humanas, promovendo a formação do tubo vascular em cultura e também degradando matriz do tecido conjuntivo para proporcionar espaço para o crescimento neovascular. Esta degradação ocorre através da ativação de metaloproteinases (MMPs) latentes, com conseqüente liberação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento fibroblástico 2 - FGF-2 (RIBATTIA et al., 2009; PYZIAK et al, 2013).

A quimase degrada componentes da matriz extracelular (MEC) e, portanto, pode ocorrer liberação do VEGF. Esta proteinase também promove a angiogênese através da conversão de angiopoetina I em angiopoetina II (MURAMATSU et al., 2000; RIBATTI et al., 2009). A quimase é capaz de ativar a MMP-9, que está envolvida na remodelação angiogênica, estromal e invasão de células tumorais (KANBE et al.,1999; RIBATTI et al., 2009)

Os MCs podem desempenhar papéis distintos durante o desenvolvimento do tumor. Por um lado, eles podem exibir atividade supressora por secretarem diferentes interleucinas inibitórias e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Por outro lado, eles podem ajudar na progressão de tumores através da promoção da angiogênese, da degradação da MEC e imunossupressão (THEOHARIDES E CONTI, 2004, GOMES et al., 2013). Com relação à sua capacidade pró-angiogênica, os MCs podem secretar moléculas como VEGF, FGF-2, interleucinas 8 (IL-8) e fator de crescimento tumoral beta - TGF- β (CRIVELLATO et al., 2008).

Os MCs podem desempenhar um papel muito importante não só na angiogênese, mas também na linfangiogênese tumoral (GOMES et al, 2013). De acordo com Brideal et al.

(2007), em carcinoma de célula escamosa de pele, a endostatina foi capaz de diminuir os níveis de infiltração do VEGF-C, expressos por MCs. A capacidade de inibir a adesão de endostatina e migração dos MCs sobre a fibronectina também tem sido demonstrado *in vitro*, o que sugere que a redução da agressividade causada pela endostatina pode ser, em parte, devido à diminuição dos níveis de VEGF-C, a qual é consequência da inibição mastocitária (BRIDEAU et al., 2007).

2.1.1 MASTÓCITOS EM TUMORES ODONTOGÊNICOS

A presença de MCs tem sido observada em diversas lesões odontogênicas (TERONEN et al, 1996; CHATTERJEE et al, 2008; DRAZIC et al, 2010; LIMA et al, 2011; NETTO et al, 2012; DE ASSIS, et al, 2012; BRACKS et al, 2014). Teronen et al (1996) avaliaram, através da imunohistoquímica e técnica de Western-blot, a participação dos MCs na fisiopatologia da reabsorção óssea e formação de lesões císticas, nos CRs, cistos dentígeros (CD) e TOQ. Em todas as lesões os MCs foram encontrados em áreas de tecido rico em células inflamatórias e abaixo do epitélio cístico. Além disso, de acordo com os mesmos autores, os MCs foram encontrados em degranulação próximo ao osso, indicando uma alta atividade e sendo associado à destruição óssea, podendo desta forma contribuir para o crescimento cístico e destruição tecidual, resultando em expansão da lesão.

Chatterjee et al. (2008) avaliaram a distribuição dos MCs no CR, CD e TOQ com o objetivo de elucidar o mecanismo de expansão cística através da morfometria. Os resultados dos autores mostraram que os MCs foram encontrados em número elevado em todas as três lesões estudadas, levando os autores a concluir que os MCs desempenham um papel vital na patogênese dos cistos odontogênicos.

Drazic et al. (2010) analisaram a presença de MCs qualitativamente e semi-quantitativamente em lesões periapicais, baseado na expressão imunohistoquímica do CD117, investigando seu possível papel na patogênese de lesões periapicais. Os autores sugeriram que os MCs estão envolvidos na regulação de mecanismos imunes celulares e também no equilíbrio entre processos inflamatórios e reparadores nos tecidos periapicais inflamados.

Lima et al. (2011) analisaram a existência de possíveis correlações entre os MCs e o processo de angiogênese em casos de cistos periapicais (CP) e granulomas periapicais (GP), através dos marcadores CD105, CD34 e *mastcell triptase*. Os autores encontraram expressão diferenciada do CD105 em relação ao CD34 e esta diferença suporta uma atividade angiogênica associada à remodelação tecidual. Os autores também acreditam que a triptase

liberada pelos MCs tenha além de outras, propriedades angiogênicas.

Com o objetivo de compreender a patogênese dos CPs, CDs e TOQs, Netto et al. (2012) analisaram a presença e a distribuição das células mastocitárias nestas lesões por meio da imunohistoquímica e histoquímica. Os autores observaram um elevado número de MCs em lesões inflamadas, o que pode ser indicativo da participação deste componente celular na resposta inflamatória de lesões odontogênicas.

De Assis et al. (2012) investigaram, através da imuno-histoquímica, a presença de MCs em uma série de 45 TO, incluindo ameloblastomas sólidos (AMSs), mixomas odontogênicos (MOs) e TOQs. Os autores concluíram que os MCs são um dos principais componentes estromais destas lesões.

Bracks et al. (2014) também avaliaram a distribuição dos MCs em CPs. Os MCs estavam presentes em número elevado, principalmente em associação a áreas com inflamação, o que segundo os autores reforça a participação dos MCs na patogênese dos CPs.

2.2 MIOFIBROBLASTOS

Os fibroblastos representam o principal componente celular do tecido conjuntivo (OTRANTO et al., 2012). São eles um dos responsáveis pela síntese de sua matriz tecidual. O tecido conjuntivo contém fibroblastos, porém quando este mesmo tecido é acometido por um tumor, ocorre uma alteração no seu microambiente estromal (MANGIA et al., 2011; OTRANTO et al., 2012).

O conjuntivo é fundamental para a manutenção das funções e integridade dos tecidos epiteliais (WEVER; MAREEL, 2003; VERED et al., 2005). Ambos formam um ecossistema em que existe uma contínua interação molecular. Alterações neste microambiente, induzidas por citocinas, podem contribuir para a invasão do câncer. Sugere-se que fatores de crescimento que participam na cicatrização tecidual possam desempenhar um papel na mudança do microambiente do estroma, favorecendo o desenvolvimento tumoral (VERED et al., 2005).

Sabe-se que no microambiente estromal de alguns cânceres, a exemplo do carcinoma da mama, os fibroblastos adquirem um fenótipo modificado, semelhantes aos associados com a cicatrização tecidual (SAPPINO et al., 1988; MANGIA et al., 2011). Em tumores sólidos, a presença deste tipo de fibroblastos está associada ao aumento da deposição de estroma

colagenoso denso (NAKAYAMA et al., 2000; MANGIA et al., 2011; OTRANTO et al., 2012).

Esse fibroblasto com fenótipo modificado, também considerado por diversos autores como fibroblastos reativos (NAKAYAMA et al., 2000), são denominados miofibroblastos (MFs) e são caracterizados morfológicamente por grandes células fusiformes com propriedades fenotípicas de músculo liso (DESMOULIERE; GOYOT; GABBIANI, 2004; LAZARD et al., 1993; MANGIA et al., 2011).

A hipótese da origem dos MFs mais aceita é a de que tais células podem ser oriundas de células mesenquimais, tais como fibroblastos residentes locais, no entanto existem outras hipóteses de que os MFs podem surgir de células de músculo liso, pericitos, células endoteliais, fibrócitos circulantes derivados da medula óssea (EYDE et al., 2009; MANGIA et al., 2011; OTRANTO et al., 2012; TERAIS; FUSHIDA S; TSUKADA T et al., 2014).

Os MFs desempenham papel importante no microambiente do estroma tumoral e estão associados a processos como progressão neoplásica, angiogênese e metástase (BAGLOGLE et al., 2006; MANGIA et al., 2011). Eles produzem uma série de fatores que modulam o comportamento tumoral e endotelial. Os MFs são capazes de degradar componentes da matriz extracelular, como as MMPs-2, -3 e -9 (DE WEVER et al., 2008; NOVO et al., 2010), a uroquinase ativadora do plasminogênio (DESMOULIERE; GOYOT; GABBIANI, 2004) e a proteína ativadora de fibroblastos (CHEN et al., 2009). São a principal fonte de fatores de crescimento, quimiocinas e proteínas remodeladoras da matriz dentro do microambiente do estroma (VONG; KALLURI, 2011).

A maioria dos MFs expressa alfa-actina de músculo liso – *alfa-SMA* (HINZ et al., 2007; VONG; KALLURI, 2011; HINZ et al., 2012; TERAIS; FUSHIDA S; TSUKADA T et al., 2014) que é a isoforma da actina tipicamente encontrada em células musculares vasculares lisas e regulada por TGF- β 1 (WEBER et al., 2012; TERAIS; FUSHIDA S; TSUKADA T et al., 2014). O MF tem papel na síntese da MEC e na geração de força, o que resulta em reorganização e contração do tecido durante a cicatrização tecidual (TOMASEK et al., 2002; VERED et al., 2005; OTRANTO et al., 2012). Segundo Otranto et al. (2012), tanto os fibroblastos quanto os MFs secretam colágeno e elastina, que dão força e resiliência à matriz, produzindo também moléculas como proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Isso permitirá a formação de uma matriz diferenciada que facilitará adesão e migração celular, sendo também um reservatório de moléculas de sinalização, íons, hormônios e nutrientes.

Alterações no estroma tumoral podem resultar na transformação fenotípica de MFs, como TGF- β 1 e PDGF liberados por células neoplásicas (VERED et al., 2005; HINZ et al.,

2007; HINZ et al, 2010). O TGF- β 1 é altamente quimiotático para fibroblastos, que por sua vez se transdiferenciam em MFs, produzindo diversas moléculas, tais como fatores de crescimento e fatores angiogênicos, componentes da MEC e proteinases que juntos contribuirão para a invasão de células epiteliais neoplásicas (WEVER; MAREEL, 2003; VERED et al., 2005; OTRANTO et al., 2012; WEBER et al., 2012).

Há cerca de 40 anos, os MFs foram identificados no estroma de vários tumores malignos invasivos e metastáticos, a exemplo do carcinoma de ducto mamário. Naquela época pensava-se que esse fenômeno era parte da reação do hospedeiro para evitar a invasão das células malignas, uma vez que os MFs eram numerosos, sobretudo na linha de frente da invasão. No entanto, nos últimos 20 anos, tem havido uma abundância de evidências de que a presença de MFs à frente da invasão não é parte do mecanismo de defesa do hospedeiro contra a invasão do tumor, mas na realidade participam na promoção do crescimento tumoral (VERED et al., 2005; VONG; KALLURI, 2011; HINZ et al., 2012; TERAIS; FUSHIDA S; TSUKADA T et al., 2014).

Durante a progressão do câncer de mama, os MCs contribuem para a remodelação do estroma, induzindo a manifestação fenotípica de MFs, por meio da triptase lançada no microambiente tumoral (MANGIA et al, 2011; KIUCHI et al., 2014). A triptase estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, que por sua vez fará com que os fibroblastos expressem a *alfa-SMA* e colágeno contrátil (MANGIA et al., 2011).

2.2.1 MIOFIBROBLASTOS EM TUMORES ODONTOGÊNICOS

No que diz respeito às lesões odontogênicas, são escassos os estudos sobre a presença de MFs em cistos e TOs. No entanto, em algumas lesões, a exemplo do TOQ e AM, cujo comportamento tem se mostrado agressivo (SHEAR et al., 2002; VERED et al., 2005), tem-se sugerido que a presença dos MFs no estroma dessas lesões pode ser responsável por tal comportamento (VERED et al., 2005). Nesse respeito, destacam-se os estudos de Lombardi; Morgan (1995); Vered et al., (2005); Mitrou et al., (2009); Fregnani et al., (2009); Nonaka et al., (2012) e Nadalin et al.,(2012).

Lombardi e Morgan (1995) avaliaram o fenótipo dos fibroblastos presentes em lesões odontogênicas (TOQs, CDs, CRs, cisto periodontal lateral – CPL, cisto gengival - CG e cisto odontogênico calcificante - COC), através dos anticorpos anti-vimentina, anti-*alfa-SMA* e anti-desmina. Excetuando-se o COC e o CG, todas as lesões apresentaram fibroblastos com perfil de MFs (*alfa-SMA* positivo). A análise microscópica também revelou que essas células

tinham retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos e miofilamentos intracitoplasmáticos com distribuição subplasmalemal, levando os autores a concluir que os MFs são um componente importante da cápsula fibrosa dos cistos odontogênicos.

Vered et al. (2005) analisaram a presença de MFs em CDs, TOQs; AM e fibroma ameloblástico (FA). Este estudo quantitativo forneceu evidências convincentes de que o estroma dessas lesões contém quantidades significativas de MFs, constatados por células marcadas positivamente por alfa-SMA. Além disso, o número médio de MFs em lesões agressivas, como o TOQ e AM, foi elevado e não diferiu significativamente de neoplasias malignas como o carcinoma escamoso. Os autores sugeriram uma ligação positiva: quanto maior for o número de MFs presentes no estroma, mais agressivo será o comportamento do cisto ou TO (VERED et al., 2005).

Mitrou et al. (2009) encontraram MFs em quantidades elevadas no estroma do TOQ e no AM. De acordo com De Wever e Mareel (2003), estes MFs presentes no estroma tumoral produzem fatores de crescimento e fatores pró-angiogênicos, componentes da MEC e proteínases que em conjunto promovem invasão e crescimento de células epeliais neoplásicas. Gadbail et al. (2013) também demonstraram o importante papel que a angiogênese tumoral promovida por tais células desempenha no comportamento agressivo e invasivo do TOQ e do AM.

Fregnani et al. (2009) avaliaram, através da imuno-histoquímica, a presença de MFs e a expressão de MMP-2 e do ativador de plasminogênio uroquinase em ameloblastomas sólidos intra-ósseos. Os autores observaram que a expressão abundante de MMP-2 e a presença de MFs em elevada quantidade nesta lesão podem estar associadas com um comportamento agressivo em AMS.

Nonaka et al. (2012) analisaram, por meio de imuno-histoquímica, reguladores de reabsorção óssea (RANKL), osteoprotegerina (OPG), índice angiogênico e MFs em TOQs associados à síndrome de Gorlin e TOQs não relacionados à síndrome. No que diz respeito à presença de MFs nas referidas lesões, foram encontradas em grande quantidade, porém não houve diferença significativa no número de MFs entre os grupos de lesões, o que levou os autores a sugerirem uma função secundária deste componente celular para a progressão do TOQ.

Nadalín et al. (2012) analisaram a presença de MFs e da MMP-2 em CRs, CDs e TOQs. Os autores verificaram que os MFs e a MMP-2 eram frequentes nas três lesões estudadas, e sugeriram que ambas podem contribuir para a reabsorção óssea, favorecendo a progressão e o crescimento dessas lesões.

2.3 MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células do sistema imunológico presentes em elevada quantidade no microambiente tumoral (BALKWILL et al., 2005; ALLAVENA et al., 2008; ONG et al., 2014). Embora diversos estudos mostrem que os macrófagos possam destruir células tumorais *in vitro*, atualmente é aceito que os macrófagos também participam na promoção do crescimento de tumores (SICA et al., 2006; ALLAVENA et al., 2008; VINOGRADOV; WARREN; WEI, 2014).

Segundo Pastor et al. (2010) e Evans et al. (2010), em algumas neoplasias epiteliais, a exemplo do câncer de colo-retal, foi constatada uma relação positiva entre alterações inflamatórias e progressão da lesão. Giusca et al. (2010) sugeriram uma relação funcional entre as características da população de macrófagos e o processo de metástase. Além disso, de acordo com Espinosa et al. (2010), os macrófagos estromais têm capacidade de desencadear o processo de angiogênese tumoral, participando na progressão de lesões malignas, a exemplo do carcinoma endometrióide. Devido a isso, o processo de angiogênese estimulada por macrófagos pode também participar do desenvolvimento de lesões odontogênicas, a exemplo dos AMs (ALAEDDINI et al., 2009; GUZMÁN-MEDRANO et al., 2012).

Macrófagos associados a tumores (TAM) derivam de monócitos circundantes no sangue (ALLAVENA et al., 2008; CORTEZ-RETAMOZO et al., 2012). Os monócitos diferenciam-se em macrófagos maduros dentro do microambiente tumoral. Em condições patológicas como infecções e câncer os macrófagos expressam biologicamente diferentes funções em resposta a diferentes sinais microambientais. Na presença de citocinas e produtos microbianos, por exemplo, eles são capazes de expressarem propriedades funcionais especializadas, polarizando-se em macrófagos do tipo M1 e M2 (MONTONAVI et al., 2005; GORDON; TAYLOR, 2005; ALLAVENA et al., 2008)

A atração de monócitos do sangue para dentro de tumores não é apenas realizada por citocinas. Moléculas como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento tumoral β (TGF- β) e fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) são quimiotáticos para os monócitos / macrófagos, e também promovem a sobrevivência de macrófagos e sua diferenciação. Além disso, os macrófagos e as células tumorais produzem proteases da matriz, que são capazes de degradar a MEC, clivar proteínas da MEC e liberar produtos de degradação, tais como

fragmentos de fibronectina e fibrinogênio, além de outros fatores de crescimento e fatores angiogênicos (COUSSENS;WERB, 2002; ALLAVENA et al., 2008).

Macrófagos clássicos ou M1 são caracterizados pela elevada capacidade de apresentação de antígenos, alta produção de IL-12 e IL-23. Eles têm a capacidade citotóxica para células tumorais, bem como para as células que ingeriram microrganismos intracelulares, liberando níveis elevados de intermediários tóxicos, a exemplo do óxido nítrico (NO), intermediários de oxigênio reativo (ROI) e TNF. Os macrófagos M1 ativam o sistema imunológico através da produção de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, provocando resposta imune adaptativa. Com base nisso, os macrófagos M1 são geralmente considerados potentes células efetoras que defendem o organismo contra o ataque dos agentes patogênicos e células tumorais (MONTONAVI et al., 2005; GORDON; TAYLOR, 2005; ALLAVENA et al., 2008; ONG et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Macrófagos M2 têm baixa capacidade de apresentação de antígeno, baixa produção de IL-12, alta produção de IL-10, suprimem respostas inflamatórias, promovem a cura de feridas, angiogênese e remodelação tecidual (GORDON; TAYLOR, 2005; ALLAVENA et al., 2008). Células M2 têm também funções defensivas, na medida em que promovem a morte e encapsulamento de parasitas (NOEL et al., 2004; ALLAVENA et al., 2008; PATIL et al., 2013).

Segundo Allavena et al. (2008), muitos produtos de macrófagos lançados no estroma do tumor podem estimular diretamente o crescimento de células tumorais e/ou promover a migração de células de tumor e metástases. Estes incluem o fator de crescimento epidérmico (EGF), citocinas tais como IL-6 e TNF, bem como as quimiocinas e CXCL12 (MANTOVANI et al., 2002; POLLARD, 2004; SICA et al., 2006). Além disso, TAMs contribuem para a progressão do tumor pela produção de vários fatores que aumentam a neo-angiogênese, a dissolução e remodelação da matriz intersticial. TAMs são uma fonte de potentes moléculas imunossupressoras, tais como a IL-10 e PGE-2, contribuindo para a evasão do tumor (ALLAVENA et al., 2008).

De acordo com Guzmán-Medrano et al. (2012), macrófagos associados a tumores promovem crescimento tumoral e angiogênese através do efeito parácrino, mediada pela via de sinalização do óxido nítrico sintetase endotelial, e o efeito autócrino, estimulando a sua polarização própria para um fenótipo pró-angiogênico/imuno-supressor, macrófagos M2 (CHEN et al., 2011).

A polarização de TAMs em um fenótipo M2 e a presença de vasos anormais foram identificadas como características de malignidade (ROLNY et al., 2011; ZHANG et al., 2014).

De acordo com os mesmos autores, a indução de polarização de macrófagos para um fenótipo M1 promove respostas imunes anti-tumorais, diminuindo o crescimento tumoral e metástase. Além disso, os macrófagos derivados de tecidos tumorais expressam níveis elevados de VEGFs, que regulam a progressão maligna através da estimulação da infiltração leucocitária, da invasão de células tumorais e da angiogênese tumoral (WANG et al., 2011; SUN et al., 2014).

TAMs têm demonstrado contribuir não só com a angiogênese tumoral, mas também na invasão de células de tumor em torno do estroma, com degradação da membrana basal por produção de MMPs, imunossupressão pela expressão de prostaglandina E2 (PGE2), interleucina-10 (IL -10) e TGF- β e metástase através da secreção de fatores como EGF, que podem orientar células tumorais em direção a vasos sanguíneos (LEWIS; POLLARD, 2006; GOMES et al., 2013).

Além disso, TAMs podem secretar uma série de potentes fatores de crescimento pró-angiogênicos e citocinas, tais como VEGF, TNF- α , FGF- β e outras enzimas moduladoras da angiogênese, incluindo a MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 e a COX-2 (POLLARD; LEWIS, 2006; SUN et al., 2014). Lamagna et al. (2006) afirmaram que TAMs podem ter duplo papel dentro do microambiente tumoral. Eles podem atuar em conjunto com células dendríticas maduras e NK, lutando contra as células tumorais. No entanto, quando as células cancerosas começam a escapar da vigilância, TAMs podem atuar promovendo a angiogênese e a progressão do tumor (LAMAGNA et al., 2006; SUN et al., 2014).

Além da angiogênese, TAMs podem promover a linfangiogênese tumoral (SCHOPPMANN et al., 2002; GOMES et al., 2013; DING et al., 2014). Schoppmann et al. (2002) descobriram populações de TAMs em amostras de lesões intraepiteliais escamosas de colo, que expressam o VEGF-C e D, bem como o seu receptor VEGFR-3. Além disso, tem sido demonstrado que o VEGF-C pode ter atividade de recrutar macrófagos, apesar das suas atividades angiogênicas e linfangiogênicas (SKOBE et al., 2001). Infiltração de TAMs tem sido correlacionada com o aumento dos vasos linfáticos peritumorais e prognóstico ruim no adenocarcinoma de pulmão (ZHANG et al., 2010). Além disso, no carcinoma de células escamosas cutâneas, foi descrito que no microambiente tumoral houve um aumento de densidade linfática, com elevados níveis de VEGF-C derivados de macrófagos (MOUSSAI et al., 2011).

2.3.1 MACRÓFAGOS EM TUMORES ODONTOGÊNICOS

No que diz respeito aos estudos dos macrófagos em lesões odontogênicas, ainda existem poucos trabalhos publicados na literatura avaliando a incidência de macrófagos nessas lesões. Nesse sentido, destacam-se os trabalhos realizados por Guzmán-Medrano et al. (2012) e Bracks et al. (2014).

Guzmán-Medrano et al. (2012) estudaram a densidade e distribuição de macrófagos e microvasos em diferentes variantes de ameloblastomas para testar a hipótese de que a alteração na prevalência de macrófagos associados a ameloblastomas se correlacionam com alterações na vasculatura existente na área do tumor, podendo desta forma contribuir para eventual progresso desta neoplasia. Os autores sugeriram que o aumento da angiogênese se correlaciona com um maior número de macrófagos no infiltrado inflamatório nos diversos tipos de ameloblastomas.

Além de Bracks et al. (2014) terem avaliado os mastócitos, eles também avaliaram a distribuição de macrófagos nos CPs. Assim como se deu para os MCs, os macrófagos estavam presentes nos CPs principalmente em regiões IL-6 positivo, indicando que a IL-6 é produzida principalmente por macrófagos e juntos participam da patogênese dos cistos periapicais.

2.4 ANGIOGÊNESE

Um dos processos pelos quais podem ser formados novos vasos sanguíneos denomina-se angiogênese. Esta formação se dá a partir da migração e proliferação de células endoteliais da vasculatura pré-existent (CLAPP et al., 2009; VONG; KALLURI, 2011) e é uma parte essencial do crescimento não só para os tecidos normais, como também os tecidos acometidos por tumores (SHCHORS; EVAN, 2007; BUNGET et al, 2013; GOMES et al, 2013; SUN et al, 2014).

A angiogênese é de fundamental importância em muitos eventos fisiológicos, a exemplo do desenvolvimento embrionário, da implantação da placenta e da reparação de feridas (GADBAIL et al., 2013). A angiogênese contribui para a progressão de doenças como o câncer, retinopatia diabética e artrite reumatóide (MURAMATSU et al., 2000; STAPOR et al, 2014). Diversos processos complexos estão implicados na angiogênese, em que uma

variedade de células e de substâncias biologicamente ativas estão envolvidas na construção de novos vasos sanguíneos (MURAMATSU et al., 2000; GOMES et al., 2013).

Nos tecidos adultos, a angiogênese fisiológica é altamente restrita, e o crescimento capilar ocorre em associação com os processos de reparação de feridas, tais como a cura de uma fratura. O rompimento dos mecanismos que controlam a angiogênese fisiológica tem um grande impacto sobre a saúde. A angiogênese tem sido investigada na proliferação de doenças como câncer, psoríase, artrite, retinopatias, obesidade, asma e aterosclerose (CLAPP et al., 2009).

O processo de angiogênese pode ocorrer de duas formas. A primeira delas é denominada intussuscepção, onde ocorre a formação de pilares teciduais transluminais no interior dos capilares, que se fusionam formando novos vasos sanguíneos (RIBATTI; NICO; CRIVELLATO, 2009; GORDON; MENDELSON; KATO, 2010). A segunda forma ocorre através do brotamento de células endoteliais, a partir de estruturas vasculares pré-existentes para tecidos adjacentes (UCUZIAN et al., 2010).

