

UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde



FLÁVIA GODINHO COSTA WANDERLEY ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR E
MATRIZ COLAGÊNICA EM ADENOMAS
PLEOMÓRFICOS ORAIS**

FLÁVIA GODINHO COSTA WANDERLEY ROCHA

CARACTERIZAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR E MATRIZ COLAGÊNICA EM ADENOMAS PLEOMÓRFICOS ORAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Botelho Martins

Coorientadora: Profa. Dra. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado.

Salvador
2018

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

Rocha, Flávia Godinho Costa Wanderley

Caracterização da densidade vascular e matriz colagênica em adenomas pleomórficos orais./ [Manuscrito]. Flávia Godinho Costa Wanderley Rocha. Salvador, 2018.

69f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Botelho Martins.

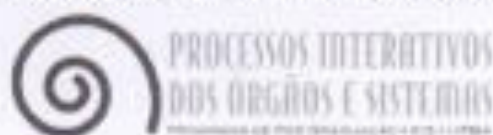
Coorientadora: Profa. Dra. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2018.

1. Adenoma Pleomórfico. 2. Colágeno. 3. Vasos Sanguíneos I. Martins, Gabriela Botelho. II. Medrado, Alena Ribeiro Alves Peixoto. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título

CDD – 617.6 21. ed.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO

DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

FLÁVIA GODINHO COSTA WANDERLEY ROCHA

CARACTERIZAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR E MATRIZ COLAGÊNICA EM
ADENOMAS PLEOMÓRFICOS ORAIS

Salvador, Bahia, 20 de novembro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.º Dr.º Gabriela Botelho Martins – Universidade Federal da Bahia

Prof.º Dr.º Daniela Nascimento Silva – Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.º Dr.º Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado – Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Durante todo o mestrado, dediquei-me com afinco à realização da dissertação. Hoje, ao concluí-la o sentimento é de dever cumprido!

Registro meus sinceros agradecimentos:

A Deus, por tudo! Em especial, agradeço por colocar pessoas que me alicerçaram para que este trabalho pudesse ser concretizado.

A minha avó, Maria Helena, por acreditar em meus estudos, sobretudo pelo carinho de sempre.

A meus pais, Ana Emília e Eduardo, pelo apoio concedido durante todo meu curso de mestrado, principalmente pelo amor incondicional.

A minha irmã, Fabiana, por torcer pelas minhas conquistas e por se fazer presente em todas as situações em que mais precisei de seu amparo.

A meu esposo, Hugo, pelo companheirismo durante esta trajetória acadêmica tão importante em minha vida pessoal e profissional, sobretudo por seu amor que me fortaleceu em vários momentos dessa caminhada.

À Professora Doutora Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado, por acreditar em meu potencial quando aceitou orientar este trabalho, por sua presença de forma fiel na construção deste estudo e pelos ensinamentos transmitidos por meio de sua conduta, os quais, muitas vezes, perpassaram os conhecimentos técnico-científicos, como, por exemplo, os de retidão de caráter, bem como o de respeito ao próximo.

Ao Professor Doutor Roberto Paulo Correia de Araújo, que me assegurou, inicialmente, ser sua orientanda, acreditando neste estudo e em todos os profissionais envolvidos, além de ter contribuído fortemente na construção científica deste trabalho, através de suas aulas na disciplina *Pesquisa Orientada Presencial*, do Programa de Pós-graduação do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA.

A Professora Doutora Gabriela Botelho Martins, pela assistência durante meu acesso ao Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA), na análise histológica das lâminas e pela importante colaboração científica na construção deste estudo, mesmo tendo sido convocada para ser a orientadora oficial deste trabalho em um curto espaço de tempo.

A Professora Doutora Sílvia Regina Reis, pela valorosa contribuição a esta dissertação, com a revisão dos diagnósticos anatomopatológicos e a avaliação criteriosa da construção científica deste estudo.

Ao Professor Doutor Urbino Tunes, pelo consentimento para uso de arquivos e similares relativos aos prontuários dos pacientes atendidos por alunos e professores do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Ao Professor Doutor Zilton Andrade, pela permissão de meu acesso ao Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (FIOCRUZ-UFBA), bem como aos insumos para a realização da técnica imuno-histoquímica nesse local.

A Professora Doutora Ana Cristina Gonzalez, pela gentileza ao me orientar na técnica imuno-histoquímica, no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (FIOCRUZ-UFBA).

A Técnica do Laboratório de Patologia Oral da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Tânia Miranda, pelo auxílio na busca das fichas de biópsias das lesões estudadas, assim como pelo suporte nas técnicas de coloração de rotina, tais como as de hematoxilina-eosina e Sirius vermelho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela contribuição financeira, durante o período do mestrado no Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da UFBA, bem como no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas da Pós-graduação do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, pelos momentos de troca de conhecimentos e também pelos de descontração.

Finalmente, agradeço, também, a todos aqueles que, indiretamente, contribuíram na elaboração de minha dissertação.

ROCHA, Flávia Godinho Costa Wanderley. **Caracterização da densidade vascular e matriz colagênica em adenomas pleomórficos orais**. 2018. 69f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

RESUMO

No contexto tumoral, a densidade vascular e a organização da matriz colagênica representam fatores críticos para o desenvolvimento e a progressão da neoplasia. Este estudo objetivou analisar essas variáveis da matriz extracelular em adenomas pleomórficos orais. Trata-se de um estudo de corte transversal, que avaliou comparativamente 21 casos de adenoma pleomórfico e 21 secções de mucosa oral normal, obtidos em arquivos de um Serviço de Patologia Bucal. As secções teciduais foram submetidas ao estudo imuno-histoquímico com anticorpo monoclonal específico para a proteína CD31 e para o estudo da densidade vascular, sendo coradas com Sirius vermelho para avaliação do colágeno. Células individuais com padrão de marcação positiva foram contadas em campos específicos, por meio de estudo morfométrico, com posterior análise estatística. Observou-se que o número de células CD31+ foi maior nas lesões tumorais, quando comparadas àquelas de mucosa oral normal ($p=0,004$), as quais se situavam sempre ao redor de vasos sanguíneos. Nas lesões tumorais, a correlação da área do colágeno com a densidade vascular foi fraca entre essas duas variáveis ($p=0,843$). Os dados apresentados sugerem que a crescente expressão de células CD31+ associadas aos capilares sanguíneos pode estar relacionada à neoangiogênese no contexto tumoral. Além disso, o aumento da concentração de fibras colágenas proporcional à quantidade de vasos, sugere que, nestas lesões, o processo de remodelamento ocorre ativamente.

Palavras-chave: Adenoma Pleomórfico. Colágeno. Vasos Sanguíneos.

ROCHA, Flávia Godinho Costa Wanderley. *Characterization of vascular density and collagen matrix in oral pleomorphic adenomas*. 2018. 69f. Dissertation (Masters in Interactive Processes of Organs and Systems) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2018.

ABSTRACT

Tumor vascular density and collagen matrix organization are critical factors to neoplasia development and progression. Objective: This study aimed to analyze the variables associated with the extracellular matrix in oral pleomorphic adenomas. Methodology: This cross-sectional study comparatively evaluated 21 cases of pleomorphic adenomas and 21 sections of regular oral mucosa from the files of an oral pathology department. The tissue sections were subjected to immunohistochemical study with a monoclonal antibody specific to CD31 protein to assess vascular density and were also stained with Sirius red to evaluate the levels of collagen. The numbers of positively-stained cells were enumerated in specific fields through morphometric study, with subsequent statistical analysis. Results: Higher numbers of CD31-positive cells were observed in tumor cells than in cells in the regular oral mucosa ($p=0.004$), which were always located around blood vessels. In tumor lesions, the correlation of the collagen area with vascular density was weak between these two variables ($p=0.843$). Conclusion: The results suggested that the increased expression of CD31+ in cells associated with capillaries may be related to tumor neoangiogenesis. Furthermore, an increase in the concentration of collagen fibers proportional to the number of blood vessels in the neoplastic sections suggested the active role of these lesions in the remodeling process.