O processo de angiogênese é regulado pelo equilíbrio homeostático entre fatores pró e anti-angiogênico (CARMELIET; JAIN, 2000; TLSTY; COUSSENS, 2006; GOMES et al., 2013). Quando ocorre o desequilíbrio entre esses fatores, e há grandes concentrações de fatores pró-angiogênicos, inicia-se então o processo de angiogênese. Esse desequilíbrio pode ser estimulado por células do próprio tumor, por células que residem no tecido conjuntivo normal ou por células relacionadas com a inflamação (ALBINI et al., 2005; KERBEL, 2008). As células tumorais têm um papel direto em estimular células endoteliais, enquanto que células inflamatórias exercem efeito indireto sobre a angiogênese, estimulando e recrutando células endoteliais para que ocorra a neovascularização (ALBINI et al., 2005).

Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) são os principais fatores de crescimento envolvidos no processo de angiogênese e vasculogênese (RIBATTI, 2005; DEMIR et al., 2007; CHIEN et al., 2009; KAPOOR et al., 2012). Eles têm um papel importante como mitógenos de células endoteliais (FERRARA et al., 1996; DEMIR et al., 2007). Além dos VEGFs, outros fatores envolvidos nesses processos são os fatores de crescimento fibroblástico ácido e básico (FGF-a, FGF-b) e fator de crescimento epidérmico - EGF (KINGDOM et al., 2000; DEMIR et al., 2007).

A angiogênese tumoral é considerada atualmente como uma prioridade na Oncologia. Evidências numerosas mostraram uma redução significativa do crescimento de tumores, a exemplo do carcinoma de células escamosas da região de cabeça e pescoço, após tratamento anti-angiogênico (MARIONI et al., 2010; GADBAIL et al., 2013). Angiogênese tumoral é

regulada por várias moléculas, tais como VEGF, CD31, CD34, Fator Von-Willebrand e CD105, também chamado de endogлина. Os marcadores pan endoteliais (CD31, CD34, e o fator VIII) e CD105 são expressos diferencialmente na angiogênese e em células endoteliais de vasos pré-existentes (LEGAN, 2005; GADBAIL et al., 2013).

Os tecidos neoplásicos necessitam de oxigênio e nutrientes para sua sobrevivência e crescimento, por isso, eles induzem a formação de novos vasos sanguíneos através da angiogênese (VONG; KALLURI, 2011). Nesse processo, o tecido conjuntivo tem um papel essencial na preservação de tecidos epiteliais e alterações menores no epitélio são seguidas por alterações correspondentes no estroma tecidual (ALAEDDINI et al., 2009).

A angiogênese é representada pelo índice angiogênico que pode ser determinado pelas técnicas da densidade microvascular (MVD), volume microvascular (MVV) e contagem microvascular - MVC (DARVEY et al., 2008) em tecidos tumorais, podendo ser observada por coloração imuno-histoquímica das células endoteliais utilizando-se marcadores tais como CD34 e CD31 (TAO et al., 2007). TETE et al. (2005) encontraram vasos sanguíneos recém-formados em TOQs usando o marcador para CD31 e sugeriram que este marcador é eficiente na identificação de angiogênese.

Embora o CD31 e o CD34 estejam presentes sobre os vasos sanguíneos imaturos, estudos relatam que o CD34 demonstra uma forte expressão e uma menor taxa de falha de imunomarcacão, por isso tem sido previamente utilizado para a avaliação do índice angiogênico em diferentes lesões (TAO et al., 2007; ALAEDDINI et al., 2009).

Segundo Tanaka et al. (2001); Saad et al. (2004); Martone et al. (2005) e Gadbail et al. (2013), a utilização do anti-CD105 para avaliação da angiogênese tumoral por imuno-histoquímica é melhor estimador de progressão tumoral e sobrevivência do tumor do que os marcadores CD31, CD34 e fator VIII. Isso ocorre devido ao fato do CD105 reagir preferencialmente com vasos tumorais neoformados e brotamento de células endoteliais, enquanto que os demais além de reagirem com novos vasos, reagem também com vasos já formados no interior do tumor (TANAKA et al., 2001; FONSATTI; MAIO, 2004; GADBAIL et al., 2013.)

2.4.1 ANGIOGÊNESE EM TUMORES ODONTOGÊNICOS

A angiogênese foi previamente investigada em TOQs, mas o número de estudos nesta área ainda é limitado (ALAEDDINI et al., 2009). É um dos fatores estromais participantes na progressão tumoral e tem sido amplamente investigada em várias lesões (ALAEDDINI et al.,

2009), tais como o líquen plano oral erosivo (TAO et al., 2007), carcinoma de mama (WEIDNER, 1991) e melanoma (MAHABELESHWAR; BYZOVA, 2007).

Kumamoto et al. (2002) visando esclarecer o possível papel da angiogênese em tumores odontogênicos epiteliais, avaliaram a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a densidade de microvasos (MVD) por meio do anticorpo anti-CD34 em ameloblastomas benignos e malignos, comparando-os com os germes dentários. A imunexpressão do VEGF foi detectada em ambos os grupos, tanto no tecido epitelial odontogênico normal, representada pelo germe dentário, quanto em células epiteliais odontogênicas neoplásicas, e fracamente expressa em microvasos próximos ao epitélio odontogênico. A imunexpressão do CD34 foi bem maior nos ameloblastomas malignos e benignos do que no germe dentário, indicando a necessidade aumentada de aporte sanguíneo por células neoplásicas. Devido a esses achados, os autores concluíram que a densidade microvascular elevada depende dos níveis de expressão do VEGF no tumor, sendo o VEGF considerado como um importante mediador da angiogênese nas lesões odontogênicas.

Alaeddini et al. (2009) avaliaram e compararam a angiogênese em TOQs, cistos dentígeros (CDs) e ameloblastomas (AMs), utilizando o anticorpo monoclonal contra CD34, calculando a densidade microvascular (MVD). Seus resultados mostraram que a densidade média de microvasos entre os TOQs, CDs e AM tiveram diferenças estatisticamente significativa. A média de densidade de microvasos foi significamente maior nos ameloblastomas sólidos em comparação com os TOQs e CDs e também foi significativamente maior nos TOQs em relação aos CDs. Assim, os autores sugeriram que a angiogênese pode ser um dos possíveis mecanismos que contribuem para os diferentes comportamentos biológicos de TOQs, CDs e ameloblastomas sólidos.

Chen et al. (2009) avaliaram a angiogênese através do CD34 em ameloblastomas, comparando-os com os TOQs, com o objetivo de avaliar sua influência nos comportamentos clínicos e biológicos desses tumores. Os ameloblastomas malignos mostraram uma maior densidade microvascular, seguida de ameloblastomas recorrentes, ameloblastomas primários e por fim os TOQs. Os estudos de Chen et al. (2009) mostraram que os ameloblastomas possuíam uma rica rede vascular e que sua MVD aumentou com a recorrência e transformação maligna. Os TOQs também apresentaram imunomarcagem para o CD34 em todos os espécimes e apresentou uma MVD bastante elevada.

Nonaka et al. (2012), com objetivo de esclarecer as diferenças de comportamento biológico entre o TOQ associado à Síndrome de Gorlin-Goltz e os tumores odontogênicos quetacísticos isolados, avaliou o índice angiogênico através do CD34 nessas lesões. Embora

os autores não tenham observado diferenças estatisticamente significantes do índice angiogênico entre os grupos de lesões, os autores sugeriram que a agressividade do tumor odontogênico queratocístico associado à síndrome de Gorlin em relação aos TOQs isolados pode ocorrer por possíveis diferenças qualitativa na sua vascularização.

Gadbail et al. (2013) avaliaram o processo de angiogênese em AM, TOQ e CD utilizando o marcador CD105. Os resultados mostraram que a CD105 (endogлина) foi altamente expressa em microvasos de todos os casos de AM e TOQ quando comparados com o CD e a mucosa oral normal. Os autores sugeriram que a angiogênese tumoral pode desempenhar um papel importante no comportamento biológico agressivo do AM e TOQ.

2.5 LINFANGIOGÊNESE

Um dos critérios utilizados para avaliar o prognóstico de uma lesão maligna é a identificação da presença de metástase linfonodal (MARINHO et al., 2008). A principal via de disseminação de células tumorais para os linfonodos ocorre através dos vasos linfáticos (XUAN et al., 2005; RONCATI et al., 2014). No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de formação desses vasos, processo denominado de linfangiogênese (VLEUGEL et al., 2004). Acredita-se que durante a embriogênese, a linfangiogênese possa ocorrer de duas maneiras: uma nova diferenciação do endotélio linfático, através de linfoblastos e/ou através de brotamento de vasos pré-existentes (OLIVER et al., 2002; AGARWAL et al., 2005).

A identificação de vasos linfáticos é difícil em lâminas coradas com HE. Geralmente o diagnóstico se baseia na presença de êmbolos tumorais dentro dos canais vasculares revestidos por uma única camada de células endoteliais sem a presença das células vermelhas sanguíneas. Porém, isso pode ser confundido com artefatos de retração do tecido durante sua fixação (YONEMURA et al., 2006, MARINHO et al., 2008; LAI et al., 2014).

Estudos de vasos linfáticos têm sido limitados pela falta de marcadores específicos e devido a isso sua identificação não tem sido confiável. Alguns anticorpos têm sido utilizados na tentativa de resolver este problema, tais como VEGF-C, LYVE-1 e Prox-1 (KAIPAINEN et al., 1995; BREITENEDER-GELEFF et al., 1999; BANERJI et al. 1999; WIGLE & OLIVER, 1999; STACKER et al., 2001). No entanto, nenhum destes anticorpos apresentou uma marcação específica para vasos linfáticos, podendo também marcar vasos sanguíneos e outros tipos de células (BREITENEDER-GELEFF et al., 1997; VALTOLA et al., 1999;

PARTANEN et al., 2000; JUSSILA & ALITALO, 2002; MOUTA CARREIRA et al., 2001).

Recentemente, o anticorpo monoclonal D2-40 vem sendo utilizado como um marcador seletivo para endotélio de vasos linfáticos e tem sido considerado uma ferramenta confiável e útil na identificação de linfangiogênese em carcinoma de mama (MARINHO et al., 2008) e de câncer de cólon (LAI et al, 2014). O D2-40 (Podoplanina) é uma glicoproteína transmembranar do tipo mucina identificado em podócitos renais (DOBBS et al., 1998; REINHARD et al., 2012). O D2-40 marca apenas o endotélio dos vasos linfáticos e linfangiomas (BREITENEDER-GELEFF et al., 1997, LAI et al, 2014). Em contraste, os hemangiomas, tumores glômicos, angioliomas, granulomas piogênicos, e malformações vasculares não apresentaram quaisquer marcação (KAHN; MARKS, 2002; MARINHO et al., 2008; LAI et al, 2014)

Segundo Cimpean et al. (2011), a formação de novos vasos linfáticos, processo denominado linfangiogênese, foi avaliada em vários tipos de tumores, tais como neoplasias de cólon (DUFF et al., 2007), câncer de mama (LIU et al., 2009) e tumores malignos do esôfago (SAAD et al., 2009). O envolvimento dos vasos linfáticos no desenvolvimento de tumores, progressão e metástases continua a ser um campo de debate (CIMPEAN, 2011). Poucos artigos descrevem a densidade de vasos linfáticos e o papel da linfangiogênese na progressão de neoplasias (LONGATTO-FILHO et al., 2007). A relação entre linfangiogênese e a invasão de câncer cervical foi sugerida e o fator de crescimento endotelial vascular C (VEGF –C) considerado como um possível promotor de metástase nos linfonodos pélvicos no cancer cervical invasivo (HASHIMOTO et al., 2001).

2.5.1 LINFANGIOGÊNESE EM TUMORES ODONTOGÊNICOS

A expressão do D2-40 foi revelado em diferentes órgãos, incluindo tecidos odontogênicos (ZUSTIN et al., 2010). Em estudo recente, o D2-40 foi encontrado fortemente expresso em TOQ (ZUSTIN et al, 2010; OKAMOTO et al, 2010; FRIEDRICH et al, 2012; CAETANO et al. 2013), tumor odontogênico adenomatóide (ZUSTIN et al., 2010;) e ameloblastomas sólidos (GONZALES-ALVA et al., 2009; ZUSTIN et al., 2010).

Gonzalez-Alva et al. (2009) investigaram a expressão e distribuição da podoplanina no ameloblastoma, na tentativa de avaliar o seu papel na progressão do tumor. Além disso, os autores examinaram a presença do marcador epitelial E-caderina e vimentina para investigar sua associação com a expressão da podoplanina. A coloração positiva ao D2-40 observada no ameloblastoma, juntamente com a expressão do marcador epitelial de E-caderina, e a ligeira

ausência de expressão da vimentina sugerem um papel da podoplanina na invasividade do tumor através da migração de células coletivas em que o interruptor E-caderina parece não estar envolvido. Segundo os autores, a coloração específica da podoplanina nos ameloblastomas pode ser uma ferramenta útil para a classificação dos tumores odontogênicos.

Zustin et al. (2010) avaliaram e compararam a expressão da podoplanina em germes dentários, dentes humanos permanentes e lesões odontogênicas – CRs, cistos foliculares (CFs), TOQ, tumor odontogênico adenomatóide (TOA) e AM. Em conclusão, os autores mostraram ser possível a detecção da expressão da podoplanina em tecidos humanos do germe dentário de dentes permanentes e em células da camada basal do epitélio no *front* invasivo de várias lesões odontogênicas epiteliais e sugeriram que esta proteína pode estar envolvida na proliferação celular destas lesões.

Okamoto et al. (2010) examinaram se a expressão da podoplanina está relacionada com o caráter neoplásico e desta forma ser utilizada como um parâmetro útil para avaliação dos TOs. Os autores observaram que a expressão da podoplanina é forte no epitélio dos TOs, porém negativo no ectomesênquima e em estruturas quiescentes e maduras. Esse padrão de expressão, de acordo com os mesmos autores, sugere que a expressão da podoplanina é necessária durante processos que exigem elevadas atividades celulares, tais como proliferação e diferenciação e que nos tumores odontogênicos a podoplanina parece participar no processo de invasão local de tais neoplasias e coordenar o movimento do citoesqueleto.

Friedrich et al. (2012) avaliaram a expressão da podoplanina em TOQs associados à Síndrome de Gorlin-Goltz. De acordo com os autores, a expressão desta proteína é capaz de promover a formação de extensões de células alongadas e aumentar a adesão e migração de células inflamatórias. Além disso, ainda de acordo com os mesmos autores, a expressão da podoplanina no TOQ está possivelmente associada à invasão lenta das estruturas adjacentes e à recidiva característica desta lesão.

Caetano et al. (2013) investigaram a expressão da podoplanina em tumores odontogênicos epiteliais com e sem ectomesênquima com o objetivo de verificar a associação entre sua imunoexpressão e atividade proliferativa em TOQs e cistos odontogênicos ortoqueratinizados. Seus resultados mostraram que a podoplanina pode estar relacionada com a atividade proliferativa no TOQ e pode ter um papel no processo de invasão local de tumores odontogênicos com e sem ectomesênquima.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a participação de componentes celulares estromais (mastócitos, miofibroblastos e macrófagos) e vasculares (CD34 e D2-40) em uma série de TOQ, na tentativa de fornecer subsídios para compreender a interação entre esses componentes e o comportamento biológico distinto desta lesão. Para fins comparativos, cistos radiculares e folículos pericoronários também foram incluídos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Analisar a presença e a localização de mastócitos, miofibroblastos, macrófagos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos no TOQ, CR e FP;

3.2.2 Analisar a relação entre os diferentes componentes celulares (mastócitos, miofibroblastos e macrófagos) e vasos sanguíneos e linfáticos presentes em TOQ, CR e FP;

3.2.3 Correlacionar os achados correspondentes aos diferentes componentes celulares (mastócitos, miofibroblastos e macrófagos) e vasculares (vasos sanguíneos e linfáticos) presentes no TOQ, CR e FP;

4. METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA, para a devida avaliação, e aprovado, sob protocolo 13778513.0.0000.5024, parecer nº 646.081.

4.2 SELEÇÃO DOS CASOS

Foram analisados 30 casos de TOQs obtidos a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA). O diagnóstico histopatológico foi revisado e classificado por um patologista oral com base na classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2005. O experimento foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da FOUFBA em parceria com o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ – Bahia).

A amostra representativa do TOQ foi comparada com 15 casos de CRs obtidos também a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Cirúrgica da FOUFBA e 07 FPs de terceiros molares inclusos, obtidos por meio de cirurgia, realizada no Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) de Camaçari.

4.3 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Para realização da técnica imuno-histoquímica foram utilizados cortes histológicos de 3µm de espessura a partir do material embebido em formol (10%) e incluídos em parafina, sendo os cortes estendidos sobre lâminas de vidro previamente silanizadas. Os cortes histológicos foram desparafinados em dois banhos de xilol por 15 minutos em temperatura

ambiente. Posteriormente, foram re-hidratados em dois banhos de álcool absoluto por 5 minutos em temperatura ambiente. As informações referentes aos anticorpos primários tais como, especificidade, clone, solução recuperadora antigênica, diluição e tempo de incubação estão descritas na tabela a seguir:

Tabela 1. Especificidade, clone, tratamento para recuperação antigênica, diluição e controle dos anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico.

Especificidade	Clone	Recuperação Antigênica	Diluição	Tempo de incubação	Fabricante
Mastcell Triptase	AA1	Tripsina 1% a 37°C	1:50	30 min	DAKO*
SMA	1A4	Citrato pH 6.0 a 98°C	1:150	45 min	DAKO*
CD163	SC/20066	Citrato pH 6.0 a 98°C	1:100	45 min	SANTA CRUZ
CD34	QBEND 10	Citrato pH 6.0 a 98°C	1:50	45 min	DAKO*
Antipodoplanina	D240	Citrato pH 6.0 a 98°C	1:200	45 min	DAKO*

* Dako Corporation, Carpinteria, CA (USA)

Após lavagem em água corrente e dois banhos em água destilada, foi realizada a recuperação antigênica. Em seguida, foi necessário esperar os cortes atingirem a temperatura ambiente, para então serem novamente lavados em água corrente acompanhados de duas passagens em água destilada. Posteriormente, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 10 minutos, protegido da luz, em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% e água destilada.

Após repetir a lavagem em água corrente e água destilada, os cortes histológicos foram imersos em solução de Tris-HCl/BSA 1% (solução salina fosfatada/ soro albumina bovina), Tris-HCl/Triton e água destilada, sendo 5 minutos cada. Em seguida, foi realizado o bloqueio de proteínas (Dako Corporation, Carpinteria, USA) por 10 minutos. Em seguida o anticorpo foi incubado conforme tempo exposto na tabela 1.

Os cortes foram imersos em dois banhos da solução de Tris-HCl/BSA 1% durante 5 minutos. Posteriormente, esses cortes foram incubados com o sistema polimérico de amplificação EnVision (Dako Corporation, Carpinteria, USA) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta etapa foi sucedida por nova imersão em solução de Tris-HCl/BSA 1% como já descrito anteriormente. Para revelação da reação foi utilizado o cromógeno 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 contra-coradas com hematoxilina de Harris por 15 segundos e novamente lavadas. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas.

O controle positivo das reações com os anticorpos *mastcell triptase*, α -SMA, CD163, CD34 e D2-40 foi realizado usando tecidos com conhecida positividade para estes anticorpos. Para o controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por solução de soro não imune.

4.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Após o processamento dos cortes histológicos, cada espécime foi analisado por dois examinadores previamente treinados, à microscopia de luz de alta definição (AXIOSTARPLUS, ZEISS, Germany, 2008), com um aumento de 400x em até 10 campos, e transferidas para um monitor de vídeo por um sistema computadorizado. A captura foi realizada através de uma câmara digital (AXIOCAM ICc3, ZEISS, Germany, 2008).

Para o marcador *mastcell triptase* e, conseqüente avaliação dos mastócitos, foi empregada a metodologia proposta por Pereira et al. (2012) . O exame imuno-histoquímico das células mastocitárias foi realizado identificando a presença ou ausência dessas células no TOQ. Foram considerados positivos os casos onde as células mastocitárias exibiram marcação de cor castanha. Além disso, caracterizou-se o formato das células mastocitárias e presença de degranulação. A quantificação de células positivas ao marcador *mastcell triptase* foi calculada pela proporção do número médio em cada caso. Após esta etapa, calculou-se a densidade das células mastocitárias, dividindo-se o número médio de mastócitos encontrado pela área analisada, obtendo-se uma média de densidade de mastócitos por mm².

Para o marcador *alfa-SMA* e conseqüente avaliação dos MFs, foi empregada a metodologia proposta por Vered et al. (2005). Sob aumento de 100x, imediatamente abaixo do revestimento epitelial, foram selecionados 10 campos de maior imunorreatividade ao anticorpo anti-*alfa-SMA*. Em cada um destes campos, sob aumento de 400x, foram quantificadas as células positivas, excluindo-se aquelas situadas na periferia de vasos sanguíneos. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se

o número total de células positivas ao anti-*alfa-SMA*. Com este último dado, calculou-se a densidade média de células *alfa-SMA* positivas por mm².

Para o anti-CD163 foi utilizada a mesma metodologia empregada para a contagem dos mastócitos.

Para o anti-CD34, foi realizado o exame imuno-histoquímico, identificando a presença ou ausência dos vasos sanguíneos no TOQ, para posterior estabelecimento do índice angiogênico. Foram considerados positivos os casos onde as células endoteliais exibiram marcação de cor castanha. O índice angiogênico foi avaliado por meio da determinação da densidade microvascular (MVD). Para tal fim, a metodologia empregada no estudo de Maeda et al. (1995) foi adaptada ao presente estudo. Sob aumento de 100x, imediatamente abaixo do revestimento epitelial, foram selecionados 10 campos de maior imunorreatividade ao anti-CD34. Posteriormente, sob aumento de 400x, foram quantificados os microvasos em cada um desses campos. Os valores obtidos em cada campo foram somados, estabelecendo-se o número total de microvasos. Finalmente, calculou-se a densidade média de microvasos por mm². Baseando-se nos critérios descritos por Weidner et al. (1991), considerou-se também como microvasos as células imunopositivas isoladas, bem como os grupos de células imunopositivas, independente da presença de um lúmen conspícuo. Além disso, grupos de células endoteliais isoladas que poderiam constituir secções distintas do mesmo microvaso foram consideradas como microvasos distintos e foram excluídos vasos calibrosos com lúmen superior a 50 micrômetros.

Para o anti-D2-40, realizou-se o exame imuno-histoquímico, identificando a presença ou ausência dos vasos linfáticos no TOQ, para posterior estabelecimento do índice linfangiogênico. Considerou-se positivos os casos onde as células endoteliais linfáticas exibiram marcação de cor castanha. O índice linfangiogênico foi avaliado por meio da determinação da densidade microvascular linfática (LMVD) por mm², utilizando-se a metodologia empregada no estudo de Maeda et al. (1995), adaptada para análise deste marcador.

Em adição, foi avaliada a presença de infiltrado inflamatório nos TOQs. Os casos de TOQs em que havia presença de inflamação moderada a intensa foram classificados com inflamação significativa. Quando a presença de infiltrado inflamatório era discreta, os TOQs foram classificados como tendo inflamação não significativa.

Todos os casos de CRs mostraram inflamação significativa.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores dos dados obtidos foram expressos em densidade média/mm² +- desvio padrão. Os cálculos estatísticos foram feitos utilizando o programa MINITAB. 2008. Minitab for Windows [Minitab-Inc, USA] versão 14. English Ink Copyright [C]. Para os testes entre os marcadores segundo o tipo de lesão, foi utilizado o teste de Análise de Variância Simples (One-Way ANOVA) com pós-teste de correção de Tukey. Para a correlação entre os marcadores dentro de uma mesma lesão, utilizamos a Correlação de Pearson ajustada. Para a associação, no TOQ, entre os marcadores e a presença de inflamação, utilizamos o Teste T de Student. Todas as análises foram realizadas com 95% de confiança, ou seja, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$)

5.0 RESULTADOS

Os dados referentes às características clínicas e demográficas dos TOQs e CRs estão dispostos na tabela 2, e os dados referentes ao FPs estão dispostos na tabela 3.

Tabela 2 - Distribuição das características clínicas e demográficas dos pacientes com tumor odontogênico queratocístico e cisto radicular.

Variável	TOQ	CR
Sexo		
Masculino	16	06
Feminino	14	09
Cor		
Faioderma	04	-
Melanoderma	07	-
Parda	03	-
Não Informado	16	15
Idade		
Média	33,6 (08 – 73 anos)	43,13 (17 – 66 anos)
Localização		
Maxila	02	07
Mandíbula	28	02
Não Informado	-	06
Região		
Anterior	05	-
Posterior	25	-
Não informado	-	15
Recidiva		
Sim	03	-
Não	12	-
Não Informado	15	-
N	30	15

N: Número de pacientes; TOQ: Tumor odontogênico queratocístico ; CR: Cisto radicular; “-“ Não se aplica

Tabela 3 - Distribuição das características clínicas e demográficas dos pacientes que foram removidos os folículos pericoronários

Variável	Folículo Pericoronário
Sexo	
Masculino	02
Feminino	05
Cor	
Faioderma	0
Melanoderma	02
Parda	05
Idade	
Média	21,7 (17 – 30 anos)
Localização	
Maxila	0
Mandíbula	07
Pericoronarite associada	
Sim	01
Não	06
Órgão dental totalmente formado	
Sim	05
Não	02
N	07

N: Número de pacientes

5.1 IMUNOEXPRESSÃO DO *MAST CELL TRIPTASE*

As células mastocitárias foram identificadas pela imunorreatividade ao anticorpo *mast cell triptase* que revelou a existência destas células em todos os espécimes de TOQs. Os MCs apresentaram formatos variados, ocorrendo a predominância da forma arredondada e também ovalada (Figura 02 A e Figura 04 A). Sua distribuição ocorreu especialmente no tecido estromal do TOQ (Figura 01 A e B), sendo que quando presentes no revestimento epitelial (Figura 02 B), estas localizavam-se na camada basal e supra-basal, o que foi observado em 12,2% (n=04) dos casos (Figura 02 E e F). Comumente eram visualizados na proximidade de vasos sanguíneos (Figura 01 C e D), e em meio a áreas com presença de infiltrado

inflamatório crônico (Figura 02 C e D) . Após contagem das células e calculada a densidade dos mastócitos/mm², foram constatados valores médios que variaram de 3,4 a 10,1 (média = 7,398 ± 1,653). Além da presença dos MCs contendo grânulos citoplasmáticos marrons, foi observada a presença destes grânulos dispersos em torno das células marcadas, sugerindo degranulação (Figura 01 A e B).

Na análise dos CRs, os MCs foram encontrados em todos os 15 casos, principalmente na região perivascular, na parede de tecido conjuntivo fibroso (Figura 3 C). MCs também estavam presentes tanto em regiões profundas da cápsula fibrosa, quanto em regiões superficiais e sua maior concentração ocorreu próxima a áreas inflamadas (Figura 3 E - G). Frequentemente, visualizamos MCs em processo de degranulação (Figura 3 G e H). Em alguns espécimes visualizamos mastócitos distribuídos no interior do revestimento epitelial cístico e no lúmen cístico (Figura 03 A- D). A densidade dos mastócitos no CR apresentou valores médios que variaram de 10,63 a 38,29 (média = 22,7 ± 8,15).

Nos FPs, os mastócitos foram encontrados em 57,14% (n=04) dos casos analisados (Figura 04 B). Em 42,86% (n=3) houve ausência completa de células mastocitárias. A densidade dos mastócitos no FP apresentou valores médios que variaram de 0,0 a 5,78 (média = 1,234 ± 2,072). A figura 04 mostra um mastócito degranulando no FP.

Os resultados da análise estatística ANOVA da densidade de mastócitos/mm² estão dispostos na tabela 04 e sua representação gráfica está exposta no Gráfico 1 (pg. 47).

Tabela 4- Resultado da análise estatística ANOVA da densidade média dos mastócitos/ mm²

Variável	(n)	Média	Desvio Padrão	P. Valor
Expressão Mastcell				
TOQ	30	7,398	1,653	0,00*
CR	15	22,70	8,15	0,00*
FP	7	1,234	2,072	

n: número de lesões; CR: Cisto radicular; FP: Folículo pericoronário, TOQ: Tumor odontogênico queratocístico; (*) Estatisticamente significativo

Estatisticamente, houve diferença significativa entre a densidade de células mastocitárias presentes nos CRs (22,7 ±8,15) em relação com os FPs (1,23 ± 2,072) e TOQs

($7,398 \pm 1,653$), com um p valor= 0,00. Além disso, houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade mastócitos no TOQ em relação aos FP, com um p valor = 0,00.

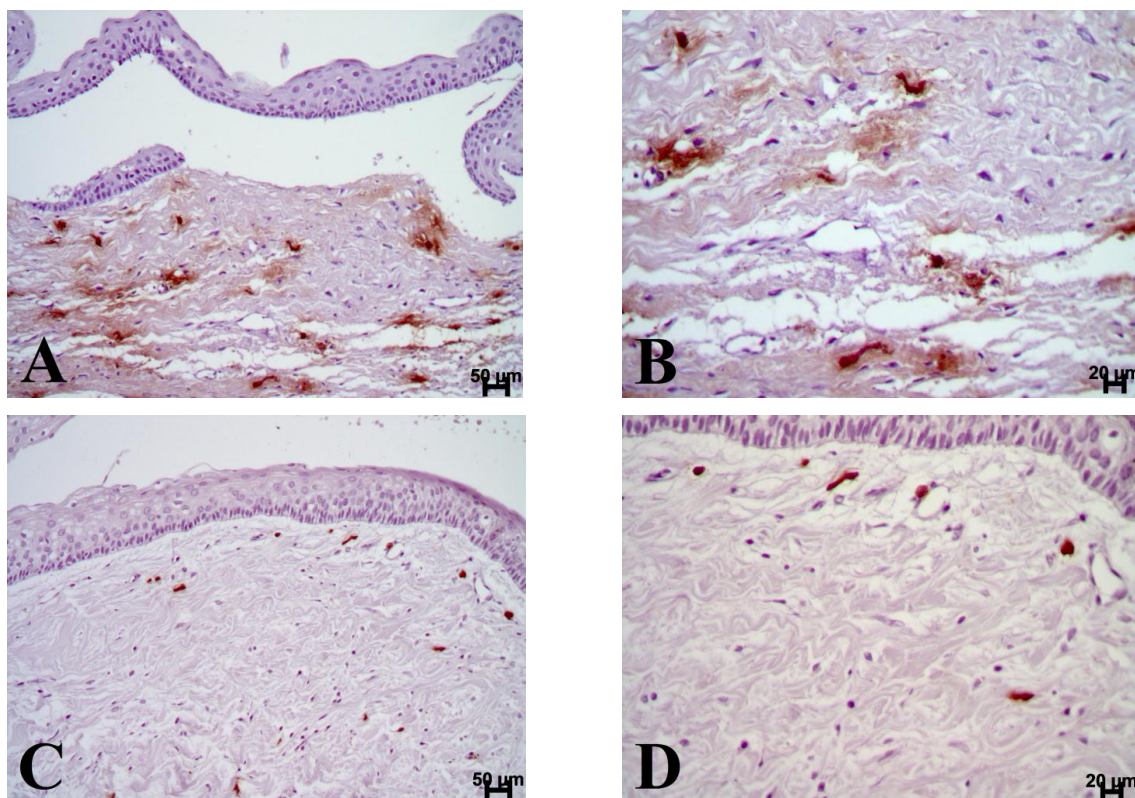


Figura 1. **Tumor odontogênico queratocístico.** A – numerosas células mastocitárias presentes ao longo da parede fibrosa – B – Detalhe da figura anterior mostrando células com formato variado na parede fibrosa – C – Mastócitos alongados concentrados na região mais superficial da parede fibrosa, mas também distribuídos mais profundamente – D – Detalhe da figura anterior mostrando mastócitos próximos de vasos sanguíneos.

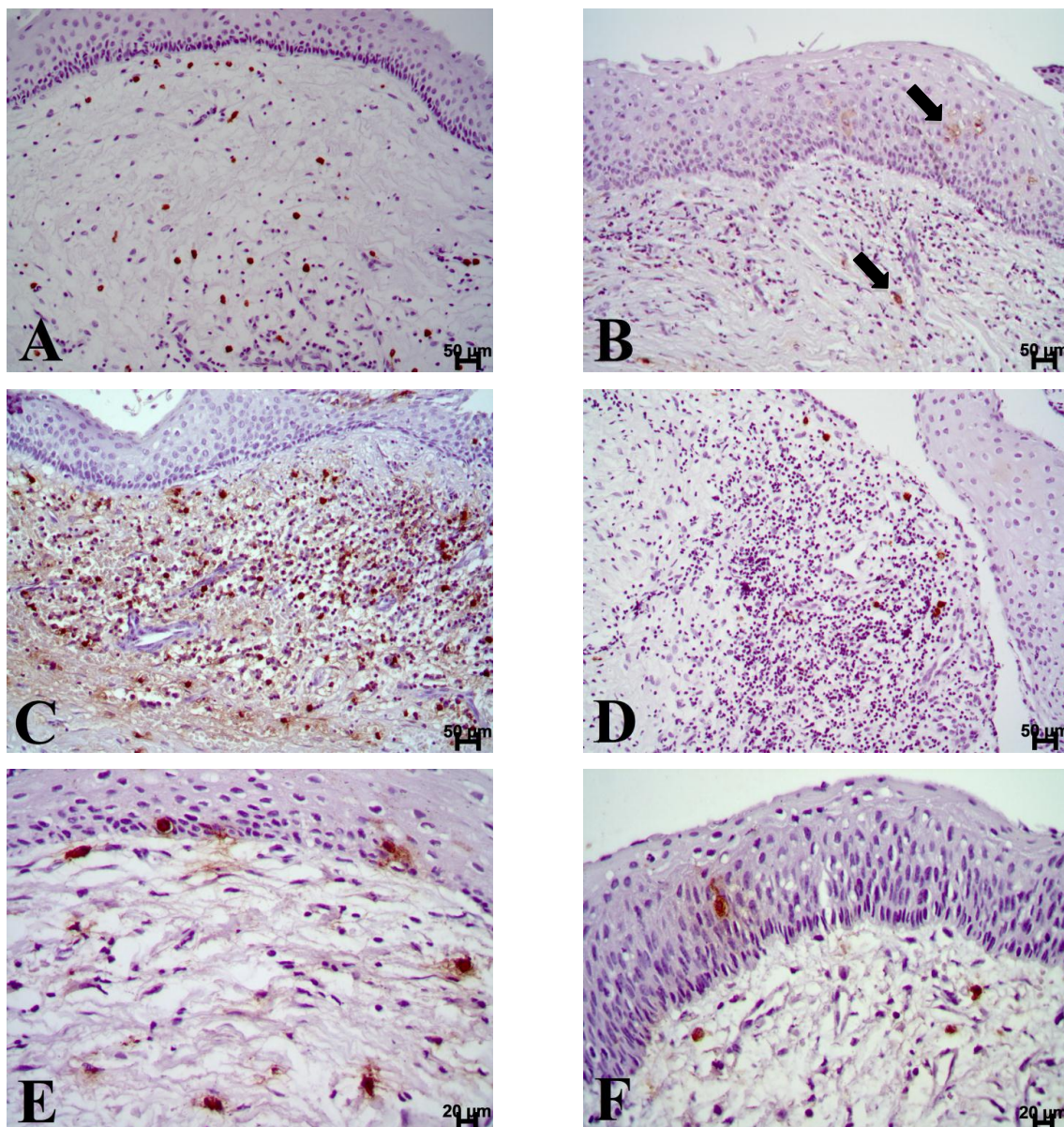


Figura 2. **Tumor odontogênico queratocístico com inflamação.** A - Mastócitos arredondados e ovalados distribuídos próximos ao epitélio de revestimentos e concentrados em meio a raras células inflamatórias crônicas – B – Raros mastócitos em meio a discreta inflamação crônica e dentro do epitélio de revestimento – C – Numerosos mastócitos de formatos variados em meio a moderada inflamação crônica – D – Poucos mastócitos em meio a marcante inflamação crônica – E – Mastócitos acumulados dentro da camada basal do epitélio de revestimento e por entre raras células inflamatórias crônicas – F – Mastócitos dendríticos na superfície epitelial e arredondados na parede fibrosa também com raras células inflamatórias crônicas.

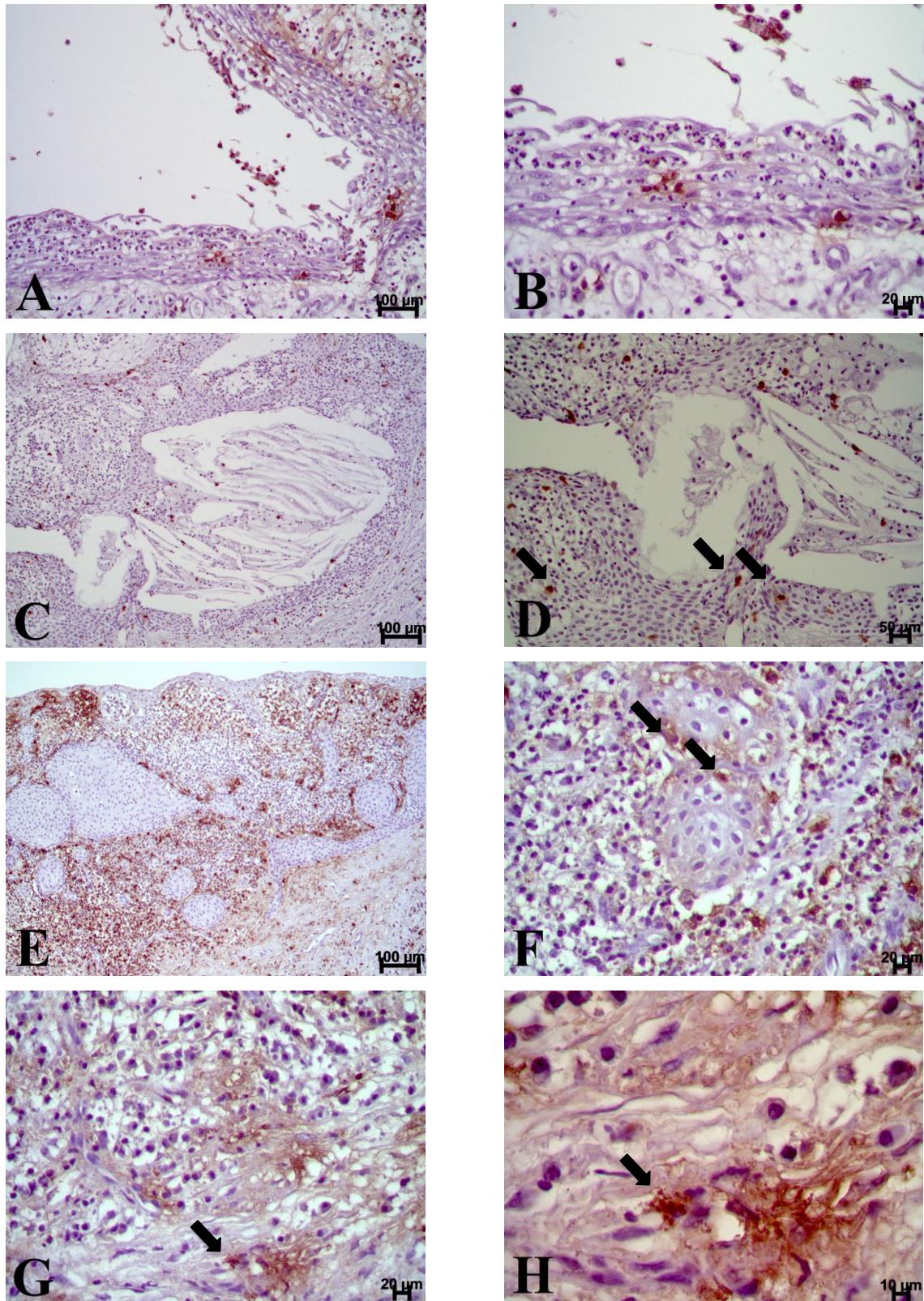


Figura 3. **Cisto radicular.** A – Mastócitos distribuídos no interior do revestimento epitelial cístico, arredondados, no lúmen cístico e no topo direito junto com células inflamatórias crônicas – B – Detalhe da figura anterior mostrando mastócitos intraepiteliais e no lúmen cístico – C – Mastócitos distribuídos ao longo do revestimento epitelial cístico, na parede fibrosa e no lúmen cístico – D – Mastócitos intraepiteliais e por entre fendas de colesterol – E – Numerosos mastócitos ao longo de significativa inflamação crônica e circundado proliferações epiteliais semelhantes ao tumor odontogênico escamoso – F – Mastócitos distribuídos ao longo de marcante inflamação crônica e dentro dos restos epiteliais odontogênicos – G – Mastócitos ao longo de inflamação e degranulando-se – H – Detalhe da foto anterior mostrando mastócitos degranulando-se.

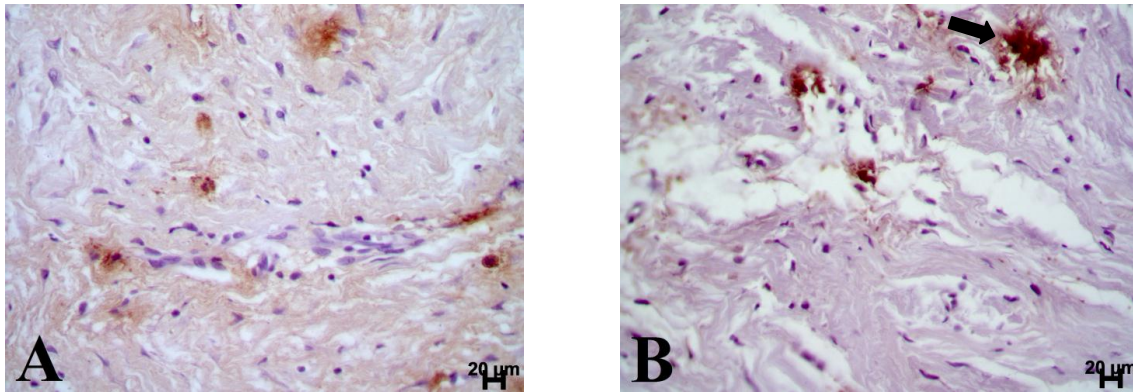


Figura 4. A – Tumor odontogênico queratocístico. Mastócitos alongados e arredondados – B – Folículo pericoronário. Mastócito degranulando (seta).

5.2 IMUNOEXPRESSÃO DO SMA

A avaliação dos MFs, identificados pela imunorreatividade ao anti- *alfa-SMA*, revelou a existência deste componente celular em todas as amostras de TOQ (n=30) analisadas (Figura 05 A – H). Sua morfologia variou do fusiforme ao estrelado (Figura 05 A e B). Estas células estavam localizadas no estroma, logo abaixo do epitélio, na maioria das vezes de forma isolada, dispostas ou não paralelamente à superfície epitelial (Figura 05 C e D). Nas áreas em que não havia revestimento epitelial, o estroma demonstrou ausência de MFs. Eventualmente, encontramos MFs em áreas inflamadas (Figura 05 E e F), embora na maioria das vezes tenhamos identificado este componente celular em áreas com ausência de inflamação. Foram observados valores médios que variaram de 7,44 a 49,46 (média= $29,25 \pm 15,18$). O músculo liso das paredes dos vasos sanguíneos das amostras também demonstraram positividade para α -SMA em todos os espécimes, mas foram excluídos da análise.

A análise do *anti-SMA* nos CRs revelou existência de MFs em 100% dos casos (n=15) analisados (Figura 06 A-F). Sua morfologia apresentou-se sob formas variadas, abaixo do epitélio cístico e na profundidade da parede fibrosa (Figura 05 G e H). Na presença de tecido de granulação, os MFs apresentaram diferentes formatos (Figura 06 D). Foram encontrados valores médios que variaram de 1,1 a 8,82 (média = $4,66 \pm 2,598$).

Nos FPs, apesar da análise do marcador *anti-SMA* revelar existência de MFs em 100% dos casos (n=7) analisados (Figura 06 G), eles não eram frequentes. Sua morfologia

apresentou apenas o formato fusiforme (Figura 06 G). Foram encontrados valores médios que variaram de 1,06 a 2,06 (média = $1,49 \pm 0,445$).

Os resultados da análise estatística ANOVA da densidade de miofibroblastos/mm² estão dispostos na tabela 05 e sua representação gráfica está exposta no Gráfico 1 (pg. 47).

Tabela 5- Resultado da análise estatística ANOVA da densidade média dos miofibroblastos/mm²

Variável	(n)	Média	Desvio Padrão	P. Valor
Expressão α - SMA				
TOQ	30	29,25	15,18	0,00*
CR	15	4,663	2,60	
FP	7	1,50	0,445	

n: número de lesões; CR: Cisto radicular; FP: Folículo pericoronário; TOQ: Tumor odontogênico queratocístico;(*) Estatisticamente significativo

Estatisticamente, houve diferença significativa entre a densidade de MFs presentes nos TOQs ($29,25 \pm 15,18$) em relação aos CRs ($4,663 \pm 2,598$) e os FPs ($1,50 \pm 0,44$), com um p valor= 0,00. A diferença da densidade de MFs entre os CRs e FPs não foi estatisticamente significante ($p > 0.05$).

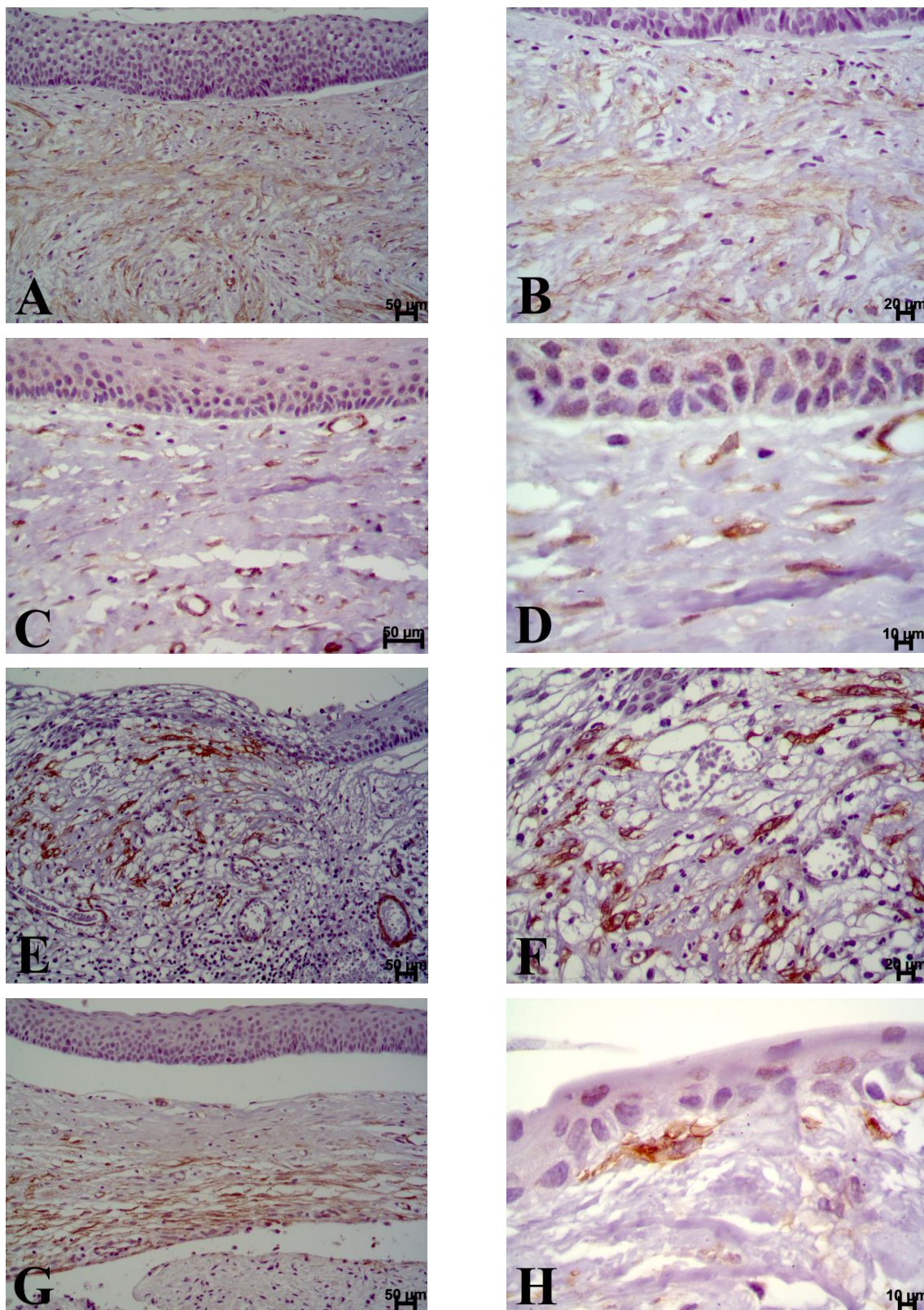


Figura 5. **Tumor odontogênico queratocístico.** A – Miofibroblastos fusiformes presentes em diferentes direções por toda a parede cística – B – Detalhe da figura anterior – C – Miofibroblastos fusiformes assumindo uma posição mais paralela em relação a superfície epitelial – D – Detalhe da figura anterior – E – Notar marcante presença de miofibroblastos fusiformes ou não, concentrados em área de tecido de granulação e a direita onde o revestimento epitelial não sofreu alteração ou modificação, observar ausência de miofibroblastos. – F – Detalhe da figura anterior – G – Miofibroblastos fusiformes dispostos paralelamente a superfície epitelial mais concentrados na profundidade da parede cística – H – Detalhe morfológico de um miofibroblasto fusiforme posicionado na região subepitelial.