Keywords: Pleomorphic Adenoma. Collagen. Blood Vessels.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Expressão do anticorpo anti-CD31 em células situadas no endotélio, presentes em secções de adenoma pleomórfico (A) e mucosa oral normal (B). Expressão imuno-histoquímica, Anti-CD31.400X (ICS, 2018) 22
- Figura 2** Expressão de colágeno presente em secções de Adenoma Pleomórfico (A) e mucosa oral normal (B). Expressão histoquímica com Sirius vermelho. 400X (ICS, 2018) 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos obtidos a partir dos laudos de biópsia de pacientes com adenoma pleomórfico na amostra estudada (EBMSP, 2018)	21
Tabela 2	Quantitativo de vasos com células CD31+ e área correspondente ao colágeno em mucosa oral normal (controle) e adenoma pleomórfico (ICS, 2018)	23
Tabela 3	Correlação entre a densidade vascular e a área de colágeno em mucosa oral normal (controle) e adenoma pleomórfico (ICS, 2018)	23

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
CD31	<i>Cluster Determinant</i> 31 (Determinante de Agrupamento 31)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
EBMSP	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
<i>et al.</i>	<i>et alli (e colaboradores)</i>
HE	Hematoxilina-eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases da matriz
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i> (Molécula de Adesão Endotelial de Plaquetas-1)
pH	potencial Hidrogeniônico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
USA	<i>United States of America</i>
µm	Micrômetro
°C	Grau centígrado
®	Marca registrada
%	Unidade de valor percentual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 JUSTIFICATIVA	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
4 METODOLOGIA	18
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	18
4.2 DESENHO DO ESTUDO	18
4.3 PROCEDIMENTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS	18
4.4 HISTOMORFOMETRIA	19
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5 RESULTADOS	21
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa	32
ANEXO 2 – Notas Técnicas	36
ANEXO 3 – Manuscrito 1: Artigo de Revisão de Literatura	40
ANEXO 4 – Manuscrito 2: Artigo Original	46
ANEXO 5 – Normas da Revista de Ciências Médicas e Biológicas	61
ANEXO 6 – Comprovante de submissão do Artigo Original para a Revista Head & Neck Pathology	69

1 INTRODUÇÃO

O estroma tumoral é um constituinte importante para o desenvolvimento das neoplasias¹. A matriz extracelular (MEC) tumoral pode influenciar na progressão do tumor, por lhe conferir propriedades específicas² e também por exercer papel na nutrição, por meio da formação de vasos sanguíneos^{3,4}.

A proteína mais abundante que integra estruturalmente a MEC é o colágeno⁵. Durante o crescimento neoplásico, pode ocorrer um aumento na deposição de colágeno, principalmente dos tipos I e III, o que caracteriza a reação desmoplástica do estroma. Esse fenômeno, juntamente com a resposta imune e a neoangiogênese, constituem as principais respostas do hospedeiro em relação à presença de células neoplásicas⁶.

Recentes estudos têm procurado enfatizar a caracterização da MEC que compõe o estroma tumoral em diversos tipos de neoplasia^{7,8}. De fato, percebe-se que, ao longo dos anos, muita ênfase foi direcionada ao estudo das células neoplásicas em detrimento dos constituintes do estroma tumoral⁹. Essa abordagem mais atual, voltada para o estudo da MEC e de seus constituintes, tem sido útil para determinar o comportamento biológico das neoplasias¹⁰. Nesse contexto, percebe-se essa mesma premissa em relação ao tumor benigno de glândulas salivares mais prevalente da cavidade oral, o adenoma pleomórfico, pois se verifica que seu comportamento biológico não tem sido muito explorado na literatura, em especial no tocante às características do estroma tumoral¹¹.

Do ponto de vista clínico, o adenoma pleomórfico apresenta-se como lesão nodular única, com margens bem delimitadas, superfície lobulada, consistência endurecida, móvel e indolor à palpação. Histologicamente, observa-se grande variedade de tipos celulares, não apenas entre diferentes tumores, mas também em diferentes partes de um mesmo tumor. Sendo assim, é possível observar a presença de estruturas ductais e císticas, além de ninhos ou ilhas de células, nas dependências do tecido epitelial, ao passo que ele apresenta um estroma eosinófilo e hialinizado, com células epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais envoltas por tecido mucoide, mixoide, condroide ou mesmo osteoide. Normalmente, essa lesão se apresenta encapsulada¹. A transformação maligna do adenoma pleomórfico ocorre principalmente após recidivas do tumor, ou em casos nos quais ele apresente um longo tempo de evolução. Nessa situação, recebe a denominação de carcinoma ex-adenoma pleomórfico¹².

Alguns marcadores imuno-histoquímicos têm sido utilizados para identificar alterações no estroma de neoplasias de glândulas salivares, a exemplo daqueles que evidenciariam um aumento da densidade vascular, tal como o CD 31, o qual pode sugerir o processo de neoangiogênese, uma vez que eles são expressos por células endoteliais, que integram os vasos sanguíneos presentes no estroma neoplásico¹³. Sabe-se que a densidade vascular constitui uma variável relevante para o desenvolvimento do tumor, pois, além de atender às demandas metabólicas das células neoplásicas pode contribuir para o incremento do processo inflamatório que ocorre como resposta do organismo ao ambiente neoplásico¹⁴.

Adicionalmente, alguns autores demonstraram que a formação de novos vasos no contexto tumoral e o conseqüente aumento da densidade vascular podem estar relacionados com o aumento da biossíntese de colágeno e outros constituintes da matriz extracelular por parte dos fibroblastos^{4,5}.

1.1 JUSTIFICATIVA

Percebe-se que o adenoma pleomórfico, embora seja o tumor benigno mais frequente em glândulas salivares, não tem sido estudado de forma expressiva na literatura no que se refere às características de sua matriz extracelular. Poucos estudos foram encontrados que abordavam a proteína colágeno ou os marcadores moleculares de proteínas da matriz extracelular que poderiam auxiliar no entendimento do comportamento biológico do tumor.

Assim, as informações obtidas a partir deste trabalho poderão contribuir para um melhor conhecimento das características dessa neoplasia e de seu comportamento biológico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente, através de um estudo imuno-histoquímico, a densidade vascular e a expressão de colágeno no estroma de adenomas pleomórficos orais e na mucosa oral normal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características clínicas relacionadas à amostra selecionada.
- Quantificar o número de vasos distribuídos na matriz extracelular a partir do padrão de marcação imuno-histoquímica das células CD 31 (PECAM) e, dessa forma, sugerir a densidade vascular em tecidos de mucosa oral normal no estroma de adenoma pleomórfico.
- Quantificar, através da coloração com Sirius vermelho, a expressão de colágeno presente na matriz extracelular de mucosa oral normal e no adenoma pleomórfico, comparativamente.
- Correlacionar a densidade vascular e a área de colágeno na amostra estudada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O adenoma pleomórfico é considerado como a neoplasia benigna mais comum das glândulas salivares maiores, a exemplo da parótida, correspondendo a cerca de 60 a 70% dos casos, embora possa ocorrer em qualquer das glândulas salivares menores. A faixa etária mais acometida corresponde à 5ª década de vida, com prevalência no sexo feminino¹⁵.

Do ponto de vista clínico, o adenoma pleomórfico se apresenta como lesão nodular única, com margens bem delimitadas, superfície lobulada, consistência endurecida, móvel e indolor à palpação. Histologicamente, observa-se grande variedade de tipos celulares, não apenas entre diferentes tumores, mas também em diferentes partes de um mesmo tumor. Sendo assim, é possível observar a presença de estruturas ductais e císticas, além de ninhos ou ilhas de células nas dependências do tecido epitelial, ao passo que apresenta um estroma eosinófilo e hialinizado com células epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais envoltas por tecido mucoide, mixoide, condroide ou mesmo osteoide. Normalmente, essa lesão apresenta-se encapsulada¹.

A transformação maligna do adenoma pleomórfico ocorre principalmente após recidivas do tumor, ou em casos nos quais ele apresenta um longo tempo de evolução. Nessa situação, recebe a denominação de carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Embora o carcinoma ex-adenoma pleomórfico seja um tumor maligno raro, representa 2 a 4% de todas as neoplasias de glândulas salivares¹². Entretanto, ainda não está totalmente esclarecida, na literatura, a influência dos fatores moleculares relacionados à sua malignização.