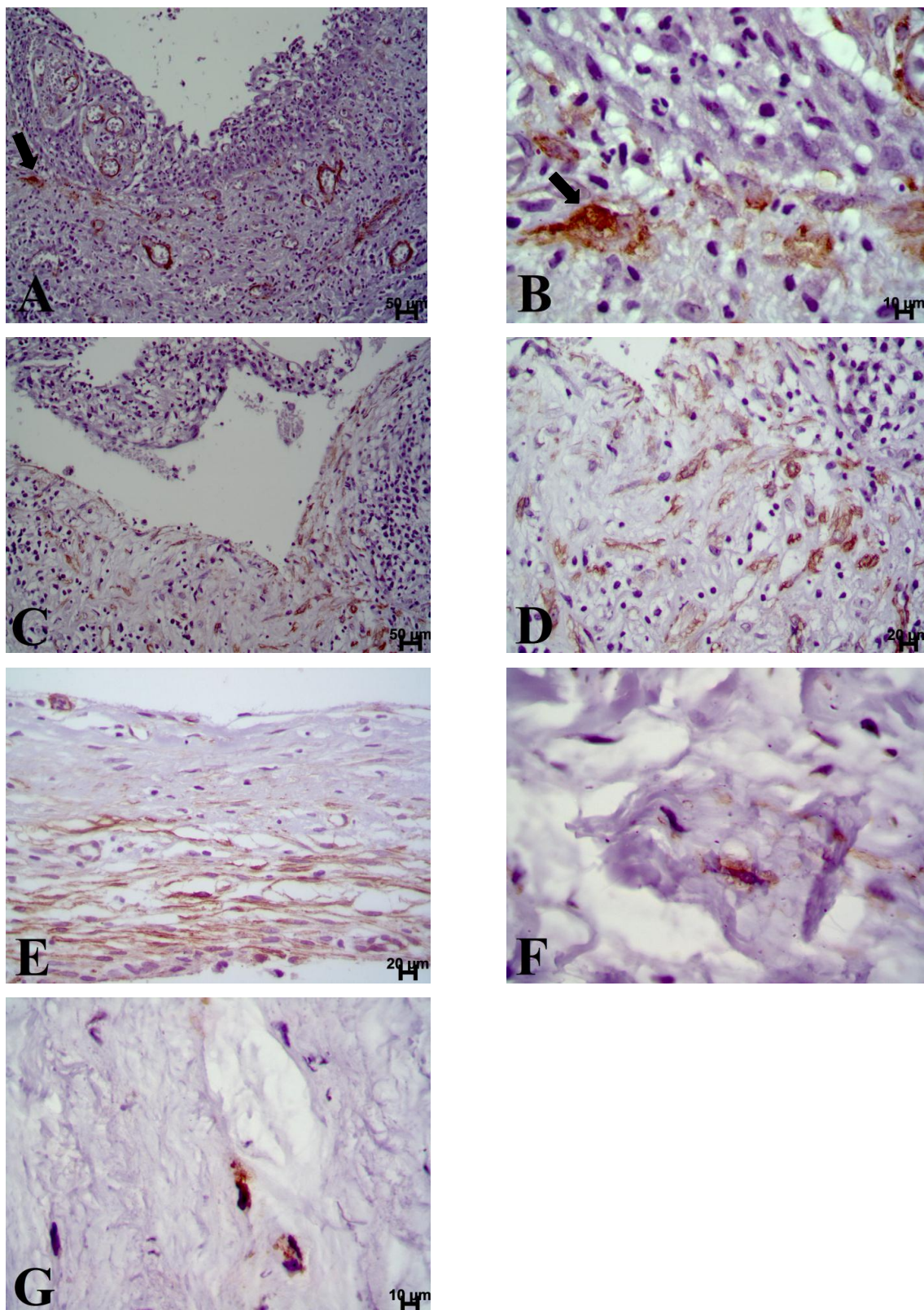


Figura 6. **Cisto radicular.** A – Observar poucos miofibroblastos paralelos ao revestimento cístico (seta) ao lado de vasos sanguíneos – B – Detalhe da figura anterior mostrando um miofibroblasto volumoso e fusiforme (seta) – C – Miofibroblastos fusiformes ao longo da parede cística – D – Detalhe da figura anterior mostrando miofibroblastos de formato ovalar e fusiforme ao lado de inflamação crônica – E – Concentração de miofibroblastos fusiformes paralelos a superfície epitelial e dispostos na profundidade da parede cística – F – Miofibroblastos fusiformes na parede cística – G – **Folículo pericoronário.** Miofibroblasto fusiforme.

5.3 IMUNOEXPRESSION DO CD163

Os macrófagos CD163⁺ estavam presentes em 73,33 % dos casos de TOQ (n=22). Observou-se células arredondadas na maioria das vezes, contendo no seu interior grânulos castanho-pardo. A sua distribuição ocorreu abaixo do revestimento epitelial e, quando a inflamação era significativa, em regiões mais profundas na cápsula fibrosa (Figura 07 A - D). Encontramos também em 6,6% (n=2), macrófagos localizados no epitélio do tumor (Figura 07 B) Foi observada uma densidade média de macrófagos marcados positivamente pelo CD163 que variaram de 0,00 a 9,78 (média= 2,31± 2,921).

Nos CRs, observou-se imunomarcção positiva do CD163 em 80% dos casos (n=12) analisados (Figura 07 E). Em três espécimes (20%) não foram encontrados macrófagos CD163⁺

Os macrófagos foram encontrados em áreas superficiais e profundas, independentemente da presença ou não de inflamação. Encontrou-se valores médios que variaram de 0,0 a 4,25 (média= 1,42 ± 1,362).

Nos FPs, observou-se imunomarcção positiva em 71,42% dos casos (n=5) analisados (Figura 07 F), mas os macrófagos não eram frequentes. Em dois espécimes (28,58%) não foram encontrados macrófagos. Encontrou-se valores médios que variaram de 0,0 a 0,53 (média= 0.143 ± 0,151).

Os resultados da análise estatística ANOVA da densidade dos macrófagos/mm² estão dispostos na tabela 06 e sua representação gráfica está exposta no Gráfico 2 (pg. 47).

Tabela 6- Resultado da análise estatística ANOVA da densidade média dos macrófagos/mm²

Variável	(n)	Média	Desvio Padrão	P. Valor
Expressão CD 163				
TOQ	30	2,310	2,921	0,084
CR	15	1,423	1,362	
FP	7	0,143	0,151	

n: número de lesões; CR: Cisto radicular; FP: Folículo pericoronário; TOQ: Tumor odontogênico queratocístico.

Estatisticamente, não houve diferença significativa entre a densidade de macrófagos presentes nos TOQs ($2,310 \pm 2,921$), CRs ($1,423 \pm 1,362$) e FPs ($0,143 \pm 0,151$), com um p valor= 0,084.

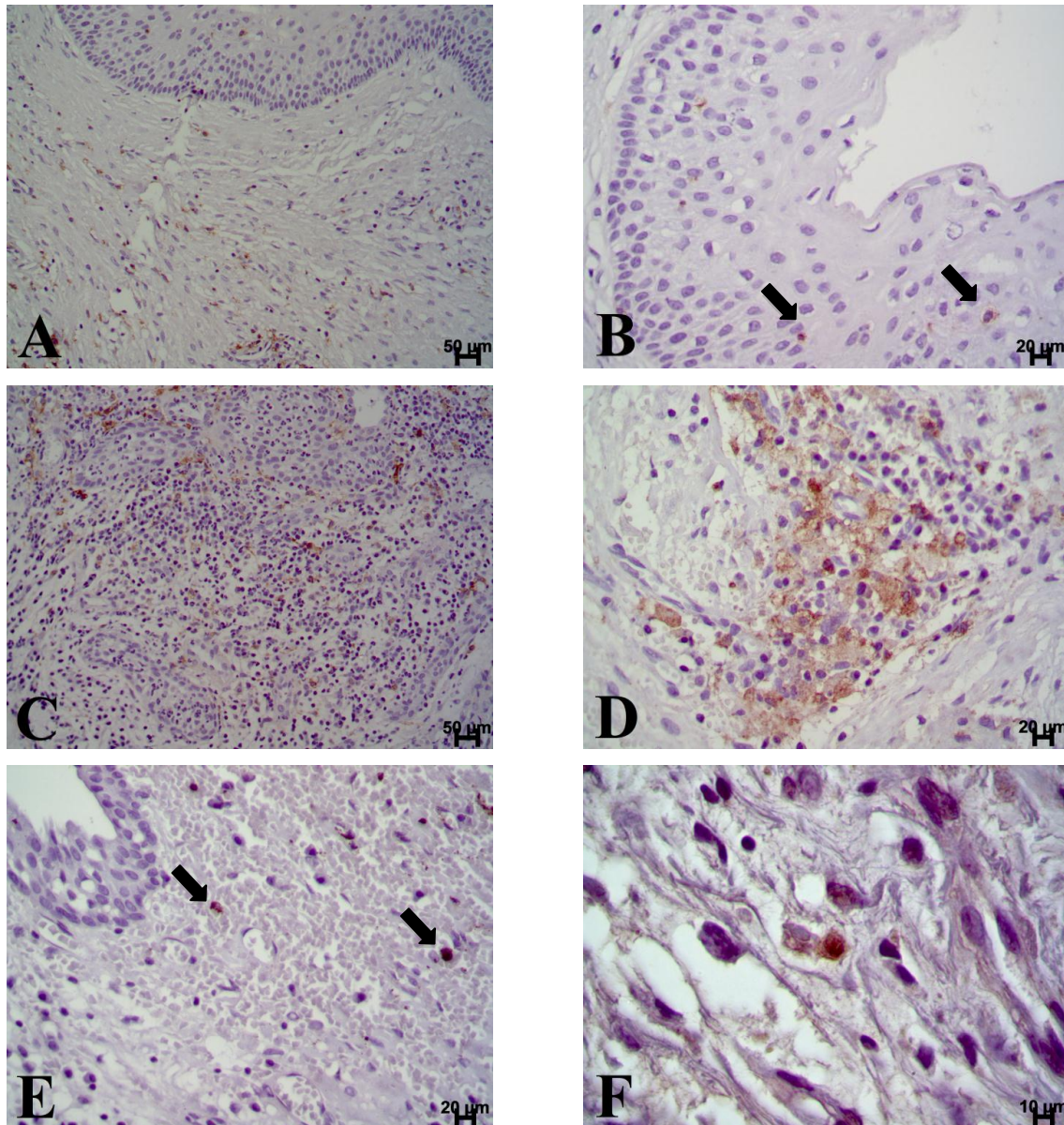


Figura 7. **Tumor odontogênico queratocístico.** A – Presença de macrófagos CD163 positivos ao longo da parede fibrosa e no revestimento epitelial cístico – B – Notar célula CD163 positiva (setas) dentro do revestimento epitelial cístico – C – Lesão modificada por tecido de granulação e inflamação crônica marcante mostrando células CD163 positivas quer na parede fibrosa quer na superfície epitelial – D – Numerosos macrófagos CD163 positivos em área com inflamação crônica – E – **Cisto radicular.** Poucos macrófagos na parede fibrosa (setas) – F – **Folículo pericoronário.** Macrófagos CD163 positivos da parede do folículo.

5.4 IMUNOEXPRESSÃO DO CD34

A avaliação do marcador anti-CD34 nos TOQs revelou sua imunopressão em células endoteliais de vasos com lúmen compíscuo, grupos de células endoteliais sem um lúmen vascular distinto e células endoteliais isoladas (Figura 08 A e B). A análise do índice angiogênico, por meio da MVD no TOQ demonstrou valores médios que variaram de 5,53 a 27,3, com uma média de $16,58 \pm 5,98$.

A análise do índice angiogênico, por meio da MVD nos CRs, demonstrou valores médios que variaram de 4,68 a 25,53, com uma média de $14,09 \pm 5,83$. As células marcadas positivamente pelo CD34 localizaram-se em 100% dos casos na cápsula fibrosa dos CRs, e sua maior concentração deu-se próximo ao infiltrado inflamatório (Figura 08 C).

Nos FPs, a avaliação do marcador anti-CD34 revelou sua imunopressão em 100% dos casos - n=7 (Figura 08 D). A análise do índice angiogênico, por meio da MVD no FP, demonstrou valores médios que variaram de 5,42 a 20,00, com uma média de $13,32 \pm 4,85$.

Os resultados da análise estatística ANOVA da densidade microvascular/mm² estão dispostos na tabela 07 e sua representação gráfica está exposta no Gráfico 3 (pg. 47).

Tabela 7- Resultado da análise estatística ANOVA da MVD média/mm²

Variável	(n)	Média	Desvio Padrão	P. Valor
Expressão CD 34				
TOQ	30	16,58	5,98	0,244
CR	15	14,09	5,83	
FP	7	13,32	4,85	

n: número de lesões; CR: Cisto radicular; FP: Folículo pericoronário; TOQ: Tumor odontogênico queratocístico; MVD: Densidade microvascular; (*) Estatisticamente significativo

Estatisticamente, não houve diferença significativa entre a densidade microvascular dos TOQs ($16,58 \pm 5,98$), FPs ($13,32 \pm 4,85$) e CRs ($14,09 \pm 5,83$) com um p valor= 0,244.

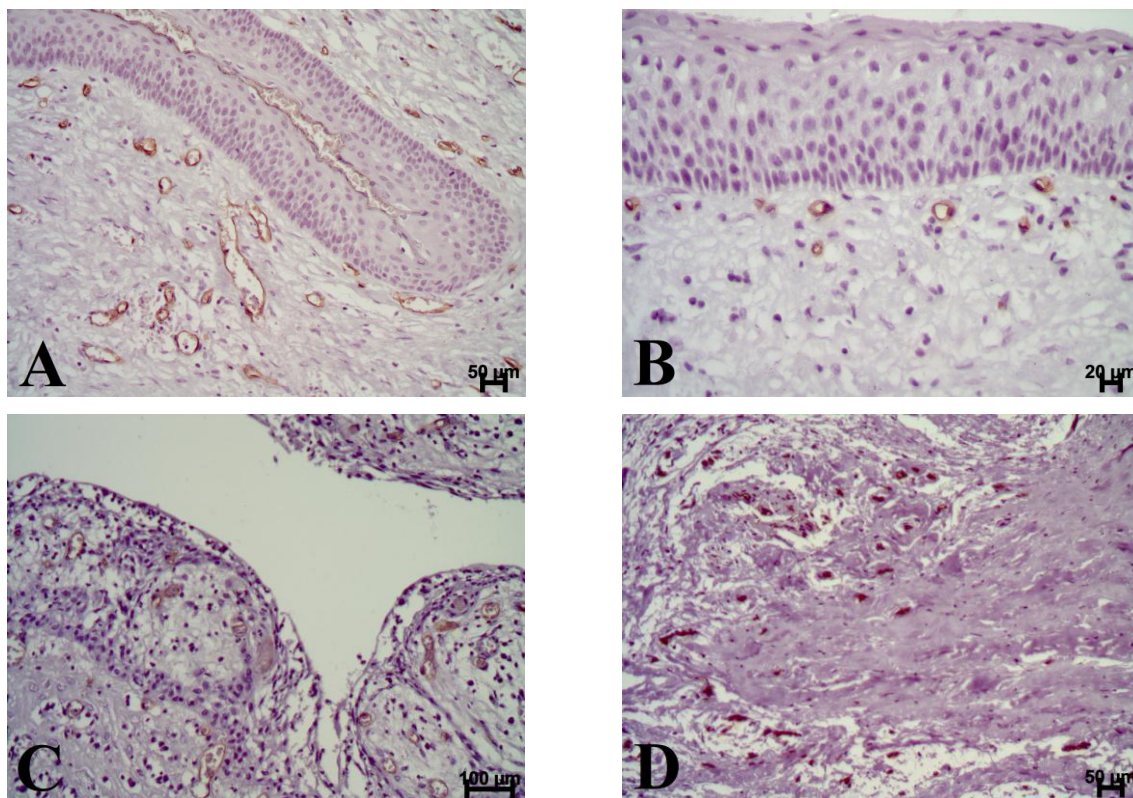


Figura 8. **Tumor odontogênico queratocístico** – A – Numerosos vasos sanguíneos CD34 positivos próximos ou não ao revestimento epitelial cístico – B – Vasos sanguíneos concentrados próximos a revestimento epitelial cístico – C – **Cisto radicular**. Tecido de granulação com vasos neoformados – D – **Folículo pericoronário**. Vasos sanguíneos CD34 positivos na parede fibrosa do folículo.

5.5 IMUNOEXPRESSÃO DO D2-40

A avaliação do marcador D2-40 demonstrou sua imunoposição em vasos linfáticos com lúmen conpíscuo e grupos de células linfáticas sem um lúmen vascular distinto. Vasos linfáticos foram encontrados em 96,6 % dos TOQs analisados (n=29), mas eram mais evidentes em locais distantes do epitélio (Figura 09 A e B). A análise do índice linfangiogênico, por meio da densidade microvascular linfática (MVDL) nos TOQs demonstrou valores médios que variaram de 0,0 a 28,29, com média de $11,64 \pm 6,56$. Uma forte expressão do D2-40 foi encontrada na membrana celular e no citoplasma das células epiteliais da camada basal e supra-basal (Figura 09 C – F) em 100% dos TOQs analisados (n=30). As células periféricas dos cistos satélites, quando presentes, também demonstraram imunorreatividade membranar e citoplasmática para o D2-40.

A avaliação do marcador D2-40 nos CRs mostrou sua imunexpressão em vasos linfáticos com lúmen vascular conpíscuo. Observamos expressão variável da podoplanina na membrana celular e no citoplasma das células epiteliais (Figura 10 A-C). A análise do índice linfangiogênico, através da DMVL nos CRs revelou valores médios que variaram de 0,0 a 5,31 (média= 4,19 ± 1,253). Foram encontrados vasos linfáticos de forma escassa e estes estiveram presentes em 93,3% dos CR analisados (n=14), no tecido de granulação.

A avaliação do marcador D2-40 nos FPs mostrou imunexpressão em 57,14% (n=4) dos casos. Em três espécimes (42,86%) não houve marcação para o referido anticorpo. Em alguns espécimes, houve marcação em restos epiteliais quando estes estiveram presentes (Figura 10 D e E). A análise do índice linfangiogênico, através da DMVL nos FPs revelou valores médios que variaram de 0,0 a 0,55, com uma média=0,167 ± 0,224.

Os resultados da análise estatística ANOVA da densidade microvascular linfática/mm² estão dispostos na tabela 08 e sua representação gráfica está exposta no Gráfico 3 (pg. 47).

Tabela 8- Resultado da análise estatística ANOVA da LMVD média/mm²

Variável	(n)	Média	Desvio Padrão	P. Valor
Expressão D2 – 40				
TOQ	30	11,64	6,56	0,00*
CR	15	4,19	1,253	
FP	7	0,167	0,224	

n: número de lesões; CR: Cisto radicular; FP: Folículo pericoronário; TOQ: Tumor odontogênico queratocístico; LMVD: Densidade microvascular linfática; (*) Estatisticamente significativo

Estatisticamente, houve diferença significativa entre a densidade microvascular linfática presente nos TOQs (11,64 ± 4,19) em relação com os CRs (4,19 ± 1,253) e os FPs (0,167 ± 0,224), com um p valor= 0,00. A diferença entre a densidade de miofibroblastos entre os CRs e FPs não foi estatisticamente significativa.

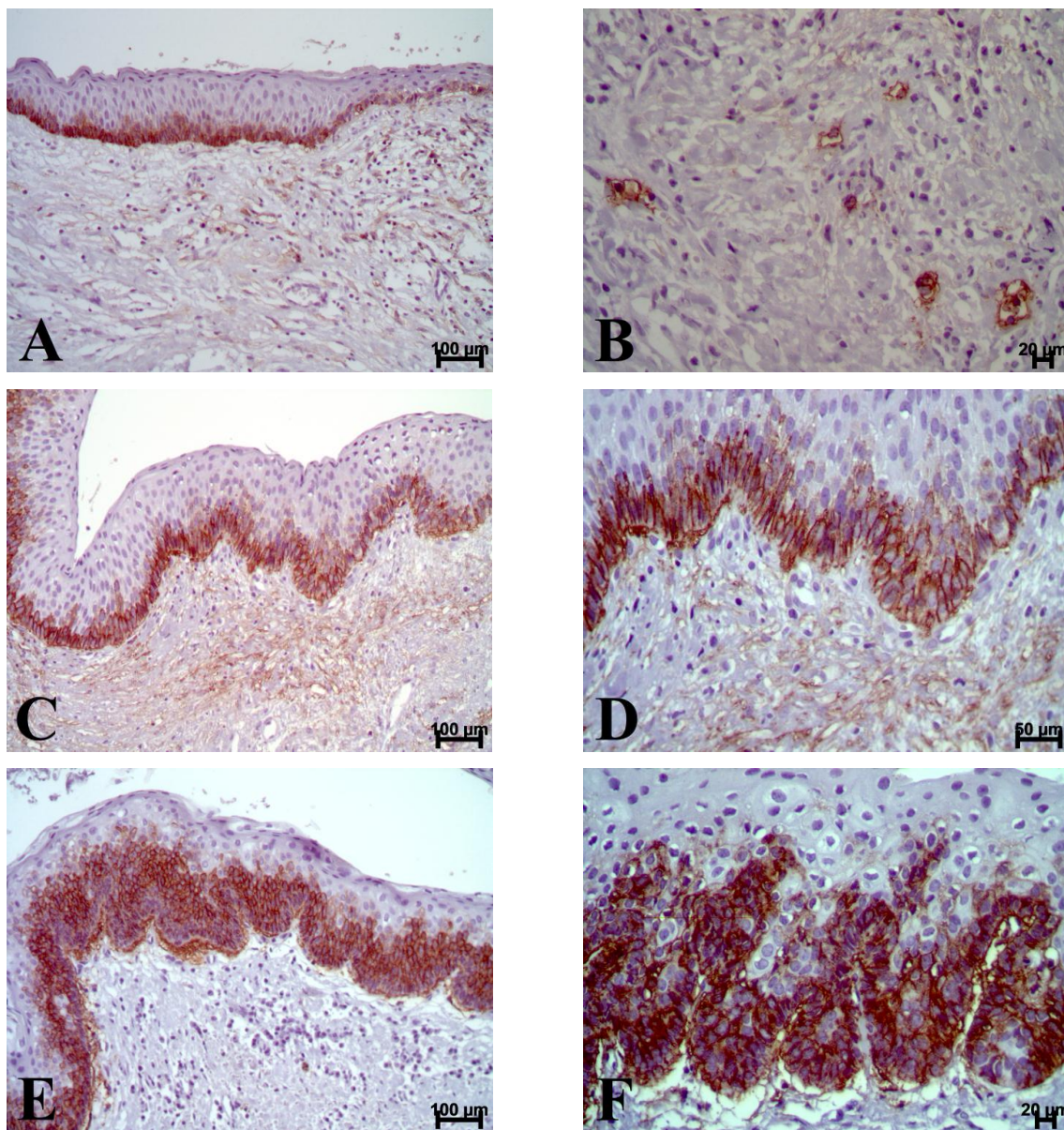


Figura 9. **Tumor Odontogênico queratocístico.** A – Camada basal e suprabasal do revestimento epitelial cístico positivo ao D2-40; notar vasos também positivos na parede fibrosa – B – Vasos linfáticos D2-40 positivos – C – Revestimento epitelial cístico com células basais e suprabasais, bem como vasos e células estromais positivos ao D2-40 – D – Detalhe da figura anterior – E e F – Revestimento epitelial cístico com brotamentos epiteliais positivos ao D2-40; notar que a profundidade atinge até mais do 1/3 do revestimento epitelial.

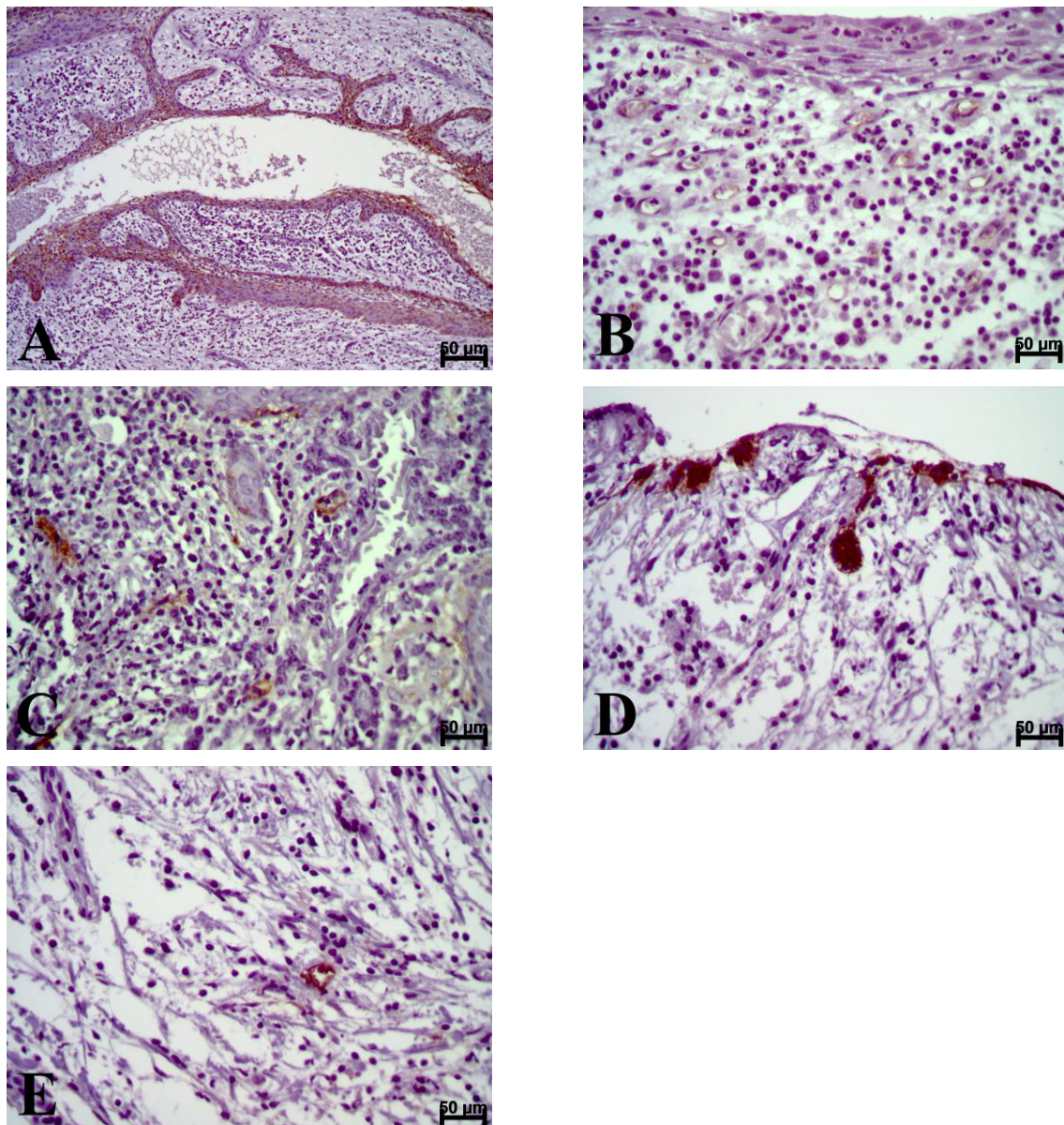


Figura 10. **Cisto radicular**. A – Revestimento epitelial cístico com positividade das células epiteliais em todos os seus extratos ao D2-40 – B e C– Tecido de granulação com vasos linfáticos D2-40 positivos – D– **Folículo pericoronário**. Revestimento epitelial e remanescentes epiteliais positivos ao D2-40 – E - Pequeno vaso linfático positivo ao D2-40.