Em 2009, Mitelman, Johansson, Mertens¹⁶ elaboraram um banco de dados de alterações cromossômicas em câncer. Ao analisarem 224 adenomas pleomórficos, verificaram que 30% desses tumores possuíam um cariótipo normal, enquanto 70% apresentavam algum tipo de alteração cromossômica. As alterações mais comumente observadas foram translocações balanceadas nos cromossomos, inversões e alterações não balanceadas. No que se refere às translocações cromossômicas balanceadas, elas eram compostas por regiões gênicas t(3;8)(p21;q12), t(8;9)(q12;p22) e t(5,8)(p13;q12), enquanto que as de inversões envolviam os fragmentos gênicos 12p12-p13 e 12q15-q24. As alterações não balanceadas foram caracterizadas pelas regiões 8p23 e 8q12.

A respeito das translocações cromossômicas balanceadas em adenomas pleomórficos, os genes envolvidos nesses processos são o PLAG1 e HMGIC. Dentre esses genes, o mais importante para o contexto tumoral do adenoma pleomórfico é o PLAG1, frequentemente alterado nos estudos citogenéticos desse tipo de lesão¹⁷. Sabendo-se que a alteração do gene PLAG1, no adenoma pleomórfico, ocorre devido às translocações cromossômicas balanceadas recorrentes¹⁸, Voz et al.¹⁸, em 1998, verificaram, em seus estudos, que as translocações cromossômicas mais frequentes para o surgimento da expressão alterada do PLAG1 envolviam as regiões t(3;8)(p21;q12) e t(5;8)(p13;q12).

Asp, Persson, Kost-Alimova, Stenman¹⁹, em 2006, e Kandasamy et al.²⁰, em 2007, ao realizarem ensaios citogenéticos e moleculares, também verificaram que a heterogeneidade de rearranjos que ocorrem no gene PLAG1 contribui para o desenvolvimento de adenomas pleomórficos. A recorrência dessas lesões pode ser causada pelo aumento do número das mutações genéticas²¹.

Sabe-se que o estroma tumoral é um constituinte importante para o desenvolvimento das neoplasias. Nesse tumor, a matriz extracelular (MEC) é constituída por células mesenquimais, tais como fibroblastos e adipócitos, e também vasos sanguíneos e linfáticos, fibras, nervos e células imunocompetentes²².

Em relação à MEC tumoral, ela pode apresentar variação em sua composição, como, por exemplo, aumento da biossíntese de colágeno, o que poderá conferir propriedade de resistência ao tumor²³. Além disso, a matriz é de grande importância para a progressão tumoral, pois permite nutrição da neoplasia por meio da formação de vasos sanguíneos, sendo esse processo denominado de neoangiogênese⁴.

Embora o papel do estroma no desenvolvimento tumoral já tenha sido descrito na literatura, ainda não está totalmente elucidada a interação entre epitélio e mesênquima no desenvolvimento do tumor⁵. Essa interação pode ser representada tanto por células epiteliais, que constituem o parênquima do tumor, quanto por células endoteliais constitutivamente presentes na parede de vasos sanguíneos, que interagem com a matriz extracelular^{22,24,25}.

A neoangiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Isso ocorre em determinadas condições fisiológicas e patológicas, tais como embriogênese, cicatrização, crescimento tumoral e metástase^{26,27}.

O principal estímulo fisiológico da neoangiogênese é a hipóxia. Ela ocorre devido à ativação dos fatores pró-angiogênicos a exemplo do Fator de Crescimento Endotelial

Vascular (VEGF) que se ligam a receptores presentes nas células endoteliais, células de músculo liso e em pericitos. Essa interação entre ligante e receptor ativa as células e promove o brotamento de novos capilares²⁸.

No que se refere ao VEGF, ele tem sido descrito como um dos principais fatores de crescimento indutor da neoangiogênese. Embora o VEGF possa estimular diretamente as células endoteliais e os fibroblastos para a formação de novos vasos, o mecanismo molecular subjacente a seu estímulo ainda permanece desconhecido²⁸. Apesar de estar bem estabelecida na literatura a função do VEGF na neoangiogênese, pouco se sabe a respeito de sua participação em tumores de glândulas salivares, especialmente no adenoma pleomórfico.

Também conhecido como PECAM, o CD31 é um anticorpo monoclonal que se expressa na superfície de plaquetas, monócitos, granulócitos, células B e na junção intracelular endotelial²⁹. Alguns estudos sugerem que o CD31 esteja envolvido na angiogênese, na trombose e na cicatrização de feridas³⁰⁻³².

Nakayama et al.³³, em 1999, analisaram 21 adenomas pleomórficos por meio da técnica imuno-histoquímica com os anticorpos anti-CD31 e anti-CD34, a fim de distinguir os vasos sanguíneos das células intersticiais positivas. Os autores encontraram positividade de CD31 e CD34 nas células endoteliais, mas consideraram o CD31 melhor marcador para se obter a densidade vascular, devido à sua maior especificidade em relação ao CD34.

Pelo fato de participar da densidade vascular da neoangiogênese, o CD31 tem sido utilizado para identificar alterações no estroma tumoral de glândulas salivares^{13,34}.

Sabendo-se que a quantidade de colágeno também pode denotar alteração no estroma tumoral, métodos de coloração histoquímica, como a coloração com o Sirius vermelho ou Picrosirius, por exemplo, têm sido utilizados para determinar a quantidade de colágeno presente na MEC de tumores diversos, inclusive do adenoma pleomórfico³⁵.

Quanto à matriz colagênica do estroma tumoral, ela apresenta principalmente colágenos do tipo I e III. O colágeno do tipo III é mais observado quando o estroma está recém-formado, enquanto o colágeno do tipo I é mais evidente nas zonas fibrosas dos carcinomas; eles estão mais relacionados com a progressão e a metástase do tumor⁶. O Picrosirius é uma coloração que permite a identificação das fibras colágenas no estroma, principalmente as do tipo I e III^{30,36,37}.

Apesar de a literatura já apresentar dados relativos a alterações existentes na interação epitélio-mesênquima em tumores de glândulas salivares^{38,39}, ainda se faz

pertinente a realização de estudos que possam colaborar para o entendimento do comportamento biológico dessas lesões. Nesse caso, especificamente, do adenoma pleomórfico e de seu estroma tumoral.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi submetida à avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (CEP-Bahiana/EBMSP) e aprovada com o parecer nº 2.224.520. (ANEXO 1).

4.2 DESENHO DO ESTUDO

O estudo tem um caráter retrospectivo, de corte transversal e caráter observacional. Contemplou 21 casos de adenomas pleomórficos orais, diagnosticados de janeiro de 2008 a dezembro de 2017 e selecionados dos arquivos do laboratório de Patologia Oral da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). Dados sobre sexo, idade e localização da lesão foram coletados de indivíduos com adenoma pleomórfico oral. O diagnóstico anatomopatológico das secções teciduais coradas por hematoxilina-eosina (HE) foi revisado e confirmado por dois patologistas experientes.

Para integrar o grupo de controle, 21 secções de mucosa oral normal, obtidas a partir de biópsias de mucocele, foram selecionadas randomicamente dos mesmos arquivos.

Foram considerados como critérios de inclusão: tecidos incluídos em parafina não ressecada e que apresentassem amostras representativas, além de fichas de biópsia que incluíssem detalhes completos referentes às lesões. Em relação à amostra de mucocelos, considerou-se a presença de tecido normal preservado como condição para inclusão no estudo.

4.3 PROCEDIMENTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Em todos os materiais incluídos em parafina, foram realizados cortes de tecido de quatro micrômetros (μm) de espessura, e, a seguir, foram montados em lâminas de vidro previamente preparadas com 3-Aminopropyl triethoxysilane (Sigma Aldrich, St. Louis -

USA). Algumas secções foram submetidas à coloração de Hematoxilina-eosina e Sírius vermelho, ao passo que outras foram reservadas para o estudo imuno-histoquímico.

O método de imunomarcção utilizado foi o da streptavidina-biotina peroxidase, e o anticorpo monoclonal primário utilizado foi o anti-CD31 (1:80; Dako Corporation, Denmark). Os cortes histológicos dos grupos de estudo foram submetidos à desparafinização em banhos sequenciais de xilol, acetona, álcool (absoluto, 95%, 70%, 50%, 30%) e água destilada, em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato, pH 6.0, com posterior bloqueio das ligações inespecíficas (leite desnatado a 10%) e então incubados “*overnight*” a 4° C, com o anticorpo primário. O anticorpo secundário utilizado seguiu as orientações do Kit 1. SAB-Peroxidase (DAKO Corporation, USA), e a revelação foi realizada por meio do DAB com peróxido de hidrogênio a 30%. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina e montadas com lamínula e bálsamo do Canadá para avaliação morfológica e análise quantitativa.