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE ESTATÍSTICA ANOVA

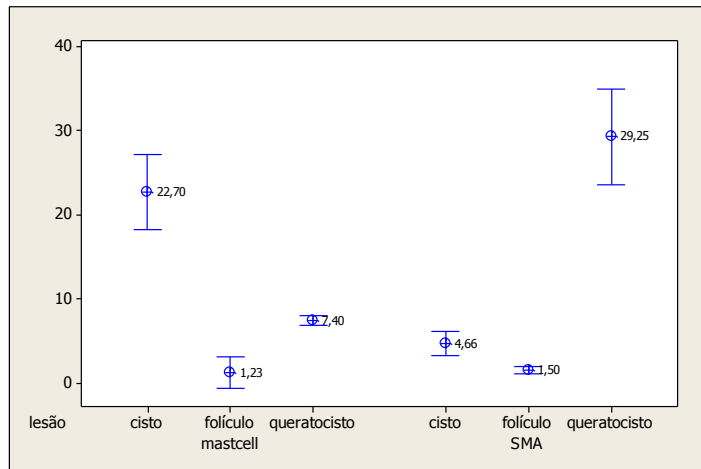


Gráfico 1 - Interval Plot Of *Mastcell Triptase; Alfa - SMA* Vs Lesão

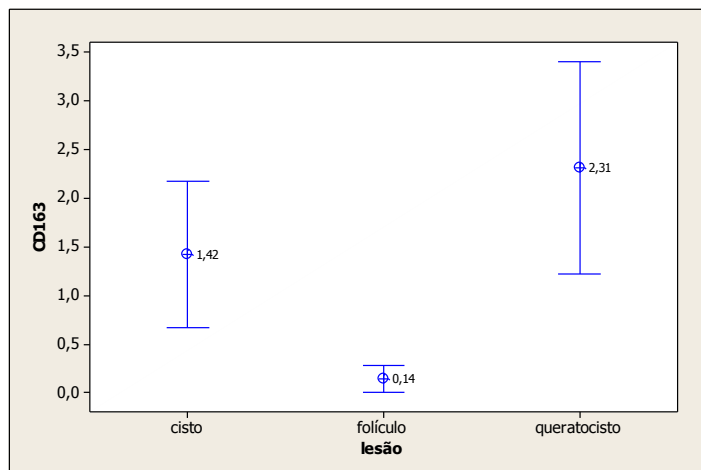


Gráfico 2. Interval Plot of CD163 vs lesão

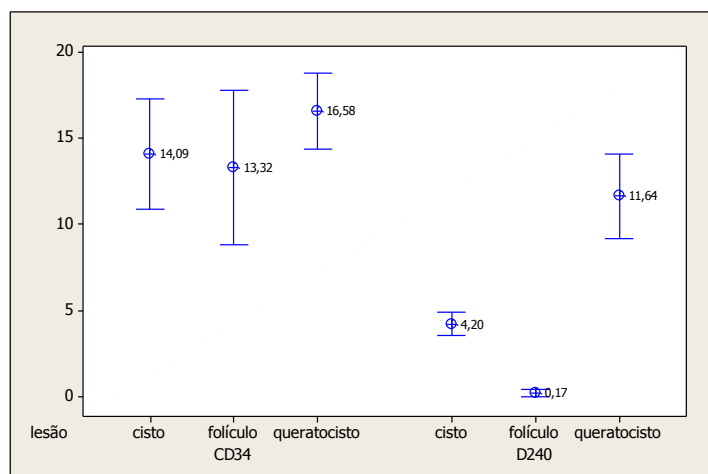


Gráfico 3. Interval Plot of CD34; D240 vs lesão

5.6 INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Alguns queratocistos mostraram inflamação, sendo significante em 33,33% (n =10) e não significante em 66,67 (n=20). Já nos CRs, em todos os casos observou-se inflamação significante.

Estatisticamente, o teste T de Student não mostrou valor com significado estatístico na associação dos marcadores com a presença de inflamação. ($P_{\text{mastcell} \times \text{inflamação}} = 0,341$; $P_{\text{sma} \times \text{inflamação}} = 0,401$; $P_{\text{CD163} \times \text{inflamação}} = 0,276$; $P_{\text{CD34} \times \text{inflamação}} = 0,528$; $P_{\text{D2-40} \times \text{inflamação}} = 0,148$)

5.7 CORRELAÇÃO DE PEARSON

A tabela 9 mostra os resultados do teste de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas.

Tabela 9 - Resultado da Correlação de Pearson ajustada entre os marcadores dentro de uma mesma lesão.

Variables	TOQ		CR		FP	
	Pearson Correlation	P-Valor	Pearson Correlation	P-Valor	Pearson Correlation	P-Valor
Mastcell x α - SMA	- 0,112	0,557	- 0,046	0,870	- 0,300	0,514
Mastcell x CD34	0,409	0,025*	0,261	0,348	0,106	0,822
Mastcell x D2 - 40	- 0,012	0,949	- 0,055	0,846	0,023	0,961
Mastcell x CD163	0,091	0,634	- 0,201	0,473	-0,039	0,934
α - SMA x CD34	- 0,022	0,910	- 0,603	0,017*	- 0,756	0,049*
α - SMA x D2 - 40	0,204	0,281	0,370	0,175	0,106	0,822
α - SMA x CD163	0,276	0,140	- 0,213	0,445	0,221	0,633
CD34 x D2 - 40	0,028	0,885	0,095	0,736	0,355	0,435
CD34 x CD163	- 0,072	0,704	0,148	0,598	0,179	0,701
D2 - 40 x CD163	- 0,225	0,232	0,087	0,759	0,235	0,613

CR: Cisto radicular; FP: Folículo pericoronário; TOQ: Tumor odontogênico queratocístico; (*) Estatisticamente significativo.

5.7.1 TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO

A análise da correlação de Pearson entre os marcadores *mastcell triptase* e CD34 nos TOQs indicou uma correlação direta e moderada, sendo esta correlação estatisticamente significativa (P valor < 0,05). Entre os demais marcadores não encontramos correlação.

5.7.2 CISTOS RADICULARES

Na análise da Correlação de Pearson entre os marcadores SMA x CD34 encontramos uma correlação negativa e moderada com significância estatística (P valor < 0,05). Entre os demais marcadores não foi encontrada correlação.

5.7.3 FOLÍCULOS PERICORONÁRIOS

A análise da correlação de Pearson entre os marcadores *alfa-SMA* x CD34 mostrou existir correlação inversa e forte com significância estatística (P< 0,05). Entre os demais marcadores não encontramos correlação.

6. DISCUSSÃO

Os resultados imuno-histoquímicos desse estudo mostraram uma participação ativa de MFs, macrófagos CD163, vasos sanguíneos CD34 e vasos linfáticos D2-40 positivos, proporcionalmente, maior em TOQ em comparação com os CRs e FPs. Ao contrário, em relação à população de MCs, o TOQ mostrou uma proporção menor destas células em comparação com o CR, mas foi substancialmente maior em relação ao FP.

Os MCs são células do tecido conjuntivo, originados de células hematopoiéticas da medula óssea, capazes de secretar uma gama de produtos biologicamente ativos, armazenados nos seus grânulos citoplasmáticos, a exemplo da triptase, quimase, histamina, heparina, prostraglandina, leucotrienos, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (CAUGHEY, 2007; METCALFE; BARAM; MEKORI, 2007; RIBATTIA et al., 2009; STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010; NETTO et al., 2012; KIUCHI et al, 2014). Segundo Gurish e Austen (2012), os MCs são encontrados no sangue, porém completam a sua diferenciação e maturação no microambiente de quase todos os tecidos vascularizados. Além de serem encontrados nas proximidade de vasos sanguíneos, os MCs podem também ser encontrados no tecido epitelial humano (STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010) e no interior do epitélio de revestimento cístico e de tumores odontogênicos (SMITH et al., 1989; RODINI et al., 2004; DE ASSIS et al, 2012; NETTO et al, 2012).

Além da histoquímica, um dos métodos eficazes para detecção de MCs nos tecidos é por meio da reação imuno-histoquímica, podendo ser utilizado anticorpos contra a expressão das proteínas dos grânulos liberados por essas células, como a triptase ou quimase, ou através da detecção de seus receptores de superfície (c-KIT), como o CD117 (CHIN-YANG, 2001). No presente estudo, utilizou-se a marcação contra a proteína triptase, conforme estudos prévios (TERONEN et al, 1996; NETTO et al, 2012; DE ASSIS et al, 2012; BRACKS et al, 2014).

Os MCs têm a capacidade de exercer diferentes funções a depender do microambiente em que eles se encontrem (GALLI et al., 2005; GALLI et al., 2011). Esta “plasticidade fenotípica” dos MCs, de acordo com Marichal et al. (2013), pode resultar no desenvolvimento de populações mastocitárias fenotipicamente distintas em diferentes locais anatômicos ou em até mesmo em diferentes espécies de animais.

Já está bem sedimentado que os MCs podem participar, além do sistema imunológico (SHIN et al., 2008; MALTBY et al, 2009; DRAZIC et al., 2010; GALLI et al, 2011;

VITALITI et al., 2012; MARICHAL et al., 2013), de processos relacionados com a inflamação e a reabsorção óssea (MALTBY et al, 2009; DRAZIC et al, 2010; GURISH et al, 2012). Embora sua participação na patogênese de lesões odontogênicas ainda não esteja totalmente esclarecida, os MCs têm sido associados a patogênese de lesões periapicais, como o CR (DRAZIC et al., 2010; NETTO et al, 2012) e com remodelação tecidual durante o desenvolvimento de lesões odontogênicas, a exemplo do TOQ (CHATTERJEE et al., 2008; MALTBY et al., 2009; DE ASSIS et al., 2012; KIUSH et al, 2014), ameloblastomas (DE ASSIS et al., 2012), e cisto dentígero (TERONEN et al., 1996, CHATTERJEE et al., 2008).

A presença de MCs tem sido demonstrada em lesões odontogênicas, especialmente naquelas que apresentam morfologia cística, a exemplo dos cistos periapicais (DRAZIC et al., 2010; LIMA et al., 2011; NETTO et al., 2012; BRACKS et al., 2014), cistos dentígeros (TERONEN et al., 1996, CHATTERJEE et al., 2008; NETTO et al., 2012) e tumor odontogênico queratocístico (GURGEL et al., 2010; CHATTERJEE et al., 2008; DE ASSIS et al., 2012; NETTO et al., 2012). Também tem sido observada sua presença em outras lesões orais a exemplo de fibromas traumáticos (FARAHANI et al, 2011; KIUCHI et al, 2014), granulomas periférico de células gigantes e fibromas ossificantes periféricos (FARAHANI et al., 2010). Desordens cancerizáveis, como a queilite actínica e carcinoma celular escamoso também tem sido incluídos (FARAHANI et al., 2010; ARAÚJO et al, 2012).

A análise do marcador *mastcell triptase* nos TOQs, CRs e FPs mostrou uma maior densidade de MCs presentes nos CRs, seguido do TOQ e uma menor densidade de MCs no FP, com diferenças estatisticamente significantes. Resultados similares foram encontrados por Netto et al. (2012) que encontraram uma maior média de células mastocitárias nos CRs e TOQs, quando comparada com granuloma dental periapical. De acordo com Drazic et al. (2010) uma maior quantidade de MCs pode ser encontrada em lesões com estrutura cística devido a longa duração dessas lesões, como também devido a presença da parede de tecido conjuntivo fibroso. Porém, para Rodini et al. (2004), a presença e distribuição dos mastócitos dentro de lesões císticas tem sido atribuída à atração direcionada por áreas de inflamação ativa em regiões periféricas, em íntimo contato com vasos sanguíneos, macrófagos e fibroblastos. Em nossa pesquisa, encontramos áreas de TOQs com inflamação significativa e presença de muitos MCs, no entanto, embora a maioria dos TOQs analisados não tenha apresentado inflamação significativa, estes apresentaram uma densidade média de mastócitos considerável.

Chatterjee et al. (2008) avaliaram, através da coloração por azul de toluidina, a presença e a distribuição dos MCs no TOQ, CD e CR, tentando elucidar a participação destas

células no mecanismo de expansão destas lesões. Com relação a presença dos MCs nas lesões, a maior densidade de mastócitos/mm² foi encontrada nos TOQs e a menor, nos CRs, sugerindo que essa maior densidade nos TOQs ocorre devido a uma maior degradação MEC em relação ao CR. Curiosamente, apesar de Patidar et al. (2012) terem utilizado a mesma metodologia empregada pelos autores anteriores e terem encontrado elevada concentração de MCs nas três lesões, os autores, diferentemente de Chatterjee et al (2008), encontraram uma maior concentração de mastócitos/mm² nos CRs e uma menor concentração de mastócitos/mm² nos TOQs. Assim como Patidar et al. (2012), em nosso estudo a maior concentração de mastócitos/mm² ocorreu também nos CRs e a menor nos TOQs. Uma possível explicação para os nossos resultados é a presença, em todos os CRs analisados, de infiltrado inflamatório significativo, servindo como fator quimiotático para este componente celular.

Em relação à distribuição dos MCs nos TOQs, encontramos tais células presentes ao longo de todas as áreas da lesão, incluindo áreas mais profundas do estroma e principalmente próximo ao parênquima, o que corrobora com os achados de Chatterjee et al (2008) , de De Assis et al. (2012) e Patidar et al. (2012) . Netto et al. (2012) também observaram uma maior frequência de MCs na região subepitelial dos TOQs. Muitos mastócitos foram encontrados próximos a vasos sanguíneos, sugerindo existir uma possível relação entre os MCs e o sistema vascular tumoral (TERONEN et al, 1996; DE ASSIS et al, 2012; NETTO et al, 2012). A localização dos MCs na região peritumoral, de acordo com Maltby et al. (2009), pode ser explicada devido sua migração de tecidos saudáveis da proximidade ou de vasos sanguíneos tumorais. Wayner et al. (1988) e Dastych; Metcalfe (1994) sugeriram que a MEC também pode contribuir para a localização dos MCs na região peritumoral, pois os MCs têm afinidade pela fibronectina que, de acordo com vários estudos, está presente abundantemente na matriz extracelular nos tumores odontogênicos (SANTOS et al., 2006; POOMSAWAT et al., 2007; DE MEDEIROS et al., 2010). Em uma recente pesquisa realizada por Conceição et al. (2014) sobre a expressão imuno-histoquímica de componentes celulares da MEC em mucocelos, os autores observaram que os MCs se acumulavam na parede fibrosa cística e que isto podia ser explicado pela atividade mitogênica que os MCs exercem sobre fibroblastos e sua consequente participação na remodelação tecidual.

Alguns estudos têm demonstrado que os MCs também são encontrados no revestimento epitelial odontogênico (SMITH et al., 1989; RODINI et al., 2004; DE ASSIS et al, 2012; NETTO et al, 2012) e no lúmen cístico (SMITH et al., 1989; RODINI et al., 2004). Apesar de não identificarmos MCs no lúmen cístico do TOQ, em nosso estudo alguns

espécimes apresentaram MCs no interior da camada basal do epitélio do tumor. Estes achados estão de acordo com os trabalhos publicados por De Assis et al. (2012) e Netto et al. (2012), que localizaram células mastocitárias no parênquima do TOQ e na área subepitelial, respectivamente. Nos CRs encontramos MCs no lúmen cístico e também células mastocitárias no interior de restos epiteliais odontogênicos quando estes estiveram presentes. A presença de MCs dentro do revestimento cístico pode ser explicada pela secreção do epitélio odontogênico cístico de proteínas da matriz (SMITH et al., 1989) e citocinas fibrinogênicas (LI; BAEK, 2002) que teriam um efeito quimiotático sobre os MCs, permitindo sua presença nesta região. Além disso, para Maltby et al. (2009) e De Assis et al. (2012) os MCs, quando presentes no epitélio, podem estar relacionados com a apresentação de antígenos, o que sugere sua participação na imunidade adaptativa, modulando desta forma a rejeição tumoral (WALSH, 2003; OZDEMIR, 2005; MALTBY et al., 2009).

Nos TOQs analisados neste trabalho, observamos também grande quantidade de MCs em processo de degranulação, que podem estar contribuindo para o crescimento desta lesão através da liberação de suas proteases (triptase e quimase), e consequente remodelação da MEC (CHATTERJEE et al., 2008; MALTBY et al., 2009; KIUSH et al., 2014). Isto está de acordo com o estudo de Chatterjee et al. (2008) e De Assis et al. (2012) que sugeriram que os produtos de degranulação dos MCs podem estar associados com o aumento da destruição da matriz extracelular da parede cística e com a estimulação da produção de citocinas, facilitando assim a expansão dessas lesões. Em adição, Chatterjee et al. (2008) concluíram que além da liberação de heparina e enzimas hidrolíticas pelos MCs facilitarem a quebra de glicosaminoglicanos e proteoglicanos no fluido luminal cístico contribuindo para a pressão osmótica e hidrostática, a sua degranulação e consequente liberação da triptase e prostaglandinas contribuem para o crescimento da lesão. Segundo De Assis et al. (2012), pode existir uma íntima comunicação celular entre os MCs e o sistema vascular tumoral, criando um microambiente favorável ao desenvolvimento neoplásico às custas de moléculas de sinalização que controlam a biologia dos MCs na tumorigênese. Ainda para os mesmos autores, os mastócitos influenciam o crescimento e expansão de tumores odontogênicos através da síntese de colágeno (DE ASSIS et al., 2012).

Além disso, a triptase liberada pelos MCs estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, alterando o microambiente do tumor, tornando-o mais denso, o que por sua vez fará com que os fibroblastos expressem a *alfa-SMA* e colágeno contrátil, transdiferenciando-se em MFs (MANGIA et al., 2011). Nesse respeito, destaca-se o trabalho realizado por Frungieri et al. (2002) que através de estudo *in vitro* demonstraram que ao

cultivar MCs junto a fibroblastos, os MCs foram capazes de estimular a expressão da COX-2 e produção de PGE₂, ocorrendo com isso a indução da proliferação fibroblástica e síntese de colágeno tipo I. Os autores mostraram que a triptase mastocitária estimula a proliferação de fibroblastos através da ativação do receptor ativador de protease 2 (PAR2), que juntamente com a expressão da COX-2 e consequente síntese de prostaglandina e ativação do receptor proliferador de peroxinoma nuclear gama mostraram ser os responsáveis pela indução da triptase na proliferação fibroblástica.

Os MFs são fibroblastos que possuem características semelhantes a músculo liso, com capacidade contrátil devido à elevada expressão de alfa-actina de músculo liso – *alfa-SMA*. Possuem também a capacidade de sintetizar componentes da MEC (VERED et al., 2005; CASEY et al., 2007; MANGIA et al., 2011; KIUCHI et al., 2014). A transdiferenciação de fibroblastos em MFs é realizada principalmente pelo fator de crescimento transformador beta (TGF- β), e o responsável pela sua maturação é o fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF (VERED et al., 2005; FREGNANI et al., 2009; HINZ, 2010; NADALIN et al., 2012). Sua transdiferenciação tem um papel crítico na progressão e no desenvolvimento de tumores (MANGIA et al., 2011).

Inicialmente, os MFs foram encontrados em tecido de granulação de feridas abertas, tecidos normais que necessitam de resistência mecânica, a exemplo da gengiva marginal, mucosa palatina, glândulas sudoríparas, bulbo dos folículos capilares, gânglios linfáticos, vasos sanguíneos, mucosa uterina, estroma testicular, vilosidades intestinais e septos pulmonares (TOMASEK et al., 2002). Posteriormente, os MFs foram encontrados em cicatrizes hipertróficas, cirrose, tumores benignos localmente agressivos, sarcomas, assim também como no estroma de tumores epiteliais (FLETCHER, 1998; DESMOULIERE; GUYOT; GABBIANI, 2004; DAYAN; NASRALLAH; VERED, 2005; NADALIN et al., 2012). Na cavidade oral, os MFs podem estar presentes em muitas condições patológicas, como fibroma de células gigantes (WEATHERS; CAMPBELL, 1974; DAYAN; BUCHNER; DAVID, 1989), lesão periférica de células gigantes (DAYAN; BUCHNER; DAVID, 1989) e fibrose submucosa bucal (ANGADI; KALE; HALLIKERIMATH, 2011).

No que diz respeito aos tumores odontogênicos, Smith e Bartov (1986) foram os primeiros a sugerirem que a presença dos MFs no estroma de lesões odontogênicas, a exemplo do AM, pode estar associada a um comportamento mais agressivo. Embora se saiba que os MFs são constituintes importantes da cápsula fibrosa de cistos odontogênicos e TOQs (LOMBARDI; MORGAN, 1995; VERED et al., 2005; FREGNANI et al., 2009; NONAKA et al., 2012), poucos estudos têm sido realizados visando investigar a participação dos MFs na

progressão e desenvolvimento de lesões císticas dos maxilares (LOMBARDI; MORGAN, 1995; VERED et al., 2005; FREGNANI et al., 2009; NONAKA et al., 2012; NADALIN et al., 2012).

Em nosso estudo, a presença de MFs foi encontrada em todos os casos de TOQs analisados, estando de acordo com os achados de Nonaka et al. (2012) e Ramos et al. (2014). Já os estudos de Nadalin et al. (2012), os MFs só foram encontrados em 46,6% dos TOQs analisados. Encontramos densidade média elevada de MFs nos TOQs analisados com diferenças estatísticas significativas em relação ao CR e FP. De acordo com Vered et al. (2005), essa elevada média de MFs presentes no estroma dessas lesões é resultante da expressão aumentada do TGF- β no epitélio de lesões odontogênicas, especialmente no AM e TOQ, podendo explicar o comportamento agressivo dessas lesões.

Nadalin et al. (2012) encontrou um número elevado de MFs no TOQ em relação aos CRs e CDs, no entanto não houve diferenças estatisticamente significantes. Diante de nossa constatação sobre a expressão do *alfa-SMA* ser mais abundante no TOQ que em outras lesões, a exemplo do CR, e ser mais abundante também que na mucosa normal (FP), podemos sugerir que a presença de MFs na cápsula fibrosa possa desempenhar um papel importante no comportamento biológico do TOQ (VERED et al., 2005), e, desta forma, participar no desenvolvimento desta lesão, além de contribuir de alguma forma no desenvolvimento dos CRs.

Com relação a sua localização, encontramos MFs próximos ao epitélio odontogênico, muitas das vezes dispostos paralelamente à superfície epitelial, resultados semelhantes publicados por Vered et al (2005), Nonaka et al (2012) e Nadalin et al (2012). Em alguns espécimes encontramos MFs nas áreas distantes do revestimento epitelial. Já o estudo publicado por Fregnani et al. (2009), ao analisar a presença de MFs em AM, MFs não foram identificados em áreas livres de tumor, mas em áreas próximas ao parênquima tumoral.

Em áreas de inflamação, normalmente, não havia presença de MFs ou eram pouco frequentes. Em contraste, encontramos uma concentração maior desta população celular em áreas que mostravam tecido de granulação. Nessa área, constatamos que os MFs adquiriam formatos variados, enquanto que em áreas com ausência de inflamação significativa, os MFs apresentaram normalmente o formato fusiforme. Embora Dan Dayan et al. (1989) também tenham constatado a presença de MFs em áreas inflamadas, ao estudar este componente celular em granuloma periférico de células gigantes, os mesmos não associaram a relação da presença de inflamação com o formato dos MFs, sendo este trabalho, ao nosso conhecimento o primeiro a relatar este achado, relacionando-os com a presença de inflamação.

Em relação à densidade de MFs entre os CRs e FPs, não encontramos diferenças estatisticamente significantes. Entretanto nos chamou a atenção a densidade média dos MFs presentes nos FPs, sendo esta bastante inferior à relatada por Ramos et al. (2014). Esses últimos autores avaliaram a presença de MFs, por meio da expressão da α -SMA em TOQs e nos FPs e encontraram uma densidade de MFs superior no FP, em relação ao TOQ. De acordo com Nakamura et al. (2006), podemos encontrar MFs em FPs e sua presença provavelmente está associada à remodelação óssea que ocorre durante o processo de formação e erupção dental, sugerindo que estas células se diferenciem em osteoblastos e contribuam para a formação do osso alveolar. Uma possível explicação para nosso resultado pode ser devido ao fato das unidades dentárias associadas aos FPs do nosso estudo já estarem totalmente formadas, e a formação óssea alveolar e o processo eruptivo já se encontrarem paralisadas e, conseqüentemente, com uma quantidade de MFs reduzida.

Em nosso estudo, apesar de não encontrarmos correlação estatisticamente significativa entre os marcadores *mastcell triptase* e α -SMA, encontramos uma elevada quantidade de MCs e MFs em todos os TOQs analisados. Ambas populações celulares estavam especialmente presentes logo abaixo do epitélio odontogênico do TOQ. Estes achados leva-nos a sugerir que através da triptase liberada pelos MCs, haja uma alteração no estroma tumoral, e o epitélio odontogênico do TOQ aumente a expressão do TGF- β (WEVER; MAREEL, 2003; VERED et al., 2005; FREGNANI et al., 2009), que por sua vez induzirá a transdiferenciação de fibroblastos em MFs e importante síntese de colágeno (MANGIA et al., 2011). Além disso, quando comparamos os nossos resultados com os trabalhos de Vered et al. (2005); Fregnani et al. (2009); Nonaka et al. (2012) e Ramos et al. (2014) podemos sugerir que o epitélio odontogênico do TOQ pode atuar e modular a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, sendo necessário um íntimo contato dos fibroblastos ao epitélio para que ocorra sua diferenciação.

Nesse respeito, destaca-se também os estudos realizados por Martinez-Mata et al. (2008), que avaliaram a relação entre a presença de MCs e MFs no mixoma odontogênico (MO). Ao estudar 62 casos de MOs, os autores encontraram uma elevada quantidade de MFs presentes nesta lesão e sugeriram que os MFs podem participar nas alterações estromais que favoreçam a invasão epitelial em neoplasias benignas e malignas. Apesar de Martinez-Mata et al. (2008) não encontrarem uma elevada quantidade de MCs no mixoma, observaram que esse componente celular estava presente em 72,6% das lesões. Para os autores, os MCs podem contribuir de alguma forma para a degradação da MEC, para o crescimento do tumor e podem facilitar a sua invasão através da indução da diferenciação miofibroblástica, o que poderia

explicar de alguma forma a frequência de ambas populações celulares no mixoma odontogênico (MARTINEZ-MATA et al., 2008).

Kiuchi et al (2014) analisaram, através da imunohistoquímica, a presença e a relação entre MCs e MFs na patogênese da hiperplasia fibrosa provocada por prótese dentária. Os autores analisaram casos de hiperplasia fibrosa induzida por prótese e compararam com espécimes de tecido gengival normal. Além disso, os autores investigaram, através da dupla marcação por imunofluorescência, a síntese de osteopontina e TGF- β e seu provável envolvimento na transformação de fibroblastos em MFs. Os resultados desta pesquisa mostraram que os MCs e MFs estão presentes em maior quantidade na hiperplasia fibrosa do que em tecidos normais. De acordo com os autores, os MCs, por meio da triptase, TGF- β e osteopontina estimulam a diferenciação de MFs, que por sua vez estão envolvidos na remodelação da MEC na hiperplasia fibrosa induzida por prótese. Os autores concluíram que os MCs, MFs e fibroblastos participam ativamente na patogênese desta lesão através da síntese de colágeno.

Os macrófagos são células do sistema imunológico presentes em elevada quantidade no microambiente tumoral (BALKWILL et al., 2005; ALLAVENA et al., 2008; ESPINOSA et al, 2010; BARROS et al, 2012). Embora diversos estudos mostrem que os macrófagos têm capacidade para destruir células tumorais *in vitro*, também é aceito que os macrófagos participam na promoção do crescimento de tumores (SICA et al., 2006; ALLAVENA et al., 2008; ESPINOSA et al, 2010; CHEN et al, 2011). Os macrófagos representam uma população celular heterogênea com uma grande variabilidade funcional a depender do seu estado de polarização. (MANTOVANI; SICA, 2010; GORDON; MARTINEZ, 2010; GALLI et al, 2011; SICA; MANTOVANI, 2012). Eles podem se polarizar em macrófagos M1, caracterizados por um fenótipo pró-inflamatório, promotor de resposta imune T helper 1 (Th1) e atividade anti-tumoral e pode também se polarizar em um fenótipo M2, com funções de regulação do reparo tecidual, remodelação tecidual e promotor de resposta imune T helper 2 - Th2 (GORDON; MARTINEZ, 2010; SICA; MANTOVANI, 2012).

Högger et al. (1998), Buechler et al. (2000), Sulahian et al. (2000) e Sica e Mantovani (2012) sugeriram, através de estudos *in vitro*, que o CD163 pode ser um marcador específico para macrófagos que expressam fenótipo M2. Os estudos de Edin et al. (2012), Lan et al. (2012) e Herrera et al. (2013) realizados em tecidos humanos acometidos por câncer, também corroboram com os autores anteriores e consideraram células CD163 marcadas positivamente por imunohistoquímica como sendo macrófagos polarizados em fenótipo M2. Entretanto, de

acordo com Barros et al. (2012) ainda é uma questão a esclarecer se todas as células CD163 positivas presentes no microambiente tecidual representam macrófagos M2.

Apesar de ambos os marcadores CD163 e CD68 serem capazes de identificar macrófagos, os resultados de diversos estudos revelam que a identificação de macrófagos entre esses marcadores não são equivalentes (LAU et al., 2004; VAKKILA et al., 2005; NGUYEN et al., 2005). De acordo com Fonseca et al. (2002) e Nguyen et al. (2005), o CD163 é um marcador específico para macrófagos, enquanto que o CD68 é capaz de marcar outros componentes celulares, a exemplo de células mieloides, células dendríticas, fibroblastos, células de Langerhans e outros (VAKKILA et al., 2005; HARRIS et al., 2012). No estudo realizado por Lau et al. (2004), ao comparar os anticorpos CD68 e CD163, ficou claro que o CD163 demonstrou uma maior especificidade como um marcador de desordens de origem de monócitos/macrófagos e que o CD163 é um marcador adequado para uso de rotina em amostra de tecidos incluídos em parafina, podendo ser uma alternativa aos anticorpos CD68 na identificação de macrófagos.

Em nosso estudo, a identificação dos macrófagos foi realizada através do marcador CD163. Embora pouco frequente, observamos a presença de macrófagos nos TOQs, CRs e nos FPs, no entanto não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre a densidade média de macrófagos nas lesões e no FP estudados. No TOQ, quando presentes, os macrófagos foram observados próximos ao parênquima e principalmente junto a áreas de inflamação. No CR, esporadicamente encontramos macrófagos dentro do epitélio odontogênico e, na maioria das vezes, os encontramos próximos a áreas inflamadas. Raramente encontramos macrófagos presentes nos FPs. Ao nosso conhecimento este é o primeiro trabalho que relaciona a presença de macrófagos CD163 positivos em TOQ, embora Guzmán-Medrano et al. (2012) tenham avaliado a presença de macrófagos, mas CD68 positivos, em ameloblastomas sólidos (AMS), ameloblastomas unicísticos (AMU) e ameloblastomas desmoplásicos (AMD), observando que a densidade média de macrófagos encontrada nos ameloblastomas de um modo geral, era bastante superior à encontrada por nós, nos TOQs. Uma possível explicação para essa diferença seria devido ao marcador utilizado por nós, o CD163, ser específico para macrófagos (FONSECA et al., 2002; NGUYEN et al., 2005), ao contrário do CD68, que não é específico de macrófagos e isto poderia superestimar a quantidade de macrófagos verdadeiros nessas lesões.

Com relação a análise da correlação entre os marcadores *mastcell triptase* e CD163 nas lesões e nos folículos, nosso estudo mostrou não existir correlação. Nos TOQs, MCs e macrófagos compartilhavam regiões similares, como por exemplo região abaixo do epitélio do

tumor, regiões profundas da cápsula fibrosa e até mesmo dentro do revestimento epitelial cístico tanto no TOQ, como no CRs. Nos CRs, observamos também que os MCs estavam presentes em regiões profundas e superficiais da cápsula fibrosa principalmente associadas a áreas inflamadas.

Corroborando com nossos achados em relação aos CRs, Bracks et al. (2014) avaliaram tanto a distribuição de MCs, como a distribuição de macrófagos CD68 positivos em cistos periapicais. Os resultados dos referidos autores mostraram não haver diferenças estatisticamente significantes entre número médio de MCs e macrófagos ao comparar as regiões superficiais e profundas da cápsula fibrosa dos cistos. De acordo com os autores, o número médio de MCs na região superficial da cápsula fibrosa foi maior nos cistos mostrando intensa inflamação superficial e exocitose, resultados também encontrado por Netto et al. (2012). Já com relação aos macrófagos nos CRs, os autores observaram estas células presentes em áreas inflamadas e não inflamadas, sem diferenças. Os autores também mostraram que os macrófagos estavam presentes em áreas fortemente marcadas pela IL-6, uma citocina envolvida no desenvolvimento de lesões que envolvem reabsorção óssea (G.T.J HUANG, M; WINGARD et al, 2001; DIEHL,S; RINCON,M, 2002).

Em nosso estudo, não encontramos correlação entre os marcadores CD163 e SMA. Porém, da mesma maneira que os MCs e os MFs, os macrófagos também foram encontrados presentes nos TOQs e CRS em maior número que nos FPs. Portanto, pode-se sugerir que esses componentes estromais podem de alguma forma contribuir para patogênese do TOQ como também para a patogênese do CR .

Atualmente a angiogênese é considerada um elemento essencial no processo de desenvolvimento de tumores. O crescimento tumoral e a sua progressão dependem da capacidade dos vasos sanguíneos fornecerem um aporte constante de nutrientes e oxigênio para as células tumorais (FOLKMAN; KALLURI, 2006; MĂRGĂRITESCU et al., 2010; VONG; KALLURI, 2011). Por esses motivos, o processo de angiogênese e os fatores envolvidos na formação vascular tem sido alvo de várias pesquisas em lesões odontogênicas (EL-LABBAN; AGHABEIGI, 1990; KUMAMOTO et al., 2002; ALAEDDINI et al., 2009).

Nesse aspecto, El-Labban e Aghabeigi (1990) estudaram a vascularização no TOQ e CD através da análise estereológica e ultra-estrutural. Estes autores observaram que os TOQs apresentam maior número de vasos com degeneração e trombose, principalmente na proximidade do epitélio cístico, do que os CDs, embora não haja diferença significativa no volume e na área de superfície dos vasos sanguíneos entre essas lesões. Além disso, os

autores levantaram a hipótese de que fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, presentes no interior dos vasos trombosados poderiam contribuir para a proliferação epitelial nos TOQs.

A análise do marcador CD34 nos TOQs, CRs e FPs mostrou uma densidade microvascular (MVD) discretamente maior nos TOQs em relação aos CRs e FPs, mas sem diferenças estatisticamente significativas. Os vasos sanguíneos apresentaram-se com calibres variados e se localizavam principalmente próximo ao epitélio do TOQ, resultado também encontrado por Alaeddini et al. (2009) e Nonaka et al. (2012). Nos TOQs, observamos grande concentrações de vasos sanguíneos não somente onde o infiltrado inflamatório era significativo, mas também, encontramos bastante vasos sanguíneos em locais em que não havia inflamação significativa. Esta localização de vasos próximo ao epitélio do tumor, de acordo com Schmidt; Carmeliet, (2011) e Bunget et al. (2013), resulta em um melhor fornecimento de substâncias nutritivas e oxigênio para essas células, necessários para o crescimento da lesão.

Na análise do marcador anti-CD34 nos CRs, observou-se que em todos os casos foram encontrados células marcadas positivamente pelo referido anticorpo. A localização destas células deu-se na cápsula fibrosa dos cistos, próximo a um abundante infiltrado inflamatório. Nas áreas em que o grau do infiltrado inflamatório não se mostrou presente ou fracamente presente observamos uma baixa MVD. Esse resultado corrobora com os resultados encontrados por Zizzi et al. (2013) que avaliaram a angiogênese por meio da densidade microvascular, utilizando o mesmo marcador, em 34 cistos radiculares. Os referidos autores encontraram uma MVD média de 42,2 mm² e esta alta densidade tinha uma relação estatisticamente significativa com o grau do infiltrado inflamatório. Em nossa pesquisa todos os CRs analisados apresentaram de um modo geral infiltrado inflamatório significativo.

Ao compararmos a análise do CD34 nos TOQs e CRs em relação aos FPs, as lesões apresentaram, mesmo que discreta, uma MVD maior do que os FPs. Da mesma forma, a análise da angiogênese realizada por Kumamoto et al. (2002) utilizando o mesmo marcador em lesões neoplásicas (ameloblastomas benignos e malignos), mostrou que as MVDs destas lesões apresentaram-se maiores do que nas suas contrapartes não neoplásicas, a saber os germes dentários. Esses resultados sugerem que lesões agressivas requerem um aporte maior de oxigênio e nutrientes, o que está refletido em uma maior quantidade de vasos sanguíneos nas lesões.

Na análise de correlação de Pearson entre os marcadores *mastcell triptase* e CD34 no TOQ, nosso estudo revelou uma correlação positiva e moderada entre os marcadores,

mostrando que a presença de vasos sanguíneos é acompanhada da presença de mastócitos e vice-versa, ou seja, esses achados podem sugerir que os mastócitos contribuem para a formação vascular (THEOHARIDES; CONTI, 2004; GOMES et al., 2013). Segundo Crivellato et al. (2008), a capacidade pró-angiogênica dos mastócitos está atribuída à sua capacidade de secretar moléculas como VEGF, FGF-2, IL-8 e TGF- β .

Os MFs também são células que têm demonstrado desempenhar um papel importante na angiogênese. Estas células constituem-se em uma importante fonte de VEGF e cicloxigenase-2, dois fatores pró-angiogênicos bem conhecidos (KONSTANTINOPOULOS et al., 2007). Guo et al., (2008) constataram em modelos de câncer gástrico em ratos, que os MFs eram estimulados pelas células tumorais a expressar o VEGF-A, constituindo a principal fonte desse fator angiogênico. Em razão destes estudos anteriores, avaliamos possíveis correlações entre a quantidade de MFs e os índices angiogênicos no TOQ, CR e FP. Não encontramos correlação entre a presença de MFs e o índice angiogênico nos TOQs, o que está de acordo com os resultados da pesquisa de Nonaka et al. (2012). Porém, curiosamente encontramos uma correlação inversa e moderada entre a presença de MFs e o índice angiogênico nos CRs e inversa e forte nos FPs. Baseado nesses resultados, podemos também sugerir que em TOQs, os MFs não estão envolvidos diretamente na formação vascular (NONAKA et al, 2012), diferentemente dos CRs e FPs. Por esse motivo, Nonaka et al. (2012) sugeriram que os MFs podem contribuir para o desenvolvimento e progressão do TOQ através da secreção de fatores de crescimento e proteases, já que não foi encontrada uma correlação significativa entre a quantidade destes tipos celulares e o índice angiogênico das lesões.

Nós não encontramos correlação entre os marcadores CD163 e CD34. Em contrapartida, uma correlação positiva entre angiogênese e contagem de macrófagos foi detectada em diversos tumores, tais como o câncer de mama (LEEK et al., 1996), carcinoma endometriode (ESPINOSA et al., 2010) e o carcinoma hepatocelular (PENG et al., 2005).

Já o processo de linfangiogênese tem sido pouco estudado. A identificação recente de marcadores específicos para vasos endoteliais linfáticos tem permitido uma avaliação mais precisa sobre a vascularização linfática em circunstâncias patológicas (CHRISTIANSEN; DETMAR, 2011). Nessas circunstâncias, a linfangiogênese ocorre através da proliferação e germinação das células endoteliais de vasos linfáticos pré-existentes (HE et al., 2004). A contribuição de células endoteliais progenitoras advindas do sistema circulatório linfático ainda não está clara (SALVEN et al., 2003). Assim como ocorre na angiogênese, o processo de linfangiogênese é induzido por fatores de crescimento, que podem ser secretados por

células tumorais, como os macrófagos e mastócitos (SCHOPPMANN et al., 2006; MOHAMMED et al., 2007).

A podoplanina (D2-40) humana é uma glicoproteína transmembranar que se expressa em células de origem epitelial e mesenquimal. (CIMPEAN et al., 2007; HATA et al., 2010; KALOF; COOPER, 2009). Sua especificidade para o endotélio dos vasos linfáticos, mas não para as células endoteliais dos vasos sanguíneos, tornou esta molécula um marcador biológico específico para os vasos linfáticos (FUKUNAGA, 2005; KALOF; COOPER, 2009). Dessa forma, utilizamos esse marcador no presente estudo.

A linfangiogênese representa um processo dinâmico durante a embriogênese, mas em grande parte ausente após o nascimento, em circunstâncias fisiologicamente normais (CHRISTIANSEN; DETMAR, 2011). Em circunstâncias patológicas, tais como a inflamação e cânceres, a linfangionênese tem uma grande contribuição para a formação de novos vasos linfáticos, proliferando e germinando células endoteliais dentro dos vasos linfáticos pré-existentes (WANG; OLIVER, 2010).

Ao analisarmos a expressão do marcador D2-40 nos TOQs, observamos uma forte imunexpressão deste marcador na membrana celular e no citoplasma das células epiteliais da camada basal e supra-basal. Em concordância, Okamoto et al. (2010) estudaram a expressão da podoplanina em TOQs e CDs e obtiveram os mesmos resultados. De acordo com Okamoto et al. (2011), esta forte expressão da podoplanina poderia estar associada às regiões de proliferação das células basais e a formação das ilhotas epiteliais e sugeriram que esta proteína desempenha um papel na invasividade local e na progressão desses tumores. Nesse estudo, observamos presença de vasos linfáticos em 96,6 % dos TOQs analisados (n=29), sendo estes mais evidentes em locais distantes do epitélio. O índice linfangiogênico por meio da densidade microvascular linfática (MVDL) mostrou ser maior nos TOQs, do que nos CRs e FPs, com diferenças estatisticamente significativas. Esses achados levam-nos a sugerir que a podoplanina está relacionada a um caráter neoplásico nessas lesões odontogênicas, especificamente no TOQ.

A análise do índice linfangiogênico nos CRs mostrou-se maior que nos FPs, no entanto sem diferenças estatísticas significativas. Assim como ocorreu nos TOQs, houve marcação do D2-40 nas células da camada basal e supra-basal do eptélio nos CRs. Em concordância, Zustin, Sheuer e Friedrich, (2010) também encontraram expressão membranosa e citoplasmática de podoplanina nas células da camada basal e parabasal dos AMs, TOQs, tumor odontogênico adenomatóide (TOA), CRs e cistos foliculares. Baseando-se em nossos resultados e comparando-os com os de Zustin; Sheuer; Friedrich (2010) e Okamoto et al.

(2011) podemos sugerir que o D2-40 pode estar envolvido na proliferação celular destas lesões.

Não encontramos correlação entre o marcador D2-40 e os outros marcadores utilizados em nossa pesquisa.

O presente estudo representa um passo a frente na compreensão da biologia do TOQ e também na compreensão do papel potencial exercido pelos mastócitos, miofibroblastos e macrófagos na formação vascular e na sua relação com a progressão tumoral e agressividade deste tumor. Estudos futuros, especialmente com a inclusão de casos de TOQ associado à síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular, serão necessários para explorar ainda mais o papel da angiogênese e linfangiogênese no desenvolvimento desse grupo de lesão.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. Existe uma interação significativa entre os mastócitos e a formação vascular no TOQ, sendo os MCs um importante componente do estroma desta lesão. Os mastócitos também participam de forma ativa na patogênese dos CRs;
2. Os MFs são um importante componente do estroma do TOQ, porém sua presença não demonstrou uma correlação direta com a formação vascular sanguínea e linfática nesta lesão.
3. Existe uma correlação inversa entre os MFs e o índice angiogênico nos CRs e FPs;
4. Não foi possível correlacionar a presença de macrófagos com a formação vascular no TOQ e CR;
5. O processo de angiogênese tem correlação direta com a presença de mastócitos no TOQ;
6. O processo de linfangiogênese faz parte da dinâmica vascular no TOQ, no entanto fazem-se necessários estudos que busquem elucidar a participação dos vasos linfáticos nos TOQs e a participação da podoplanina na proliferação celular, bem como sua contribuição na invasão tumoral desta lesão.

REFERÊNCIAS

- ABE, M.; KUROSAWA, M.; ISHIKAWA, O.; MIYACHI, Y.; KIDO, H. Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. **Clin. Exp. Allergy** 1998; 28; 1509–1517.
- AGARWAL, B.; SAXENA, R.; MORIMIYA, A.; MEHROTRA, S.; BADVE, S. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. **Am J Surg Pathol** 2005; 29: 1449-1455
- AKIN, C. Mast Cell Activation Disorders.. **J Allergy Clin Immunol Pract.** 2014 May - June;2(3):252-257.
- ALAEDDINI, M.; SALAH, S.; DEGHAN, F.; ESHGHYAR, N.; ETEMAD-MOGHADAM, S. Comparison of angiogenesis in keratocystic odontogenic tumours, dentigerous cysts and ameloblastomas, **Oral Dis.** 15 (2009) 422–427.
- AL-ANSARI, MM.; ABOUSSEKHRA, A. Caffeine mediates sustained inactivation of breast cancer-associated myofibroblasts via up-regulation of tumor suppressor genes. **PLoS One.** 2014 Mar 3;9(3):
- ALBINI, A.; TOSETTI, F.; BENELLI, R.; NOONAN, DM. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. **Cancer Res.** 2005;65:10637–41.
- ALLAVENA, P.; SICA, A.; SOLINAS, G.; PORTA, C.; MANTOVANI, A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 66 (2008) 1–9.
- ANGADI, P. V.; KALE, A. D.; HALLIKERIMATH, S. Evaluation of myofibroblasts in oral submucous fibrosis: correlation with disease severity. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 3, p. 208-213, 2011.
- ARAUJO, C. P. ; AQUINO, F. C. ; GURGEL, C. A. S. ; RAMOS, E. A. G. ; FREITAS, V. S.; SALES, C.B.S ; RAMALHO, L. P. ; SANTOS, J. N . Elastin accumulation in actinic cheilitis with different degrees of epithelial dysplasia. **International Journal of Morphology**, v. 30, p. 627-633, 2012.
- AVELLAR, R. et al. Worldwide Incidence of Odontogenic Tumors. **J Craniofac Surg** 2011;22: 2118Y2123).
- BALEEIRO, R B. Study of the expression of cytokines in the tumor microenvironment in lung cancer patients and their correlation with the presence of macrophages and dendritic cells. Maste's dissertation. **Institute of Biomedical Sciences.** Department of Immunology. SP, 2007.
- BALKWILL, F.; CHARLES, KA.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell** 2005;7(3):211–7.

- BANDO, Y.; HENDERSON, B.; MEGHJI, S.; POOLE, S.; HARRIS, M. (1993). Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. **J Oral Pathol Med** 22: 221–227.
- BANERJI, S.; NI, J.; WANG, SX.; CLASPER, S.; SU, J.; TAMMI, R. et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. **J Cell Biol** 1999; 144: 789-801.
- BARNES, L.; EVESON, JW.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. editors. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: **IARC Publishing Group**; 2005
- BARROS, MH.; HASSAN, R.; NIEDOBITEK, G. (2012) Tumor-associated macrophages in pediatric classical hodgkin lymphoma: association with epstein-barr virus, lymphocyte subsets, and prognostic impact. **Clin Cancer Res** 18: 3762-3771.
- BARTH, P.J.; RAMASWAMY, A.; MOLL, R. CD34(+) fibrocytes in normal cervical stroma, cervical intraepithelial neoplasia III, and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. **Virchows Arch**, 441 (2002), pp. 564–568
- BELL, L.; MADRI, J. A. (1990) Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. **Am. J. Pathol.** **137**, 7–12
- BHOWMICK, N.A.; MOSES, H.L. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*, 15 (2005), pp. 97–101
- BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. (2002) The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies **J. Pathol.** 2002, 196,254-265
- BLAIR, RJ.; MENG, H.; MARCHESE, MJ.; REN, S.; SCHWARTZ, LB.; TONNESEN, MG. Human mast cells stimulate vascular tube formation: tryptase is a novel potent angiogenic factor. **J Clin Invest** 1997;99:2691–700.
- BRACKS; ARMADA, GONÇALVES and PIRES. Distribution of Mast Cells and Macrophages and Expression of Interleukin-6 in Periapical Cysts. **Journal of Endodontics**. Volume 40, Issue 1, January 2014, Pages 63–68
- BRAZIN, J.; MALLIARIS, S.; GROH, B.; MEHRARA, B.; HIDALGO, D.; OTTERBURN, D.; SILVER, RB.; SPECTOR, JA. Mast Cells in the Periprosthetic Breast Capsule. **Aesthetic Plast Surg**. 2014 May 9.
- BREITENEDER-GELEFF, S.; MATSUI, K.; SOLEIMAN, A.; MERANER, P.; POCZEWSKI, H.; KALT, R. et al. Podoplanin novel 43 – Kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. **Am J Pathol** 1997; 151: 1141-1152.
- BREITENEDER-GELEFF, S.; SOLEIMAN, A.; HORVAT, R.; AMANN, G.; KOWALSKI, H.; HERJASCHKI, D. Podoplanin, a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma. **Verh Dtsch Ges Pathol** 1999; 83: 270-275.

BROWNE, RM. The pathogenesis of odontogenic cysts: a review. **J Oral Pathol.** 1975. 4: 31–46.

BUCHNER, A.; MERRELL, PW.; CARPENTER, WM. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. **J Oral Maxillofac Surg** 2006;64(9):1343-52.

BUECHLER, C.; RITTER, M.; ORSÓ, E.; LANGMANN, T.; KLUCKEN, J. et al. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. **J Leukoc Biol.** 2000. 67: 97-103.

BUNGET, A.; FRONIE, A.; AFREM, E.; CORLAN PUȘCU, D.; MANOLEA, H.; DAN, AR.; COMAN, M.; NIMIGEAN, VR. Microscopic aspects of angiogenesis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Rom J Morphol Embryol.** 2013;54(3):623-7.

CAETANO ADOS, S.; TJIOE, KC.; FAUSTINO, SE.; HANEMANN, JA.; BELONE ADE, F.; SOARES, CT.; OLIVEIRA, DT. Immunolocalization of podoplanin in benign odontogenic tumours with and without ectomesenchyme. **Arch Oral Biol.** 2013 Apr;58(4):408-15.

CARMELIET, P.; JAIN, RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature** 2000;407(6801): 249–57.

CASEY, TM.; ENEMAN, J.; CROCKER. Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. **Breast Cancer Res Treat** 2007 Aug 3.

CAUGHEY, GH. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. **Immunol Rev.** 2007;217:141–54.