Foram utilizados, como controle positivo, cortes de hemangioma removidos por indicação cirúrgica prévia e, como controle negativo, os mesmos tecidos, com omissão dos respectivos anticorpos primários. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo-Moniz, Salvador/Ba.

4.4 HISTOMORFOMETRIA

A captura das imagens dos cortes teciduais submetidos à técnica de imuno-histoquímica para CD31 e coradas por Sírius foi realizada com o software Motic Images Advanced 3.0[®] (Motic China Group CO. LTD) no Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Foi estabelecida uma área padrão de 3467902,976 μm^2 . Dez imagens padrão, próximas à junção de parênquima e estroma, correspondentes a cada caso foram capturadas com a dimensão estabelecida e, nelas, foi quantificado o número de células positivas resultantes da imunomarcção. Em seguida, esses dados foram comparados em relação à área total selecionada. A mensuração da área representativa do quantitativo de colágeno, na coloração por Sírius vermelho, foi realizada de modo semelhante, considerando o percentual de coloração em relação à área total. Todas as análises foram feitas por um mesmo examinador calibrado previamente.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi criado no *Microsoft® Excel®* 2010 (versão 14.0.7132.5000), *Microsoft® Office Professional Plus* 2010, USA e analisado no *software R* (versão 3.1.1). Procedeu-se à análise descritiva (frequência absoluta e relativa, média, mediana, desvio padrão e quartis). Para verificar a existência de diferenças significativas nas medidas referentes às células positivas para os anticorpos, de acordo com os grupos de estudo, foram utilizados diferentes testes estatísticos. A distribuição dos dados quanto à normalidade foi testada com o teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste ANOVA, seguido do teste post hoc de Bonferroni. O nível de significância estabelecido para este trabalho foi de $p < 0,05$. Para correlacionar a área do colágeno com a densidade vascular, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson.

5 RESULTADOS

Do total de 21 casos de adenoma pleomórfico, verificou-se que 11 (52,4%) corresponderam a indivíduos do sexo masculino e 10 (47,6%) a pessoas do sexo feminino. Em relação à faixa etária dos casos catalogados, houve variação entre a primeira e a sexta décadas de vida, com idade média de 39 anos. O maior número de casos das neoplasias concentrou-se entre a terceira e a quinta décadas de vida (57,1%). Do total de lesões apresentadas, 38,1% localizaram-se no palato, 14,3% na mucosa jugal, 14,3% no lábio superior, 9,5% na glândula sublingual e 4,8% na parótida. A ocorrência em regiões mais raras, como região do seio zigomático, fundo do sulco em lábio superior direito, vestíbulo lingual da região de mandíbula e lesão intraóssea em área de 2º pré-molar, assim como outras áreas não especificadas compuseram 19% da amostra (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados clínicos obtidos a partir dos laudos de biópsia de pacientes com adenoma pleomórfico na amostra estudada (EBMSP, 2018).

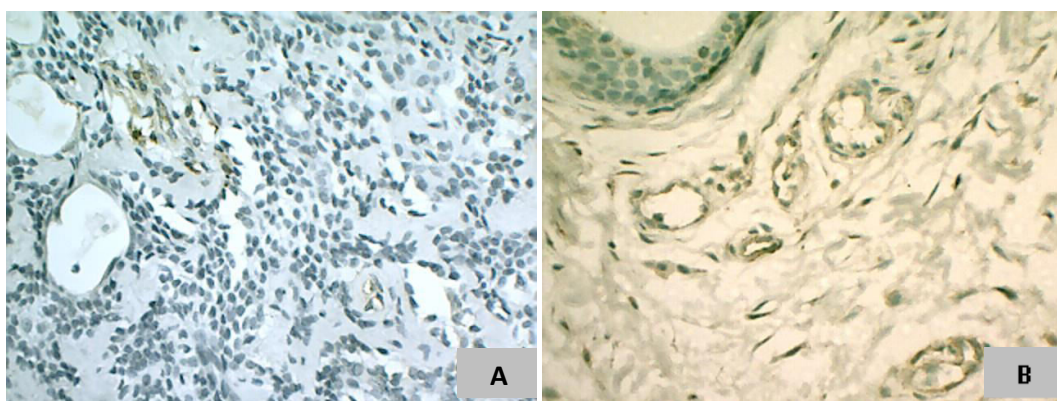
Variável	n=21	%
Sexo		
Masculino	11	52,4
Feminino	10	47,6
Idade (anos)		
Até 30	5	23,8
31 a 50	12	57,1
≥ 51	3	14,3
Não referido	1	4,8
Localização da lesão		
Palato	8	38,1
Regiões incomuns e não especificadas	4	19
Lábio superior	3	14,3
Mucosa jugal	3	14,3
Sublingual	2	9,5
Parótida	1	4,8

Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 2 demonstra a distribuição da densidade vascular por meio da expressão do anticorpo anti-CD31. Ela foi significativamente superior nos Adenomas Pleomórficos, quando comparados ao grupo de controle ($p=0,004$). Nas lesões tumorais e nas secções do

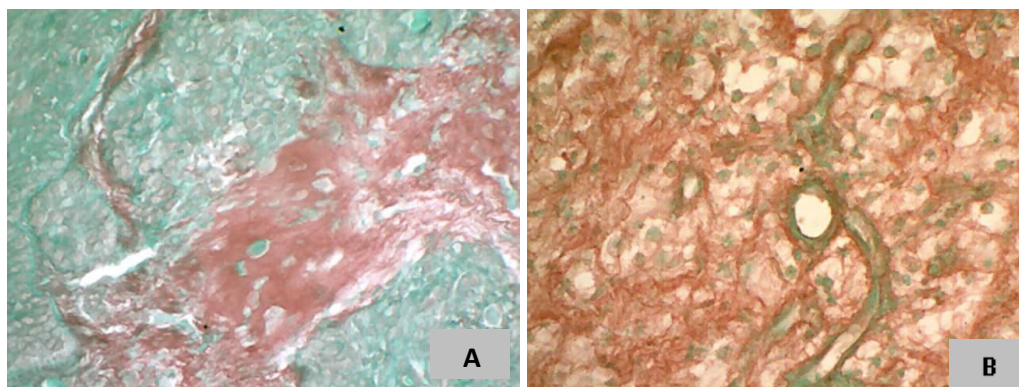
controle, observou-se presença de células CD31+ com padrão de marcação citoplasmático, que contornavam o lúmen dos capilares sanguíneos e pequenas arteríolas na região das células endoteliais (Figura 1). Em relação à área correspondente ao colágeno, observou-se que ela foi maior nas secções de mucosa oral normal do que no estroma tumoral ($p=0,041$) (Figura 2, Tabela 2).

Figura 1 – Expressão do anticorpo anti-CD31 em células situadas no endotélio, presentes em secções de Adenoma Pleomórfico (A) e Mucosa Oral Normal (B). Expressão imuno-histoquímica, anti-CD31. 400X (ICS, 2018).



Fonte: Autoria própria

Figura 2 – Expressão de colágeno presente em secções de Adenoma Pleomórfico (A) e Mucosa Oral Normal (B). Expressão histoquímica com Sirius vermelho. 400X (ICS, 2018).



Fonte: Autoria própria

Tabela 2 – Quantitativo de vasos com células CD31+ e área correspondente ao colágeno em mucosa oral normal (controle) e adenoma aleomórfico (ICS, 2018).

Grupos de estudo	ÁREA DE COLÁGENO		NÚMERO DE CÉLULAS CD31+	
	Mediana (Q1-Q3)	Quartis	Mediana (Q1-Q3)	Quartis
Controle	1427,01 1972,70	1023,25-	265,82	96,68-612,98
Adenoma pleomórfico	893,24 1922,05	242,58-	641,93	496,92-816,79
p valor		0,041		0,004

Fonte: Dados da pesquisa

A Tabela 3 ilustra a correlação entre a densidade vascular e a área do colágeno. Para o tumor, a correlação foi de $r=0,046$, embora não tenha sido estatisticamente significativa. Nas secções de mucosa oral normal, não houve correlação entre as variáveis $r=-0,081$.