CHATTERJEE, S.; MAHAJAN, S.; BOAZ, K.; GEORGE, T. Quantitative role of mast cells in odontogenic cystic enlargement. **Braz J Oral Sci** 2008; 7: 1662–5.

CHEN, L.; SCHREMENTI, ME.; RANZER, MJ.; WILGUS, TA.; DIPIETRO, LA. Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation. **PLoS One.** 2014 Jan 22;9(1)

CHEN, P.; HUANG, Y.; BONG, R.; DING, Y.; SONG, N.; WANG, X.; SONG, X.; LUO, Y. Tumor- associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner, **Clin. Cancer Res.** 17 (2011) 7230–7239.

CHEN, WL.; OUYANG, KX.; LI, HG.; HUANG, ZQ.; LI, JS.; WANG, JG. Expression inducible nitric oxide synthetase and vascular endothelial growth factor in ameloblastoma. **J Craniofac Surg.** 2009;20:171–175.

CHIEN, M.H.; KU, C.C.; JOHANSSON, G.; CHEN, M.W.; HSIAO, M.; SU, J.L.; INOUE, H.; HUA, K.T.; WEI, L.H.; KUO, M.L. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) promotes angiogenesis by induction of COX-2 in leukemic cells via the VEGF-R3/JNK/AP-1 pathway. **Carcinogenesis**, 30 (2009), pp. 2005–2013

CHIN-YANG, L. Diagnosis of mastocytosis: value of cytochemistry and immunohistochemistry. **Leuk Res** 25: 537-541, 2001.

CHRISTIANSEN, A.; DETMAR, M. Lymphangiogenesis and cancer, **Genes Cancer**, 2011, 2(12):1146–1158.

CIMPEAN, M.; MAZURU, V.; CERNIL, A.; CEAUSU, R.; SAPTEFRATI, L.; CEBANU, A.; FIT, AM.; RAICA, M. Detection of early lymphangiogenesis by lymphatic microvascular density and endothelial proliferation status in preneoplastic and neoplastic lesions of the uterine cervix. **Pathology International** 2011; 61: 395–400.

CLAPP, C. et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. **Physiol Rev.** V.89, p. 1177-1215, 2009.

CONCEIÇÃO, JG. et al . Oral mucoceles: A clinical, histopathological and immunohistochemical study. **Acta Histochemica (Print)** ^{JCR}, v. 116, p. 40-47, 2014.

CORTEZ-RETAMOZO et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2012 Feb 14;109(7):2491-6. doi: 10.1073/pnas.1113744109. Epub 2012 Jan 30.

COUSSENS, LM.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature** 2002;420(6917):860–7.

CRIVELLATO, E.; RIBATTI, D. Role of inflammatory cells in angiogenesis. In: Maragoudakis ME, Papadimitriou E, editors. Angiogenesis: basic science and clinical applications. **Transworld Research Network**; 2007. p. 229–46.

CRIVELLATO, E.; NICO, B.; RIBATTI D. Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. **Cancer Lett** 2008;269(1):1–6.

DASTYCH, J.; METCALFE, DD. Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. **J Immunol.** 1994;152:213–9.

DAVEY, K.J. et al. Assessment of vascularity as an index of angiogenesis in periradicular granulomas. Comparison with oral carcinomas and normal tissue counterparts. **Int Endod J.** v.41, p.987-96, 2008.

DAYAN, D.; BUCHNER, A.; DAVID, R. Myofibroblasts in peripheral giant cell granuloma. Light and electron microscopic study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 18, n. 5, p. 258-261, 1989.

DAYAN, D.; NASRALLAH, V.; VERED, M. Clinico-pathologic correlations of myofibroblastic tumors of the oral cavity: 1. nodular fasciitis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 34, n. 7, p. 426-435, 2005.

DE ASSIS; FAC; GURGEL, CA.; RAMOS, EA.; VIDAL, MT.; PINHEIRO, AL.; JURISIC, V.; SALES, CB.; CURY, PR.; DOS SANTOS, JN. Distribution of mast cells in benign odontogenic tumors. **Tumour Biol.** 2012 Apr;33(2):455-61.

- DE MEDEIROS, AM.; NONAKA, CF.; GALVÃO, HC.; DE SOUZA, LB.; FREITAS, RA. Expression of extracellular matrix proteins in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. **Eur Arch Otorhinolaryngol**. 2010;267:303–10.
- DE VOS VAN STEENWIJK, PJ.; RAMWADHDOEBE, TH.; GOEDEMANS, R.; DOORDUIJN, EM.; VAN HAM, JJ. et al. Tumor-infiltrating CD14-positive myeloid cells and CD8-positive T-cells prolong survival in patients with cervical carcinoma. **Int J Cancer**, 133: 2884–94 (2013).
- DE WEVER, O.; DEMETTER, P.; MAREEL, M.; BRACKE, M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. **Int J Cancer**, 123 (2008), pp. 2229–2238.
- DE WEVER, O.; MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **J Pathol** 2003;200:429–47.
- DEMIR, R.; SEVAL, Y.; HUPPERTZ, B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. **Acta histochemica** 109 (2007) 257—265.
- DESMOULIERE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair Regen** 13:7–12, 2005.
- DESMOULIERE, A.; GUYOT, C.; GABBIANI, C. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 509-517, 2004.
- DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Mol Immunol**, 39 (2002), pp. 531–536.
- DING, H.; CAI, J.; MAO, M.; FANG, Y.; HUANG, Z.; JIA, J.; LI, T.; XU, L.; WANG, J.; ZHOU, J.; YANG, Q.; WANG, Z. Tumor-associated macrophages induce lymphangiogenesis in cervical cancer via interaction with tumor cells. **APMIS**. 2014 Apr 4. doi: 10.1111/apm.12257.
- DOBBS, LG.; WILLIAMS, MC. and GONZALEZ, R. Monoclonal antibodies specific to apical surfaces of rat alveolar type I cells bind to surfaces of cultured, but not freshly isolated, type II cells. **Biochim Biophys Acta** 970: 146-156, 1988.
- DRAZIC, R.; SOPTA, J.; MINIĆ, A.J. Mast cells in periapical lesions: potential role in their pathogenesis. **J Oral Pathol Med**, 39 (2010), pp. 257–262.
- DUFF, SE.; JEZIORSKA, M.; KUMAR, S. et al. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. **Colorectal Dis** 2007; 9: 793–800.
- EDIN, S.; WIKBERG, ML.; DAHLIN, AM.; RUTEGÅRD, J.; OBERG, A. et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. **PLOS ONE** 7: 2012.
- EILKEN, HM.; ADAMS, RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. **Curr Opin Cell Biol** 2010;22(5):617–25.

EL-LABBAN, N.G.; AGHABEIGI, B. A comparative stereologic and ultrastructural study of blood vessels in odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. **J Oral Pathol Med.** V.19, p.442-6, 1990.

ESPINOSA, I.; JOSE CARNICER, M.; CATASUS, L.; CANET, B.; D'ANGELO, E.; ZANNONI, G.F.; PRAT, J. Myometrial invasion and lymph node metastasis in endometrioid carcinomas: tumor-associated macrophages, microvessel density, and HIF1A have a crucial role, **Am. J. Surg. Pathol.** 34 (2010) 1708–1714.

EVANS, N.P.; MISYAK, S.A.; SCHMELZ, E.M.; GURI, A.J.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA –RIERA, J. Conjugated linoleic acid ameliorates inflammation-induced colorectal cancer in mice through activation of PPAR γ , **J. Nutr.** 140 (2010) 515–521.

EYDEN, B.; BANERJEE, S.; SHENJERE, P.; FISHER, C. The myofibroblast and its tumours. **J Clin Pathol** 2009;62:236–249.

FARAHANI, S.S. et al. Comparison of mast cells count in oral reactive lesions. **Pathol Res Pract** 206(3): 151-5, 2010.

FERRARA, N.; CARVER-MOORE, K.; CHEN, H.; DOWD, M.; LU, L.; O'SHEA, K.S. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature** 1996;380:439–42.

FIGUEROA, A. et al. Keratocystic odontogenic tumor associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome: similar behavior to sporadic type? **Otolaryngol Head Neck Surg.** V.142, p. 179-83, 2010.

FLETCHER, C. D. M. Myofibroblastic tumors: an update. **Verh Dtsch Ges Pathol.** 1998 82:75–82

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J Natl Cancer Inst,** 1990, 82(1):4–6.

FOLKMAN, J.; KALLURI, R. Cancer without disease, **Nature,** 2004, 427(6977):787.

FOLKMAN, J.; MERLER, E.; ABERNATHY, C.; WILLIAMS, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis, **J Exp Med,** 1971, 133(2):275–288.

FONSATTI, E.; ALTOMONTE, M.; NICOTRA, MR.; NATALI, PG.; MAIO, M.; ENDOGLIN (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. **Oncogene.** 2003;22:6557–6563.

FONSATTI, E.; MAIO, M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. **J Transl Med** 2004;2:18.

FONSECA JE. et al. Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: reduced CD163 expression in CD4+ T lymphocyte-rich microenvironments. **Arthritis and rheumatism.** 2002;46(5):1210–6.

FOUILLOUX, I. et al. Mast cell activation and degranulation occur early during induction of periosteal bone resorption. *Bone* 38: 59-56, 2005.

FREGNANI, E.R. et al. Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. *Pathol Oncol Res.* V.15, p.231-40, 2009.

FREGNANI, E.R.; DA CRUZ PEREZ, D.E.; DE ALMEIDA, O.P.; KOWALSKI, L.P.; SOARES, F.A.; DE ABREU ALVES, F. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 39 (2010), pp. 145–149.

FRIEDRICH, RE.; SCHEUER, HA.; ZUSTIN, J. Expression of podoplanin in nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated keratocystic odontogenic tumours. *Anticancer Res.* 2012 May;32(5):2125-7.

FRUNGIERI, MB.; WEIDINGER, S.; MEINEKE, V.; KOHN, FM.; MAYERHOFER, A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma: possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99;15072–15077.

FUKUNAGA, M. Expression of D240 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathology.* 2005; 46(4): 396-402.

GABBIANI, G.; RYAN, G.B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* V.27, p.549-50, 1971.

GADBAIL, AR.; MANKAR GADBAIL, MP.; HANDE, A.; CHAUDHARY, MS.; GONDIVKAR, SM.; KORDE, S.; GAWANDE, MN.; PATIL, S.; TEKADE, S.; SHARMA, A. Tumor angiogenesis: role in locally aggressive biological behavior of ameloblastoma and keratocysticodontogenic tumor. *Head Neck.* 2013 Mar;35(3):329-34.

GALLI, SJ.; BORREGAARD, N.; WYNN, TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunol* 2011;12:1035–44.

GALLI, SJ.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, MA.; PILIPONSKY, AM.; WILLIAMS, CM.; TSAI, M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005;23:749–86.

GIUSCA, S.E.; ZUGUN, F.E.; TARCOVEANU, E.; CARASEVICI, E.; AMALINEI, C.; CARUNTU, I.D. Immunohistochemical study of colorectal cancer liver metastases: the immune/inflammatory infiltrate, *Rom. J. Morphol. Embryol.* 51 (2010) 73–79.

GOMES, F. et al. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: Tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sciences* 92 (2013) 101–107.

GONZÁLEZ-ALVA, P.; TANAKA, A.; OKU, Y.; et al. Enhanced expression of podoplanin in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2009; Aug 18.

GONZÁLEZ-ALVA, P.; TANAKA, A.; OKU, Y.; YOSHIZAWA, D.; ITOH, S.; SAKASHITA, H.; IDE, F.; TAJIMA, Y.; KUSAMA, K. Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective study of 183 cases. **J Oral Sci.** 2008 Jun;50(2):205-12.

GORDON, M.S.; MENDELSON, D.S.; KATO, G. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. **Int J Cancer.** V.126, p. 1777-87, 2010.

GORDON, S.; MARTINEZ, FO. (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity** 32: 593-604.

GORDON, S.; TAYLOR, PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol** 2005;5 December (12):953-64.

GURGEL, C.A.S. et al. Immunolocalisation of laminin-1 in keratocystic odontogenic tumors. **Acta Histochemica**, Volume 112, Issue 6, November 2010, Pages 624-629.

GURISH, MF.; AUSTEN, KF. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. **Immunity** 2012;37:25-33.

GUZMÁN-MEDRANO, R.; ARREOLA-ROSALES, RL.; SHIBAYAMA, M.; SILVA-OLIVARES, DA.; BOLOGNA-MOLINA, R.; RODRÍGUEZ, MA. Tumor-associated macrophages and angiogenesis: a statistical correlation that could reflect a critical relationship in ameloblastoma. **Pathol Res Pract.** 2012 Nov 15;208(11):672-6.

HAKIM, SG.; KOSMEHL, H.; SIEG, P.; TRENKLE, T.; JACOBSEN, HC.; ATILA BENEDEK, G.; RIBBAT, J.; DRIEMEL, O. Altered expression of cell-cell adhesion molecules β -catenin/E-cadherin and related Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors. **Clin Oral Investig.** 2011 Jun;15(3):321-8.

HARRIS, J et al. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical hodgkin lymphoma. **Diagn Pathol.** 2012; 7: 12. Published online Jan 30, 2012.

HARTMANN, T.; RUOSS, SJ.; RAYMOND, WW.; SEUWEN, K.; CAUGHEY, GH. Human tryptase as a potent, cell-specific mitogen: role of signaling pathways in synergistic responses. **Am. J. Physiol.** 1992; 262; L528-L534.

HERMAN, A. B.; SAVAGE, V.M; WEST, G.B. A quantitative theory of solid tumor growth, metabolic rate and vascularization. **PLoS One**, 6 (2011), p. e22973.

HERRERA, M.; HERRERA, A.; DOMÍNGUEZ, G.; SILVA, J.; GARCÍA, V. et al. (2013) Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. **Cancer Sci** 104: 437-444

HINZ, B.; PHAN, S.H.; THANNICKAL, V.J.; GALLI, A.; BOCHATON-PIALLAT, M.L.; GABBIANI, G. The myofibroblast: one function, multiple origins. **Am J Pathol**, 170 (2007), pp. 1807-1816.

HINZ, B.; PHAN, S.H.; THANNICKAL, V.J.; PRUNOTTO, M.; DESMOULIÈRE, A.; VARGA, J.; DE WEVER, O.; MAREEL, M.; GABBIANI, G. Recent developments in

myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. **Am J Pathol.** 2012 Apr;180(4):1340-55.

HÖGGER, P.; DREIER, J.; DROSTE, A.; BUCK, F.; SORG, C. (1998) Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). **J Immunol** 161: 1883-1890

HOTTA, H.; ROSS, A. H.; HUEBNER, K.; ISOBE M.; WENDEBORN, S.; CHAO, M. V.; RICCIARDI, M. P.; TSUJIMOTO, Y.; CROCE, C. M. and KOPROWSKI, H. (1988) Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. **Cancer Res.** 48, 2955-2962.

HUANG, G.T.J.; DO, M.; WINGARD, M. *et al.* Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 92 (2001), pp. 83–88.

HUTTUNEN, M.; HARVIMA, IT. Mast cell tryptase and chymase in chronic leg ulcers: chymase is potentially destructive to epithelium and is controlled by proteinase inhibitors. **Br J Dermatol.** 2005;152:1149–60.

INOSHIMA, N.; NAKANISHI Y.; MINAMI, T.; IZUMI, M.; TAKAYAMA, K.; YOSHINO, I.; HARA, N. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.** 2002, 8: 3480-3486.

JONES A.V.; CRAIG, G.T.; FRANKLIN, C.D. Range and demographic of odontogenic cysts diagnosed in UK population over a 30-year period. **J Oral Pathol Med.** V.35, p.500-7, 2006.

JORDAN, R.C.K. Histology and ultrastructural features of the odontogenic Keratocystic. **Oral Maxillofac Surg Clin.** V.15, p 325-33, 2003.

JUSSILA, L.; ALITALO, K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. **Physiol Rev.** 2002; 82: 673-700.

KACAR, A.; ARIKOK, A.T., KOKENEK UNAL, T.D.; ONDER, E.; HUCUMENOGLU, S.; ALPER, M. Stromal expression of CD34, α -smooth muscle actin and CD26/DPPIV in squamous cell carcinoma of the skin: a comparative immunohistochemical study **Pathol Oncol Res**, 18 (2012), pp. 25–31.

KAHN, H. J.; MARKS, A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. **Lab Invest**, v. 2, n. 1, p. 1255-7, 2002.

KAIPAINEN, A.; KORHONEN, J.; MUSTONEN, T.; VAN HINSBERGH, VW.; FANG GH.; DUMONT GH. *et al.* Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. **Proc Natl Acad Sci. USA** 1995; 92: 3566-3570.

KALOF, AN.; COOPER K. D240 immunohistochemistry-so far! **Adv Anat. Pathol.** 2009; 16(1):62-4.

- KANBE, N.; TANAKA, A.; KANBE, M.; ITAKURA, A.; KUROSAWA, M.; MATSUDA H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. **Eur J Immunol** 1999;29:2645–9.
- KAPOOR, P.; DESHMUKH, RS.; VEGF: a critical driver for angiogenesis and subsequent tumor growth: an IHC study, **J OralMaxillofac Pathol**, 2012, 16(3):330–337.
- KATAKI, A.; SCHEID, P.; PIET, M.; MARIE, B.; MARTINET, M.; MARTINET Y.; VIGNAUD, JM. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. **J. Lab. Clin. Med**, V. 140, p. 320-327, 2002.
- KELLERMANN, M.G.; SOBRAL, L.M.; DA SILVA, S.D.; ZECCHIN, K.G.; GRANER, E.; LOPES, M.A. et al.. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, 51 (2007), pp. 849–853.
- KELLERMANN, MG.; SOBRAL, LM.; DA SILVA, SD.; ZECCHIN, KG.; GRANER, E.; LOPES, MA.; KOWALSKI, LP.; COLETTA, RD. (2008) Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. **Oral Oncol** 4:509–517
- KERBEL, RS. Tumor angiogenesis. **N Engl J Med**. 2008;358:2039–49.
- KERR, K.M.; JHONSON, S.K.; KING, G.; KENNEDY, M.M.; WEIR, J.; JEFFREY, R. Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? **Histopathology**. V33. 55-63, 1998.
- KINGDOM, J.; HUPPERTZ, B.; SEAWARD, G.; KAUFMANN, P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2000;92:35–43.
- KIUCHI, M.; YAMAMURA, T.; OKUDERA, M.; SOUKSAVANH, V.; ISHIGAMI, T.; IWASE, T.; WARNAKULASURIYA, S.; KOMIYAMA, K. An assessment of mast cells and myofibroblasts in denture-induced fibrous hyperplasia. **J Oral Pathol Med**. 2014 Jan;43(1):53-60.
- KOJC, N.; ZIDAR, N.; VODOPIVEC, B.; GALE, N. Expression of CD34, alpha-smooth muscle actin, and transforming growth factor beta1 in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. **Hum Pathol**, 36 (2005), pp. 16–21
- KOLAR, Z.; GEIEROVA, M.; BOUCHAL, J.; PAZDERA, J.; ZBORIL, V.; TVRDY, P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med** 35: 75–80. 2006.
- KOUKOURAKIS, MI.; GIATROMANOLAKI, A.; KAKOLYRIS, S.; O'BYRNE, KJ.; APOSTOLIKAS, N.; SKARLATOS, J.; GATTER, KC.; HARRIS, AL. Different patterns of stromal and cancer cell thymidine phosphorylase reactivity in non-small-cell lung cancer: impact on tumour neoangiogenesis and survival. **Br J Cancer**. 1998;77:1696–1703
- KUMAMOTO, H.; OHKI, K.; OOYA, K. Association between vascular endothelial growth

factor (VEGF) expression and tumor angiogenesis in ameloblastomas. **J. Oral Pathol. Med.**, 31 (2002), pp. 28–34

LAI, JH.; ZHOU, YJ.; BIN, D.; QIANGCHEN, WANG, SY. Clinical significance of detecting lymphatic and blood vessel invasion in stage II colon cancer using markers D2-40 and CD34 in combination. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2014;15(3):1363-7.

LAMAGNA, C.; AURRAND-LIONS, M.; IMHOF, BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. **J Leukoc Biol** 2006;80(4):705–13.

LAN, C.; HUANG, X.; LIN, S.; HUANG, H.; CAI, Q. et al. Expression of M2-Polarized Macrophages is Associated with Poor Prognosis for Advanced Epithelial Ovarian Cancer. **Technol Cancer Res Treat**, 2012. 12: 259–67.

LAU, SK.; CHU, PG.; WEISS, LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. **Am J Clin Pathol** 2004;112: 794-801.

LAZARD, D.; SASTRE, X.; FRID, MG.; GLUKHOVA, MA.; THIERY, JP.; KOTELIAN-SKY, VE. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 1993; 90; 999– 1003.

LE NOBLE, F. A. C.; HEKKING, J. W. M.; VAN STRAATEN, H. W. M.; SLAAF, D. W.; and BOUDIER, H. A. J. S. (1991) **Eur. J. Pharmacol.** 195, 305–306

LEEK, R.D.; LEWIS, C.E.; WHITEHOUSE, R.; GREENALL, M.; CLARKE, J.; HARRIS, A.L. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Res.**, 56 (1996), pp. 4625–4629

LEGAN, M. New marker of angiogenesis CD105 (endoglin): diagnostic, prognostic and therapeutic role. **Radiol Oncol.** 2005;39:253–259.

LEWIS, CE.; POLLARD, JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Res** 2006;66(2):605–12.

LI, CY.; BAEK, JY. Mastocytosis and fibrosis: role of cytokines. **Int Arch Allergy Immunol.** 2002;127:123–6.

LI, Q.; HUANG, W.; ZHO, X. Expression of CD34, alpha-smooth muscle actin and transforming growth factor-beta1 in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma of the cervix. **J Int Med Res**, 37 (2009), pp. 446–454

LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. (2003). Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **Int Endod J** 36: 464–471.

LIM, K.P.; CIRILLO, N.; HASSONA, Y.; WEI, W.; THURLOW, J.K.; CHEONG, S.C. et al. Fibroblast gene expression profile reflects the stage of tumour progression in oral squamous cell carcinoma. **J Pathol**, 223 (2011), pp. 459–469.

- LIMA, SC.; RIZO, VH.; SILVA-SOUSA, YT.; ALMEIDA, LY.; ALMEIDA, OP.; LEÓN, JE. Immunohistochemical evaluation of angiogenesis and tryptase-positive mast cell infiltration in periapical lesions **J Endod.** 2011 Dec;37(12):1642-6.
- LIN, E.Y.; LI, J.F.; BRICARD, G.; WANG, W.; DENG, Y.; SELLERS, R.; PORCELLI, S.A.; POLLARD, J.W. Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages **Mol. Oncol.**, 1 (2007), pp. 288–302.
- LIU, HT.; MA, R.; YANG, QF. et al. Lymphangiogenetic characteristics of triple negativity in node-negative breast cancer. **Int J Surg Pathol** 2009; **17**: 426–31.
- LOMBARDI, T.; MORGAN, P. R. Immunohistochemical characterisation of odontogenic cysts with mesenchymal and myofilament markers. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 4, p. 170-6, Apr 1995. ISSN 0904-2512.
- LONGATTO-FILHO, A.; PINHEIRO, C.; PEREIRA, SM. et al. Lymphatic vessel density and epithelial D2-40 immunoreactivity in pre- invasive and invasive lesions of the uterine cervix. **Gynecol Oncol** 2007; **107**: 45–51.
- MAEDA, K. et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **Br J Cancer.** v.72, p.319-23, 1995.
- MAHABELESWAR, GH.; BYZOVA, TV. Angiogenesis in melanoma. **Semin Oncol.** 2007. 34: 555–565.
- MALTBY, S.; KHAZAIE, K.; MCNAGNY, KM. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. **Biochim Biophys Acta.** 2009;1796:19–26.
- MANFREDI, M.; VESCOVI, P.; BONANINI, M. and PORTER, S.: Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature. **Int J Oral Maxillofac Surg** 33: 117-124, 2004.
- MANGIA, A.; Malfettone, A.; ROSSI, R.; PARADISO, A.; RANIERI, G.; SIMONE, G.; & RESTA, L. Tissue remodelling in breast cancer: human mast cell tryptase as an initiator of myofibroblast differentiation. **Histopathology** 2011;58, 1096–1106
- MANTOVANI, A.; SICA, A. (2010) Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol** 22: 231-237.
- MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity** 2005;23(4):344–6.
- MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophage as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol** 2002;23(11):549–55.
- MARÇA, JR.; SAMUEL, RO.; FERNANDES, D. et al (2010). T-helper cell type 17/ regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. **J Endod** 36:995–999.

MĂRGĂRITESCU, C.; PIRICI, D.; STÎNGĂ, A.; SIMIONESCU, C.; RAICA, M.; MOGOANTĂ, L.; STEPAN, A.; RIBATTI, D.; VEGF expression and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and morphometric study, **Clin Exp Med**, 2010, 10(4):209–214.

MARICHAL, T¹; TSAI, M.; GALLI, S.J. Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. **Cancer Immunol Res**. 2013 Nov;1(5):269-79. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0119.

MARINHO, V. F. Z. et al. D2-40, a novel lymphatic endothelial marker: identification of lymphovascular invasion and relationship with axillary metastases in breast cancer. **J Bras Patol Med Lab** v. 44 n. 1 p. 45-50 fevereiro 2008

MARIONI, G.; ALESSANDRO, ED.; GIACOMELLI L; STAFFIERI, A. CD105 is a marker of tumour vasculature and a potential target for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**. 2010;39:361–367.