Tabela 3 – Correlação entre a densidade vascular e a área de colágeno em mucosa oral normal (controle) e adenoma pleomórfico (ICS, 2018).

Variáveis	Área de colágeno	
	Coefficiente de correlação de Pearson	p-valor
Número de vasos		
Adenoma pleomórfico	0,046	0,843
Controle	-0,081	0,726

Fonte: Dados da pesquisa

6 DISCUSSÃO

Embora o foco do presente estudo tenha sido caracterizar a MEC de adenomas pleomórficos orais, alguns aspectos de suas características clínicas também foram delineados. Esse tipo de neoplasia é o mais frequentemente observado na cavidade oral e compreende aproximadamente 1,5 a 5% dos tumores que afetam a região de cabeça e pescoço. A localização do adenoma pleomórfico é variável e pode acometer as glândulas parótidas, submandibulares, sublinguais e glândulas salivares menores⁴⁰. Entre as neoplasias benignas localizadas na parótida, a mais frequente é o adenoma pleomórfico, que corresponde a cerca de 53% do total de tumores⁴⁰. Neste trabalho, foram analisados 21 casos de adenomas pleomórficos com localização prevalente no palato (38,1%). Tais dados ratificam aqueles descritos por Wang et al.⁴¹ que, em 2015, analisaram 485 casos de tumores em glândulas salivares menores e observaram que o sítio mais frequente do adenoma pleomórfico foi o palato (64,74%), seguido por mucosa bucal (7,63%) e língua (5,98%).

A literatura registra que a faixa etária mais acometida por adenoma pleomórfico corresponde à 5ª década de vida, com prevalência no sexo feminino⁴². De fato, a ocorrência desta faixa etária foi constatada na presente pesquisa, pois se observou que o maior número de casos se concentrou entre a terceira e a quinta décadas de vida. Contudo, em relação à variável gênero, os autores constataram uma distribuição similar entre homens (52,4%) e mulheres (47,6%).

Sabe-se que o estroma tumoral é de grande importância para a progressão neoplásica. Ele pode apresentar variação em sua composição, como, por exemplo, aumento da biossíntese de colágeno, o que poderá conferir resistência ao tumor⁵ e permitir a nutrição da neoplasia através da formação de vasos sanguíneos^{4,26,27}.

A neoangiogênese tem sido objeto de crescente investigação no contexto tumoral. Independentemente do tipo de tumor, se benigno ou maligno, a presença de vasos recém-formados, que acabam por aumentar a densidade vascular no estroma, pode representar uma condição essencial para a expansão da neoplasia³. Diante do exposto, foi a intenção dos autores desta pesquisa caracterizar a densidade vascular por meio das células CD31+. Embora o aumento do número de vasos, no microambiente de qualquer tumor, seja um evento previsível, essa análise foi importante na descrição e caracterização da MEC desse tumor, permitindo uma ampliação do conhecimento de sua biologia.

Foi observado, um padrão de marcação para as células CD31+ maior nas secções teciduais oriundas do estroma tumoral, quando comparadas àquelas de mucosa oral normal ($p=0,004$). Tal fato parece indicar que, na matriz extracelular dos adenomas pleomórficos, o processo de neoangiogênese encontra-se ativo. Esse evento biológico é relevante para o crescimento da maioria dos tumores benignos e malignos, visto que fornece nutrientes e oxigênio para o metabolismo celular²⁶. Além disso, a formação de novos vasos facilita a entrada de células tumorais na circulação, fato que viabiliza o desenvolvimento de metástase a partir de lesões neoplásicas benignas que evoluem para o fenótipo maligno²⁶. Embora o adenoma pleomórfico seja a neoplasia benigna mais comum de glândula salivar⁴⁰, a correlação entre a densidade vascular e o colágeno, no estroma dessa neoplasia, é pouco evidenciada na literatura.

Em um estudo realizado por Soares et al.⁴³, em 2007, os autores compararam a microdensidade vascular de 10 casos de adenomas pleomórficos sem transformação maligna com 16 casos do carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Os carcinomas ex-adenomas pleomórficos apresentaram-se com e sem diferenciação mioepitelial. Os autores observaram que, no grupo do adenoma pleomórfico, os vasos sanguíneos eram raros e geralmente pequenos. Entretanto, nos casos intracapsulares ou minimamente invasivos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, a quantidade de vasos foi significativamente mais numerosa, o que possibilitou aos autores afirmarem a existência de uma associação entre a neoangiogênese e a progressão da lesão em carcinomas ex-adenomas pleomórficos. Além disso, os autores observaram que, nos tumores com diferenciação mioepitelial, as células neoplásicas geralmente formavam grandes agregados celulares hipovascularizados. Tais resultados corroboraram a hipótese de que o microambiente tumoral das células mioepiteliais poderia estar relacionado com a baixa atividade angiogênica observada nos carcinomas ex-adenomas pleomórficos com diferenciação mioepitelial⁴⁴. No presente estudo, a comparação foi realizada entre estroma tumoral e tecido normal, evidenciando um maior número de vasos no tecido neoplásico. Embora esse resultado seja sugestivo de crescimento e progressão tumoral, o adenoma pleomórfico se caracteriza clinicamente como um tumor benigno, com baixa taxa de crescimento e invasão de tecidos adjacentes. Possivelmente, caso a comparação fosse realizada com as lesões malignas de carcinomas ex-adenoma pleomórficos, o número de vasos na lesão benigna seria menor do que na maligna, o que estaria relacionado ao comportamento biológico dessas lesões malignas.

Quanto à matriz colagênica do estroma tumoral, ela é representada principalmente pelos colágenos do tipo I e III. O colágeno do tipo III é mais observado quando o estroma está recém-formado, enquanto o colágeno do tipo I é mais evidente nas zonas fibrosas dos carcinomas e estão mais relacionados com a progressão e a metástase do tumor maligno⁶.

Métodos de coloração histoquímica, como a coloração com Sirius vermelho, por exemplo, permitem a diferenciação das fibras colágenas no estroma, principalmente as do tipo I e III^{30,36,37}. Em 2012, Samar et al.⁴⁵, ao realizarem um estudo em glândulas salivares de humanos, observaram o predomínio do colágeno tipo I em tumores malignos e do colágeno tipo III em tumores benignos. Nessa pesquisa, não foi realizado um estudo histoquímico que nos permitisse distinguir os colágenos I e III. A área de colágeno total, identificada pela coloração histoquímica com Sirius vermelho, foi maior nas secções de mucosa oral normal do que no estroma tumoral ($p=0,041$). Estudos recentes têm demonstrado que a presença de metaloproteinases da matriz (MMPs) em tumores de glândulas salivares pode ser determinante para a degradação do colágeno da matriz extracelular e, conseqüentemente, aumentar a probabilidade de progressão tumoral^{46,47}. No presente trabalho, é provável que a menor área de colágeno nos adenomas possa estar relacionada com a atividade das MMPs presentes no estroma dessa neoplasia.

Embora as metaloproteinases não tenham sido objeto de investigação nesta análise, a crescente expressão das enzimas de degradação das MMPs nas lesões neoplásicas destaca a relevância desse processo biológico no contexto tumoral, visto que elas podem contribuir fortemente para a progressão neoplásica dos tumores.

Neste estudo, foi correlacionada a área do colágeno com a densidade vascular por meio do coeficiente de correlação de Pearson⁴⁸. O aumento proporcional de fibras colágenas à quantidade de vasos sugere que, nessas lesões, está ocorrendo uma tentativa de remodelamento desses tecidos. À medida que se processa a biossíntese do colágeno, a neoangiogênese se faz presente mediante o aporte adequado de nutrientes e de oxigênio para a sobrevivência das células neoplásicas e estromais^{49,50}.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, observou-se um aumento na densidade vascular dos tecidos neoplásicos em relação ao tecido normal. De maneira inversa, a expressão de colágeno mostrou-se aumentada nos tecidos normais, em detrimento do estroma tumoral. Embora a correlação entre essas variáveis tenha acontecido de forma discreta e não estatisticamente significativa, o aumento proporcional de fibras colágenas à quantidade de vasos, nas secções neoplásicas, permite concluir que, nessas lesões, está ocorrendo um remodelamento tecidual como forma de recuperar suas estruturas normais.