MARSH, D.; SUCHAK, K.; MOUTASIM K.A.; VALLATH, S.; HOPPER, C; JERJES, W. et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **J Pathol**, 223 (2011), pp. 470–481

MARTÍNEZ-MATA, G.; MOSQUEDA-TAYLOR, A.; CARLOS-BREGNI R, DE ALMEIDA, OP.; CONTRERAS-VIDAURRE, E.; VARGAS, PA.; CANO-VALDÉZ, AM.; DOMÍNGUEZ-MALAGÓN, H. Odontogenic myxoma: clinico-pathological, immunohistochemical and ultrastructural findings of a multicentric series. **Oral Oncol**. 2008 Jun;44(6):601-7.

MARTONE, T.; ROSSO, P.; ALBERA, R.; et al. Prognostic relevance of CD105p microvessel density in HNSCC patient outcome. **Oral Oncol**. 2005;41: 147–155.

MATSUDA Y.; HAGIO M.; ISHIWATA T. Nestin: a novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis, *World J Gastroenterol*, 2013, 19(1):42–48.

MEDREK, C.; PONTÉN, F.; JIRSTRÖM, K.; LEANDERSSON, K. (2012) The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. **BMC Cancer** 12: 306

MEHTA, D.; RAVAL, N.; PATADIYA, H.; TARSARIYA, V. Gorlin-goltz syndrome. **Ann Med Health Sci Res**. 2014 Mar;4(2):279-82. doi: 10.4103/2141-9248.129064.

MELO, L. A.; FIGUEIREDO, A. L; GURGEL, C. A. S.; RAMOS, E. A. G.; FIGUEIREDO, C. R. L. V.; CURY, P.R.; RAMALHO, L. P.; ALBUQUERQUE, R. L. C.; MARTINS, MD.; SANTOS, J. N . CD1a-POSITIVE LANGERHANS CELLS and THEIR RELATIONSHIP WITH E-CADHERIN IN AMELOBLASTOMAS and KERATOCYSTIC ODONTOGENIC TUMORS. **Journal of Oral Pathology & Medicine** ^{JCR}, v. 42, p. 454-461, 2013.

MENDES, R.A.; CARVALHO, J.F.C.; VAN DER WALL, I. Characterization and management of the keratocystic odontogenic tumor in relatio to its histopathological and biological features. **Oral Oncol**. V. 46, p.219-25, 2010.

METCALFE, DD.; BARAM, D.; MEKORI, YA. Mast cells. **Physiol Rev** 1997;77:1033–79.

MI SEON KWONA; SEUNG-HUN SHINB; SEON-HEE YIMC; KYO YOUNG LEED; HYUN-MI KANGB; TAE-MIN KIMB; YEUN-JUN CHUNGB. CD63 as a biomarker for predicting the clinical outcomes in adenocarcinoma of lung. **Lung Cancer** (2007) 57, 46–53.

MINHAJAT, R.; MORI, D.; YAMASAKI, F.; SUGITA, Y.; SATOH, T.; TOKUNAGA, O. Organ- specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. **Pathol Int.** 2006;56:717–723.

MITROU, GK.; TOSIOS, KI.; KYROUDI, A.; SKLAVOUNOU, A. Odontogenic keratocyst expresses vascular endothelial growth factor: an immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med.** 2009;38:470–475.

MOHAMMED, RA.; GREEN, A.; EL-SHIKH, S.; PAISH, EC.; ELLIS, IO.; MARTIN, SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis, **Br J Cancer**, 2007, 96(7):1092–1100.

MOUSSAI, D.; MITSUI, H.; PETTERSEN, JS.; PIERSON, KC; SHAH, KR; SUAREZ-FARINAS, M. et al. The human cutaneous squamous cell carcinoma microenvironment is characterized by increased lymphatic density and enhanced expression of macrophage-derived VEGF-C. **J Invest Dermatol** 2011;131(1):229–36.

MOUTA CARREIRA, C.; NASSER, SM.; DI TOMASO, E.; PADERA, TP.; BOUCHER, Y.; TOMAREV, SI. et al. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. **Cancer Res** 2001; 61: 8079-8084.

MURAMATSU, M.; KATADA, J.; HAYASHI, I.; MAJIMA, M. Chymase as a proangiogenic factor. A possible involvement of chymase-angiotensin-dependent pathway in hamster sponge angiogenesis model. **J Biol Chem** 2000;275:5545–52.

MYOUNG, H. et al. Odontogenic Keratocyst: review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** V.91, p.328-33, 2001.

NADALIN, MR.; FREGNANI, ER.; SILVA-SOUSA, YT.; DA CRUZ PEREZ, DE. Presence of myofibroblasts and matrix metalloproteinase 2 in radicular cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors: a comparative immunohistochemical study. **J Endod.** 2012 Oct;38(10):1363-7.

NAKAYAMA, H.; ENZAN, H.; MIYAZAKI, E.; KURODA, N.; NARUSE, K.; HIROI, M. Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. **J. Clin. Pathol.** 2000; 53; 626–629

NETTO; PIRES; FONSECA; SILVA; LOURENÇO. Evaluation of mast cells in periapical cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors. **J Oral Pathol Med** (2012) 41: 630–636

NGUYEN, TT. et al. Expression of CD163 (hemoglobin scavenger receptor) in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage. **The American journal of surgical pathology**. 2005;29(5):617–24.

NGUYEN, TT.; SCHWARTZ, EJ.; WEST, RB.; WARNKE, RA.; ARBER, DA. et al. Expression of CD163 (hemoglobin scavenger receptor) in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage. **Am J Surg Pathol**, 2005. 29: 617-624

NILSEN, R.; JOHANNESSEN, AC.; SKAUG, N.; MATRE, R.; (1984). In situ characterization of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions using monoclonal antibodies. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 58: 160–165

NOEL, W.; RAES, G.; HASSANZADEH GHASSABEH, G.; DE BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends Parasitol** 2004;20(March (3)):126–33.

NONAKA, CF.; CAVALCANTE, RB.; NOGUEIRA, RL. et al. Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. **Arch Oral Biol**, 2012; 57: 230–7.

NOVO, E.; DI BONZO, LV.; CANNITO, S.; COLOMBATTO, S.; PAROLA, M. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**. 2009 Nov;41(11):2089-93.

OKAMOTO, E.; KIKUCHI, K.; MIYAZAKI, Y.; GONZALEZ-ALVA, P.; OKU, Y.; TANAKA, A. et al. Significance of podoplanin expression in keratocystic odontogenic tumor. **J Oral Pathol Med**. 2010; 39 (1):1-5.

OLIVER. G; DETMAR, M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insight into the development and biological function of the lymphatic vasculature. **Genes Dev**. 2002; 16: 773-783.

ONG, C.; BRANDENBERGER, C.; KIUPEL, M.; KARIAGINA, A.; LANGOHR IM. Immunohistochemical Characterization and Morphometric Analysis of Macrophages in Rat Mammary Tumors. **Vet Pathol**. 2014 May 19.

OTRANTO, M.; SARRAZY, V.; BONTÉ, F.; HINZ, B.; GABBIANI, G.; DESMOULIÈRE A. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. **Cell Adh Migr**. 2012 May-Jun;6(3):203-19.

OZDEMIR, O. Immunosurveillance function of human mast cell? **World J Gastroenterol** 11:7054–7056 73

PARTANEN, TA.; AROLA, J.; SAARISTO, A.; JUSSILA, L.; ORA, A; MIETTINEN, M.; et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. **FASEB J**. 2000; 14: 2087-2096.

- PATIDAR, KA.; PARWANI, RN.; WANJARI, SP.; PATIDAR, AP. Mast cells in human odontogenic cysts. **Biotech Histochem.** 2012 Aug;87(6):397-402.
- PATIL, V.; ZHAO, Y.; SHAH, S.; FOX, BA.; ROMMEREIM, LM.; BZIK, DJ.; YAP, GS. Co-existence of classical and alternative activation programs in macrophages responding to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.** 2014 Feb;44(2):161-4.
- PENG, S.H.; DENG, H.; YANG, J.F.; XIE, P.P.; LI, C.; LI, H.; FENG, D.Y. Significance and relationship between infiltrating inflammatory cell and tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma tissues. **World J. Gastroenterol**, 11 (2005), pp. 6521–6524
- PINDBOG, JJ.; HANSEN, J. Studies in odontogenic cyst epithelium. **Acta Pathol Microbiol Scand.** V. 58, p.283-94, 1963.
- POLLARD, JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. **Nat Rev Cancer** 2004;4:71–8.
- POLS; MAAIKE, S.; KLUMPERMAN, JUDITH. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. **Experimental Cell Research**, 2009, Vol.315(9), pp.1584-1592
- POOMSAWAT, S.; PUNYASINGH, J.; VEJCHAPIPAT, P. Expression of basement membrane components in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104:666–75.
- PYZIAK, L.; STASIKOWSKA-KANICKA, O.; DANILEWICZ, M.; WĄGROWSKA-DANILEWICZ, M. Immunohistochemical analysis of mast cell infiltrates and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. **Pol J Pathol.** 2013 Dec;64(4):276-80.
- RAMOS, GO.; COSTA, A.; MEURER, MI.; VIEIRA, D.; RIVERO, ER.; Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinases (1, 2, and 9), Ki-67, and myofibroblasts in keratocystic odontogenic tumors and pericoronal follicles. **J Oral Pathol Med** (2014) . April, 43: 282–28
- REILLY, C. F.; TEWKSBUURY, D. A.; SCHECHTER, N. M.; and TRAVIS, J. (1982) **J. Biol. Chem.** 257, 8619–8622
- REINHARD E. FRIEDRICH; HANNA A. SCHEUER and JOZEF ZUSTIN. Expression of Podoplanin in Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome-Associated Keratocystic Odontogenic Tumours. **Anticancer Research** 32: 2125-2128 (2012)
- RIBATTI, D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angio- genesis: a historical review. **Br J Haematol** 2005;128: 303–9.
- RIBATTI, D.; NICO, B.; CRIVELLATO, E. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. **Angiogenesis.** V.12, p.101-11, 2009.
- RIBATTIA, D.; CRIVELLATO,E; MOLICAC,S. Mast cells and angiogenesis in haematological malignancies. **Leukemia Research** 33 (2009) 876–879.

ROLNY, C.; MAZZONE, M.; TUGUES, S.; LAOUI, D.; JOHANSSON, I.; COULON, C.; SQUADRITO, M.L.; SEGURA, I.; LI, X.; KNEVELS, E.; COSTA, S.; VINCKIER, S.; DRESSELAER, T.; AKERUD, P.; DE MOL, M.; SALOMAKI, H.; PHILLIPSON, M.; WYNS, S.; LARSSON, E.; BUYSSCHAERT, I.; BOTLING, J.; HIMMELREICH, U.; VAN GINDERACHTER, J.A.; DE PALMA, M.; DEWERCHIN, M.; CLAESSON- WELSH, L.; CARMELIET, P. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF, **Cancer Cell** 19 (2011) 31–44.

RONCATI, L.; MANENTI, A.; SIGHINOLFI, P. Immunohistochemical improvement in the analysis of the lymphatic metastases from lung carcinoma.**Ann Thorac Surg.** 2014 Jan;97(1):380-1.

SAAD, RS.; LINDNER, JL.; LIU, Y. et al. Lymphatic vessel density as prognostic marker in esophageal adenocarcinoma. **Am J Clin Pathol** 2009; **131**: 92–8.

SAAD, RS.; LIU, YL.; NATHAN, G.; CELEBREZZE, J.; MEDICH, D.; SILVERMAN, JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. **Mod Pathol.** 2004;17:197–203.

SALVEN, P.; MUSTJOKI, S.; ALITALO, R.; ALITALO, K.; RAFII, S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells, *Blood*, 2003, 101(1):168–172

SANTOS, JN.; DE SOUZA, VF.; AZEVÊDO, RA.; SARMENTO, VA.; SOUZA, LB. Braz “Hybrid” lesion of desmoplastic and conventional ameloblastoma: immunohistochemical aspects. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2006;72:709–13.

SAPPINO, AP.; SKALLI, O.; JACKSON, B.; SCHURCH, W.; GABBIANI, G. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. **Int. J. Cancer** 1988; 41; 707– 712.

SCHMIDT, T.; CARMELIET, P. Angiogenesis: a target in solid tumors, also in leucemia? **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, 2011 (2011), pp. 1–8

SCHOPPMANN, SF.; FENZL, A.; NAGY, K.; UNGER, S.; BAYER G.; GELEFF, S.; GNANT, M.; HORVAT, R.; JAKESZ, R.; BIRNER, P. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival, **Surgery**, 2006, 139(6):839–846.

SHCHORS, K.; EVAN, G. Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? **Cancer Res.** 2007;67:7059–61.

SHEAR, M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasms? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behavior. **Oral Oncol** 2002;38:219–26.

SHETTY, DC.; AHUJA, P.; TANEJA, DK.; RATHOR, AS; CHHINA, S.; AHUJA, US.; KUMAR, K.; AHUJA, A.; RASTOGI, P. Relevance of tumor angiogenesis patterns as a

diagnostic value and prognostic indicator in oral precancer and cancer, **Vasc Health Risk Manag**, 2011, 7:41–47.

SHIN, K.; WATTS, GF.; OETTGEN, HC.; FRIEND, DS.; PEMBERTON, AD.; GURISH, MF.; LEE, DM. Mouse mast cell tryptase mMCP-6 is a critical link between adaptive and innate immunity in the chronic phase of *Trichinella spiralis* infection. **J Immunol**. 2008 Apr 1;180(7):4885-91.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, 2012. 122: 787-795.

SICA, A.; SCHIOPPA, T.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumor progression: potential targets of anti-cancer therapy. **Eur J Cancer** 2006;42(6):717–27.

SICKERT, D.; AUST, D.E.; LANGER, S.; BARETTON, G.B.; DIETER, P.P. Characterization of macrophage subpopulations and microvessel density in carcinomas of the gastrointestinal tract, **Anticancer Res**. 27 (2007) 1693–1700.

SKOBE, M.; HAMBERG, LM.; HAWIGHORST, T.; SCHIRNER, M.; WOLF, GL.; ALITALO, K. et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. **Am J Pathol** 2001;159(3):893–903.

SMITH, G.; SMITH, AJ.; BASU, MK. Mast cells in human odontogenic cysts. **J Oral Pathol Med** 1989;18: 274–8

SMITH, SM., BARTOV, SA. Ameloblastoma with myofibroblasts: first report. **J Oral Pathol** 1986; 15: 284–6.

SOUZA, L.B. et al. Odontogenic cysts: demographic profile in a Brazilian population over a 38-year period. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. V.15, p.e583-90, 2010.

STACKER, SA.; CAESAR, C.; BALDWIN, ME.; THORNTON, GE.; WILLIAMS, RA.; PREVO, R. et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. **Nat Med**. 2001; 7:186-191.

STAPOR, PC.; SWEAT, RS.; DASHTI, DC.; BETANCOURT, AM.; MURFEE, WL. Pericyte Dynamics during Angiogenesis: New Insights from New Identities. **J Vasc Res**. 2014 May 17;51(3):163-174.

STOCKMANN, C.; SCHADENDORF, D.; KLOSE, R.; HELFRICH, I. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. **Front Oncol**. 2014 Apr 8;4:69.

STONE, K.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**. Feb 2010; 125(2 Suppl 2): S73–S80.

SULAHIAN, TH.; HÖGGER, P.; WAHNER, AE.; WARDWELL, K.; GOULDING, NJ. et al. (2000) Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. **Cytokine** 12: 1312-1321.

SUN, T.; YANG, Y.; LUO, X.; CHENG, Y.; ZHANG, M.; WANG, K.; GE, C. Inhibition of Tumor Angiogenesis by Interferon- γ by Suppression of Tumor-Associated Macrophage Differentiation. **Oncol Res.** 2014;21(5):227-35.

TANAKA, F.; OTAKE, Y.; YANAGIHARA, K. et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. **Clin Cancer Res.** 2001;7:3410–3415.

TAO, X.; HUANG, Y.; LI, R. et al (2007). Assessment of local angiogenesis and vascular endothelial growth factor in the patients with atrophic-erosive and reticular oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 103: 661–669

TERAI, S.; FUSHIDA, S.; TSUKADA, T. et al. Bone marrow derived "fibrocytes" contribute to tumor proliferation and fibrosis in gastric cancer. **Gastric Cancer.** 2014 May 4.

TERONEN, O.; HIETANEN, J.; LINDQVIST C. et al. Mast cell-derived tryptase in odontogenic cysts. **J Oral Pathol Med**, 25 (1996), pp. 376–381.

TETE, S.; MASTRANGELO, F.; GRIMALDI, S. et al (2005). Immunohistochemical evaluation of CD31 in human cystic radicular lesions and in keratocysts. **Int J Immunopathol Pharmacol** 18: 39–45.

THODE, C.; JORGENSEN, T. G.; DABELSTEEN, E.; MACKENZIE, I. and DABELSTEEN, S. (2011), Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 40: 201–207.

TLSTY, TD.; COUSSENS, LM. Tumor stroma and regulation of cancer development, **Annu Rev Pathol**, 2006, 1:119–150.

TOMASEK, JJ.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002;3:349–63.

TSUNEKI, M.; CHENG, J.; MARUYAMA, S.; IDA-YONEMOCHI, H.; NAKAJIMA, M.; SAKU, T. (2008). Perlecan-rich epithelial linings as a background of proliferative potentials of keratocystic odontogenic tumour. **J Oral Pathol Med** 37: 287–293.

TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; SMITH, M.J.; Smith, V.C.; Dang, T.D.; Rowley, D.R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. **Clin Cancer Res**, 8 (2002), pp. 2912–2923.

UCUZIAN, A.A, et al. Molecular mediator of angiogenesis. **J Burn Care Res.** V.31, p.158-75, 2010.

ULLAH, E.; NAGI, AH.; ASHRAF, M. Angiogenesis and mast cell density as predictors of patient survival in squamous cell carcinoma of lung. **J Cancer Res Ther.** 2013 Oct-Dec;9(4):701-5. doi: 10.4103/0973-1482.126487.

VAKKILA, J.; LOTZE, MT.; RIGA, C.; JAFFE, R. (2005) A basis for distinguishing cultured dendritic cells and macrophages in cytopins and fixed sections. **Pediatr Dev Pathol** 8: 43-51.

VALENT, P.; SCHERNTHANER, GH.; SPERR, WR.; FRITSCH, G.; AGIS, H.; WILLHEIM, M.; BURING, HJ.; et al. Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. **Immunol Rev.** 2001;179:74–81

VALTOLA, R.; SALVEN, P.; HEIKKILA, P.; TAIPALE, J.; JOENSUU, H.; REHN, M. et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. **Am J Pathol.** 1999; 154:1381-1390.

VAN GINDERACHTER, JA.; MOVAHEDI, K.; HASSANZADEH GHASSABEH G. et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology** 2006;211(6–8):487–501. Epub 2006 July 21. Review.

VERED, M.; SHOHAT, I.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Miofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions **Oral Oncol.** 2005 Nov 41 (10); 1028-33

VIGNAUD, J. M.; MARIE, B.; KLEIN, N.; PLENAT, F.; PECH, M.; BORRELLY, J.; MARTINET, N.; DUPREZ, A.; MARTINET, Y. The role of platelet-derived growth factor production by tumor-associated macrophages in tumor stroma formation in lung cancer **Cancer Res.** 1994 54,5455-5463.

VINOGRADOV, S.; WARREN, G.; WEI X. Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates. **Nanomedicine (Lond).** 2014 Apr;9(5):695-707. doi: 10.2217/nnm.14.13.

VITALITI, G.; CIMINO, C.; COCO, A.; PRATICÒ, AD.; LIONETTI, E. The immunopathogenesis of cow's milk protein allergy (CMPA). **Ital J Pediatr.** 2012 Jul 23;38:35. doi: 10.1186/1824-7288-38-35.

VLEUGEL, M. M. et al. Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis. **J Clin Pathol**, v. 57, n. 7, p. 746-51, 2004.

VONG, S.; KALLURI, R. The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis, **Genes Cancer**, 2011, 2(12):1139–1145.

WALSH, LJ. Mast cells and oral inflammation. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2003;14(3):188-98.

WANG, R.; ZHANG, J.; CHEN, S.; LU, M.; LUO, X.; YAO, S.; LIU, S.; QIN, Y.; CHEN, H. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. **Lung Cancer** 74 (2011) 188–196.

WANG, Y.; OLIVER, G. Current views on the function of the lymphatic vasculature in health and disease, **Genes Dev**, 2010, 24(19):2115–2126.

WAYNER, A.; CARTER, G.; PIOTROWICZ, S.; KUNICK, TJ. The function of multiple extracellular matrix receptors in mediating cell adhesion to extracellular matrix: preparation of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins Ic-IIa. **J Cell Biol**. 1988;107:1881–91.

WEATHERS, D. R.; CAMPBELL, W. G. Ultrastructure of the giant-cell fibroma of the oral mucosa. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 38, n. 4, p. 550-561, 1974.

WEBER, CE.; LI, NY.; WAI, PY.; KUO, PC. Epithelial-mesenchymal transition, TGF-b, and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury. **J Burn Care Res** 2012; 33: 311–8.

WEIDNER, N.; SEMPLE, JP.; WELCH, WR.; FOLKMAN, J. Tumour angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. 1991. **N Engl J Med** 324: 1–8.

WERNER-BUSSE, A.; ZUBERBIER, T.; WORM, M. The allergic emergency - management of severe allergic reactions. **J Dtsch Dermatol Ges**. 2014 May;12(5):379-88.

WIGLE, JT.; and OLIVER, G. Prox 1 function is required for the development of the murine lymphatic system. **Cell** 1999; 98: 769-778.

WRIGHT M. D.; and TOMLINSON M. G. (1994) The ins and outs of the transmembrane-4 superfamily. **Zmmun. Today** 15,588- 594.

WYNN, TA.; BARRON, L. (2010) Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Semin Liver Dis** 30: 245-257.

XUAN, M.; FANG, YR.; WATO, M.; HATA, S.; TANAKA, A. Immunohistochemical co-localization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**. 2005; 34: 334-339.

YEN, T.W.; AARDAL, N.P.; BRONNER, M.P.; THORNING, D.R.; SAVARD, C.E.; LEE, S.P. et al. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. **Surgery**, 131 (2002), pp. 129–134

YONEMURA, Y. et al. Evaluation of lymphatic invasion in primary gastric cancer by a new monoclonal antibody, D2-40. **Hum Pathol**, v. 37, n. 3, p. 313–318, 2006.

ZHANG, BC.; GAO, J.; WANG, J.; RAO, ZG.; WANG, BC.; GAO, JF. Tumor-associated macrophages infiltration is associated with peritumoral lymphangiogenesis and poor prognosis in lung adenocarcinoma. **Med Oncol** 2010;28(4):1447–52.

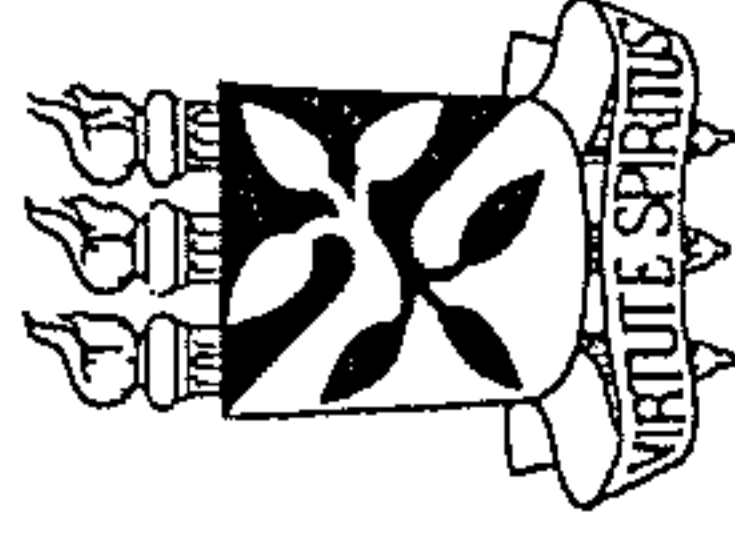
ZHANG, M.; HE, Y.; SUN, X.; LI, Q.; WANG, W.; ZHAO, A.; DI, W. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. **J Ovarian Res**. 2014 Feb 8;7(1):19.

ZIZZI, A.; ASPRIELLO, S.; FERRANTE, L.; STRAMAZZOTTI, D.; COLELLA, G. BALERCIA, P., LO MUZIO, L.,; PIEMONTESE, M.; GOTERI, G. and RUBINI, C. Immunohistochemical correlation between microvessel density and lymphoid infiltrate in radicular cysts. **Oral Diseases**, 2013. 19: 92–99.

ZUDAIRE, E.; MARTÍNEZ, A.; GARAYOA, M. et al. Adrenomedullin is a cross-talk molecule that regulates tumor and mast cell function during human carcinogenesis. **Am. J. Pathol.** 2006; 168; 280– 291.

ZUSTIN, J.; SCHEUER, HA. & FRIEDRICH, RE.: Podoplanin expression in human tooth germ tissues and cystic odontogenic lesions: an immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med** 39: 115-120, 2010.

ANEXO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA, em sessão ordinária no dia 13 de maio de 2014, através do Parecer Consubstanciado nº 646.081, resolveram aprovar o projeto de pesquisa “Contribuição dos mastócitos na diferenciação de miofibroblastos, remodelação do estroma e formação vascular do tumor odontogênico queratocístico”, do pesquisador Ernesto Santos Sousa Neto, Grande área 4: Ciências da Saúde, registro no CONEP: 13778513.0.0000.5024.

Salvador, 13 de maio de 2014.

Profa. Dra. Sandra de Cássia Santana Sardinha

Coordenadora do CEP FOUFBA

*Dr(a) Sandra de Cássia Santana Sardinha
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa e em Humano
FOUFBA*