REFERÊNCIAS

1. Satpathy Y, Spadigam AE, Dhupar A, Syed S. Epithelial and stromal patterns of pleomorphic adenoma of minor salivary glands: a histopathological and histochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014; 18(3):379-85.
2. Whatcott CJ, Diep CH, Jiang P, Watanabe A, LoBello J, Sima C, et al. Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(15):3561-8.
3. Bielenberg DR, Zetter BR. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *Cancer J.* 2015; 21(4):267-73.
4. Hoying JB, Utzinger U, Weiss JA. Formation of microvascular networks: role of stromal interactions directing angiogenic growth. *Microcirculation.* 2014; 21(4):278-89.
5. Han W, Chen S, Yuan W, Fan Q, Tian J, Wang X, et al. Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113(40):11208-13.
6. Tang J, Zhang Y, Zhang MB, Li YM, Fei X, Song ZG. Tissue elasticity displayed by elastography and its correlation with the characteristics of collagen type I and type III in prostatic stroma. *Asian J Androl.* 2014; 16(2):305-8.
7. Filipe EC, Chitty JL, Cox TR. Charting the unexplored extracellular matrix in cancer. *Int J Exp Pathol.* 2018; 99(2):58-76.
8. Tzanakakis G, Kavasi RM, Voudouri K, Berdiaki A, Spyridaki I, Tsatsakis A, et al. Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon. *Dev Dyn.* 2018; 247(3):368-81.
9. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2015; 25(11):675-86.
10. Li M, Luan F, Zhao Y, Hao H, Zhou Y, Han W, et al. Epithelial-mesenchymal transition: an emerging target in tissue fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016; 241(1):1-13.
11. Enescu AŞ, Enescu A, Bălăşoiu M, Ciolofan M, Căpitănescu A. Histopathological study of pleomorphic adenoma of salivary glands. *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55(3 Suppl):1149-53.
12. Keerthi R, Raut RP, Vaibhav N, Ghosh A. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: Diagnostic dilemma and treatment protocol. *Indian J Dent.* 2014; 5(3):157-160.
13. De Araújo VC, De Sousa SO, Carvalho YR, De Araújo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000; 8(3):195-202.

14. Hendry SA, Farnsworth RH, Solomon B, Achen MG, Stacker SA, Fox SB. The role of the tumor vasculature in the host immune response: implications for therapeutic strategies targeting the tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2016; 7:621.
15. Sunil S, Gopakumar D. Pleomorphic adenoma. A case report and review of literature. *Int J Odontostomat.* 2013; 7(2):171-4.
16. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(4): 233-45.
17. Elledge R. Current concepts in research related to oncogenes implicated in salivary gland tumorigenesis: a review of the literature. *Oral Dis.* 2009; 15(4):249-54.
18. Voz ML, Aström AK, Kas K, Mark J, Stenman G, Van de Ven WJ. The recurrent translocation t(5;8)(p13;q12) in pleomorphic adenomas results in upregulation of PLAG1 gene expression under control of the LIFR promoter. *Oncogene.* 1998; 16(11):1409-16.
19. Asp J, Persson F, Kost-Alimova M, Stenman G. CHCHD7-PLAG1 and TCEA1-PLAG1 gene fusions resulting from cryptic, intrachromosomal 8q rearrangements in pleomorphic salivary gland adenomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006; 45(9):820-8.
20. Kandasamy J, Smith A, Diaz S, Rose B, O'Brien C. Heterogeneity of PLAG1 gene rearrangements in pleomorphic adenoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007; 177(1):1-5.
21. Forment JV, Kaidi A, Jackson SP. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12(10):663-70.
22. Weinstein AM, Storkus WJ. Therapeutic lymphoid organogenesis in the tumor microenvironment. *Adv Cancer Res.* 2015; 128:197-233.
23. Pont E, Plá Á, Cruz Mojarrieta J, Ferrandis E, Brotons S, Vendrell JB. Salivary duct carcinoma: diagnostic clues, histology and treatment. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2013; 64(2):150-3.
24. Khan MA, Assiri AM, Broering DC. Complement and macrophage crosstalk during process of angiogenesis in tumor progression. *J Biomed Sci.* 2015; 22(1):58.
25. Rao PK, Shetty SR, Hegde D. Ectopic pleomorphic adenoma. *N Am J Med Sci.* 2012; 4(1):190-2.
26. Muz B, De La Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl).* 2015; 3:83-92.
27. Betz C, Lenard A, Belting HG, Affolter M. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development.* 2016; 143:2249-60.
28. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2010; 86(2):236-42.

29. Privratsky JR, Newma PJ. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res.* 2014; 355(3):607-19.
30. Li X, Kramer MC, VAN DER Loos CM, Ploegmakers HJ, De Boer OJ, Koch KT, et al. Early onset of endothelial cell proliferation in coronary thrombi of patients with an acute myocardial infarction: implications for plaque healing. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(3):466-73.
31. Scioli MG, Lo Giudice P, Bielli A, Tarallo V, De Rosa A, De Falco S, et al. Propionyl-L-Carnitine enhances wound healing and counteracts microvascular endothelial cell dysfunction. *PLoS One.* 2015; 10(10):e0140697.
32. Majchrzak K, Kaspera W, Szymaś J, Bobek-Billewicz B, Hebda A, Majchrzak H. Markers of angiogenesis (CD31, CD34, rCBV) and their prognostic value in low-grade gliomas. *Neurol Neurochir Pol.* 2013; 47(4):325-31.
33. Nakayama H, Naruse K, Miyazaki E, Hiroi M, Kiyoku H, Kuroda N, et al. The specific distribution of dendritic interstitial cells at tumor border of major salivary gland pleomorphic adenomas. *Mod Pathol.* 1999; 12(5):445-9.
34. De Souza GFM, Freitas RA, De Miranda JL. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. *Cienc Odontol Bras.* 2007;10(1):12-18.
35. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem.* 2014; 62(10):751-8.
36. Liu L, Liu L, Yao HH, Zhu ZQ, Ning ZL, Huang Q. Stromal myofibroblasts are associated with poor prognosis in solid cancers: a meta-analysis of published studies. *PloS One.* 2016; 11(7):e0159947.
37. Adjei IM, Blanka S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. *J Funct Biomater.* 2015; 6(1):81-103.
38. Talele NP, Fradette J, Davies JE, Kapus A, Hinz B. Expression of α -smooth muscle actin determines the fate of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Reports.* 2015; 4(6):1016-30.
39. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013; 19(11):1423-37.
40. De Oliveira FA, Duarte ECB, Taveira CT, Máximo AA, De Aquino EC, Alencar RC, Vencio EF. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a brazilian population. *Head Neck Pathol.* 2009; 3(4):271-5.
41. Wang XD, Meng LJ, Hou TT, Zheng C, Huang SH. Frequency and distribution pattern of minor salivary gland tumors in a northeastern Chinese population: a retrospective study of 485 patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 73(1):81-91.

42. Nader ME, Bell D, Sturgis EM, Ginsberg LE, Gidley PW. Facial nerve paralysis due to a pleomorphic adenoma with the imaging characteristics of a facial nerve schwannoma. *J Neurol Surg Rep.* 2014; 75(1):e84-8.
43. Soares AB, Juliano PB, Araujo VC, Metze K, Altemani A. Angiogenic switch during tumor progression of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Virchows Arch.* 2007; 451(1):65-71.
44. Shah ASK, Mulla AF, Mayank M. Pathophysiology of myoepithelial cells in salivary glands. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016; 20(3):480-90.
45. Samar ME, Ávila RE, Asis OG, Fonseca I, Corball A. Identificación de colágeno I y III con picrosirius red/ polarización en el estroma de tumores salivales. *Int J Odontostomat.* 2012; 6(1):59-64.
46. Radunovic M, Nikolic N, Milenkovic S, Tomanovic N, Boricic I, Dimitrijevic M, et al. The MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms and susceptibility to salivary gland cancer. *J BUON.* 2016; 21(3):597-602.
47. Mardani M, Andisheh-Tadbir A, Khademi B, Biparva P, Malekzadeh M. Serum level of matrix metalloproteinase-9 in patients with salivary gland tumor. *J Dent (Shiraz).* 2014; 15(4):199-203.
48. Mukaka MM. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012; 24(3):69-71.
49. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014; 7:301-11.
50. Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D. Extracellular Matrix Modulates Angiogenesis in Physiological and Pathological Conditions. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:756078.

ANEXO 1- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS, MACRÓFAGOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS EM ADENOMAS PLEOMÓRFICOS

Pesquisador: Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68248817.4.0000.5544

Instituição Proponente: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.224.520

Apresentação do Projeto:

Tendo em vista as taxas de prevalência do adenoma pleomórfico na cavidade oral, as quais caracterizam esta neoplasia como a mais frequente em glândulas salivares, faz-se necessário ampliar o conhecimento sobre a etiopatogênese desta lesão, bem como descrever a participação das proteínas Hedgehog no parênquima tumoral. Percebe-se a existência de uma vasta literatura que aborda aspectos clínicos e histopatológicos desta neoplasia. No entanto, a caracterização da expressão das proteínas integrantes da via de sinalização Hedgehog neste tipo de lesão ainda permanece desconhecida. O estudo da via de sinalização Hedgehog em secções de adenomas pleomórficos permitirá verificar quais tipos celulares expressam as proteínas integrantes desta via e, desta forma, contribuir para uma melhor compreensão da interação epitélio-mesênquima no desenvolvimento desta neoplasia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar elementos celulares integrantes da matriz conjuntiva e a presença de proteínas da via de sinalização Hedgehog em células tumorais de adenomas pleomórficos orais.

Objetivo Secundário:

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3278-8225

CEP: 40.290-000

E-mail: cep@bahiana.edu.br



ESCOLA BAHIANA DE
MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA -
FBDC



Continuação do Parecer: 2.224.520

- Verificar a presença de macrófagos e células endoteliais no estroma tumoral de adenomas pleomórficos orais;
- Determinar o padrão de marcação imunohistoquímica das proteínas da família Hedgehog em células parenquimatosas através da utilização de anticorpos monoclonais em secções de mucosa oral normal e adenoma pleomórfico, comparativamente;
- Avaliar, através de histomorfometria, o contingente de macrófagos, células endoteliais e células neoplásicas que apresentam um padrão de marcação positivo para as proteínas integrantes da via Hedgehog no adenoma pleomórfico e tecido oral normal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora relata não apresentar riscos em potencial, uma vez que será analisado apenas o material do arquivo do laboratório de Patologia Oral da EBMSp, podendo haver risco de identificação dos pacientes através do número de registro dos blocos parafinizados e das lâminas arquivadas. Para minimizar este risco, um membro da equipe de pesquisa codificará o número de registro de modo a não permitir a identificação do paciente.

O estudo dos macrófagos e células endoteliais, assim como da via de sinalização Hedgehog em secções de adenomas pleomórficos permitirá verificar quais os tipos celulares que expressam as proteínas integrantes desta via e, desta forma, contribuir para uma melhor compreensão da interação epitélio-mesênquima no desenvolvimento desta neoplasia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa irá selecionar 27 casos de adenoma pleomórfico provenientes de biópsias de glândulas salivares dos arquivos do laboratório de Patologia Oral da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSp) que tiveram o diagnóstico anatomo-patológico revisado e confirmado por dois patologistas experientes em lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE) e analisadas morfológicamente por microscopia de luz. Como grupo controle, serão utilizadas 27 secções de tecidos normais provenientes de ressecções de mucosa oral, que serão escolhidos aleatoriamente, a fim de observar o padrão de marcação imunohistoquímica dos anticorpos em epitélio normal da cavidade oral, provenientes de biópsias de glândulas salivares dos arquivos do laboratório de Patologia Oral da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSp). O Procedimento imuno-histoquímico em todos os materiais incluídos em parafina, serão realizados cortes de tecido de quatro micrômetros (μm) de espessura, montados em lâminas de vidro previamente preparadas, já a histomorfometria da captura das imagens dos cortes teciduais submetidos à técnica de imunohistoquímica será realizada através do software Motic Images

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 2.224.520

Advanced 3.0.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: totalmente preenchida e assinada pelo responsável institucional;
- Carta de declaração ao acesso aos arquivos do laboratório de Patologia Oral da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP);
- Cronograma aponta as fases da pesquisa com início da coleta previsto para setembro/17, apresenta envio do relatório final;
- Orçamento: informa que será com financiamento próprio e Estes insumos acham-se disponíveis no Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX/ FIOCRUZ/ UFBA)

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sanada(s) a(s) pendência(s) anteriormente assinalada(s) no Parecer Consubstanciado datado de 20.06.2017 , o projeto

garante o atendimento aos princípios básicos da bioética para pesquisa com seres humanos preconizados pela Res. 466/12 do CNS: autonomia dos participantes, equidade,beneficência e não maleficência.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atenção : o não cumprimento à Res. 466/12 do CNS abaixo transcrita implicará na impossibilidade de avaliação de novos projetos deste pesquisador.

XI DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) e b) (...)

- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

CEP: 40.290-000

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 2.224.520

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_862310.pdf	25/06/2017 16:03:48		Aceito
Cronograma	Cronograma.doc	25/06/2017 16:02:34	Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado	Aceito
Outros	RespostapendenciasdaPesquisa.pdf	25/06/2017 15:51:26	Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoIataformabBrasil.pdf	25/06/2017 15:49:58	Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Declaracaoacessoarquivo.pdf	03/05/2017 13:49:01	Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaodeconfidencialidade.pdf	03/05/2017 13:16:58	Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado	Aceito
Orçamento	Orcamentoprojeto.pdf	03/05/2017 13:15:56	Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	03/05/2017 13:12:55	Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 17 de Agosto de 2017

**Assinado por:
Roseny Ferreira
(Coordenador)**

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

CEP: 40.290-000

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br

ANEXO 2- Notas Técnicas



Aprendendo sobre Saúde | Saúde Mental e Família | Prevenção e Bem Estar | Reabilitação

PODCAST DO ISAÚDE BAHIA NA GLOBO [ouça agora >](#)

Guias especiais do iSaúde Bahia



FITNESS

entenda as diferenças entre os exercícios anaeróbicos e aeróbicos



NUTRIÇÃO

do que cor é o seu prato? uma alimentação colorida garante mais saúde



SAÚDE

crise de ansiedade: como identificar uma crise e qual o tratamento

Publicada em 04/09/2017 às 13h33. Atualizado em 04/09/2017 às 13h40

Você sabe o que é Adenoma pleomórfico?

Saiba mais sobre esse tumor que se desenvolve nas glândulas salivares.

COMPARTILHE



O termo "adenoma" diz respeito a um tumor benigno de tecido glandular, enquanto o "pleomórfico" relaciona-se à variedade de tipos celulares que podem ser encontrados nessa neoplasia. O adenoma pleomórfico é considerado o tumor benigno mais comum das glândulas salivares maiores, a exemplo da parótida, e corresponde a 53% dos casos clínicos confirmados através de estudo anatomopatológico. E pode-se desenvolver também em qualquer glândula salivar menor.

Estudos têm relatado que esse tipo de tumor acomete com mais frequência indivíduos com idade correspondente à 5ª década de vida e pertencentes ao sexo feminino. No que se refere aos dados epidemiológicos, sabe-se que as neoplasias de glândulas salivares compreendem aproximadamente 3% a 10% dos tumores que afetam a região de cabeça e pescoço e que a incidência global desses tumores varia de 0,4 a 13,5 casos por 100.000 indivíduos no ano.



Do ponto de vista clínico, o adenoma pleomórfico apresenta-se como lesão nodular única, consistência endurecida, móvel e indolor à palpação. A transformação maligna é rara e ocorre principalmente após recidivas do tumor ou em casos nos quais ele apresente um longo tempo de evolução. Nessa situação, recebe a denominação de carcinoma ex-adenoma pleomórfico.

No que se refere ao tratamento do adenoma pleomórfico, preconiza-se a excisão cirúrgica da lesão e, para os casos de malignização do tumor, a radio e/ou quimioterapia como tratamento adjuvante. As taxas de recorrência local, regional e a distância dos tumores malignos variam em torno de 40%, 15% e 11%, respectivamente, e estão relacionadas a um pior prognóstico.

Sabendo-se que o diagnóstico dos tumores de glândula salivar representam um verdadeiro desafio, devido à complexa aparência morfológica e comportamento clínico variável dessas neoplasias, recomenda-se visitas periódicas ao cirurgião-dentista para o estabelecimento de um diagnóstico mais acurado não somente do adenoma pleomórfico, mas também de outros tumores de glândulas salivares.

Referências:

- 1- Neville BW, Damm DD, Allen CM. Patologia oral e maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- 2- Nader ME, Bell D, Sturgis EM, Ginsberg LE, Gidley PW. Facial Nerve Paralysis due to a Pleomorphic Adenoma with the Imaging Characteristics of a Facial Nerve Schwannoma. *J Neurol Surg Rep*, 2014; 75(1): e84–e88.
- 3- Junior AT, De Almeida OP, Kowalski LP. Neoplasias de parótida: análise de 600 pacientes atendidos em uma única instituição. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2009; 75(4):497-501.
- 4- Chitturi RT, Veeravarmal V, Nirmal RM, Reddy BVR. Myoepithelial cells (MEC) of the salivary glands in health and tumours. *J ClinDiagn Res*, 2015; 9(3): ZE14-ZE18.
- 5- De Oliveira FA, Duarte ECB, Taveira CT, Máximo AA, De Aquino EC, Alencar RC, Vencio EF. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a brazilian population. *Head Neck Pathol*. 2009; 3(4): 271-5.

Palavras Chave:

Adenoma pleomórfico Tumor Odontologia

COMPARTILHE



Autor(es)

Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado / CROBA 4211

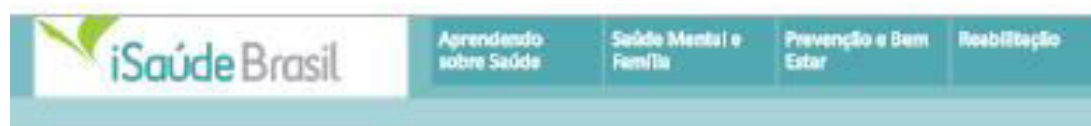
Possui graduação em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia, mestrado e doutorado em Patologia Humana pela Fundação Oswaldo Cruz/ UFPA. Atualmente, é professora adjunta da Universidade Federal da Bahia e da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Na graduação, leciona nos componentes curriculares de interação Microorganismo-hospedeiro, Processos Gerais de Patologia, Biomorfofuncional I e Processo Saúde Doença II. É integrante do corpo permanente do Programa de Pós-graduação da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, orientando mestrandos e desenvolvendo projetos de pesquisas nas áreas de patologia geral e bucal. Ademais, é Tutora do Programa de Educação Tutorial (PET-Odonto-EBMSP) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Flávia Godinho Costa Wanderley / CROBA 14373

Possui Graduação em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Mestranda em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia.

Antônio Márcio Marchionni / CROBA -BA-CD-5122

Cirurgião Dentista pela Universidade Federal da Bahia (1998); Mestre em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial (CTBMF) pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (2001); Doutor em Laser na Odontologia pela Universidade Federal da Bahia (2008); Professor do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública nas Disciplinas de Odontologia Especial e Cirurgia Bucocomaxilofacial III; Professor da pós-graduação do Curso de Especialização em CTBMF pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; Preceptor da Residência em CTBMF pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB); Membro do Colégio Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial. Membro da American Society for Laser Medicine and Surgery (ASLMS). Atua principalmente nos seguintes temas: Cirurgia Bucocomaxilofacial, Implantodontia, Estomatologia e Laser.



Guias especiais do iSaúde Bahia



FITNESS

entenda as diferenças entre os exercícios anaeróbicos e aeróbicos.



NUTRIÇÃO

de que cor é o seu prato? uma alimentação colorida garante mais saúde.



SAÚDE II

crise de ansiedade e agressividade: como identificar e identificar uma criança com transtorno de ansiedade.

Publicado em 12/03/2018 às 15h57. Atualizado em 12/03/2018 às 16h04

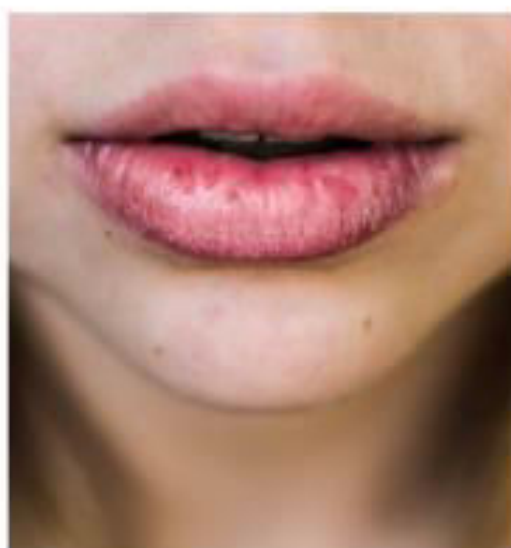
O que você sabe sobre tumores de glândulas salivares?

Saiba quais os tipos mais prevalentes na região da cabeça e pescoço

COMPARTILHE



Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias na região maxilofacial com complexas características morfológicas e comportamento clínico variável. Estes aspectos peculiares podem representar um considerável desafio ao diagnóstico e à conduta clínica a ser adotada pelo cirurgião-dentista.



No que se refere aos dados epidemiológicos das neoplasias de glândulas salivares, estas compreendem, aproximadamente, 3% a 10% dos tumores que afetam a região de cabeça e do pescoço. Dessas, 54% a 79% são benignas e 21% a 46%, malignas.

A glândula parótida é o sítio anatômico mais acometido por essas lesões (63,9%), seguida pelas glândulas salivares menores (26,2%), submandibulares (9,6%) e sublinguais (0,3%). Embora a parótida seja o local mais frequente para o surgimento do tumor de glândula salivar, a incidência de neoplasia maligna nessa glândula é pequena (15% a 32%), se comparada às glândulas sublinguais (70% a 90%), submandibulares (45%) e salivares menores (50%). Quando o tumor afeta as

glândulas salivares menores, desenvolve-se usualmente na região de palato duro, seguida do lábio superior, língua, assoalho de boca e região retromolar.

Entre as neoplasias benignas localizadas na parótida, a mais frequente é o adenoma pleomórfico, que corresponde a cerca de 53% do total de tumores relatados, seguido pelo tumor de Whartin (7,7%), oncocitoma (1,9%) e adenomas de células basais (1,4%). Em geral, esses tumores se estabelecem de maneira silenciosa, de modo que o aumento de volume da região anatômica afetada é, na maioria das vezes, a única manifestação clínica observada. No tocante às neoplasias malignas de glândulas salivares, destacam-se o carcinoma mucoepidermoide (9,6%), seguido do adenocarcinoma de células acinares (8,6%), carcinoma adenoide cístico (3,3%), tumor misto maligno (3,2%) e carcinoma de células escamosas (2,1%). Tais tumores via de regra podem apresentar uma sintomatologia variável, que inclui dor, paralisia facial e ulceração da pele. As taxas de recorrência local, regional e à distância dos tumores malignos variam em torno de 40%, 15% e 11%, respectivamente, e estão relacionadas a um pior prognóstico.

Sabendo-se que o diagnóstico dos tumores de glândula salivar representa um verdadeiro desafio. Devido à complexa aparência morfológica e comportamento clínico variável dessas neoplasias, recomenda-se visitas periódicas ao cirurgião-dentista para o estabelecimento de um diagnóstico mais acurado.

Referências:

- 1- Peravali RK, Bhat HHK, Upadya VH, Agarwal A, Naag S. Salivaryglandtumors: a diagnosticdilemma!. J Maxillofac Oral Surg, 2015; 14(Suppl1): 438-42.
- 2- De Oliveira FA, Duarte ECB, Taveira CT, Máximo AA, De Aquino EC, Alencar RC, Vencio EF. Salivarygland tumor: a reviewof 599 cases in a brazilianpopulation. Head NeckPathol. 2009; 3(4): 271-5.
- 3- Neville BW, Damm DD, Allen CM. Patologia oral e maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- 4- Nader ME, Bell D, Sturgis EM, Ginsberg LE, Gidley PW. Facial NerveParalysisdueto a Pleomorphic Adenoma withtheImagingCharacteristicsof a Facial NerveSchwannoma. J NeurolSurg Rep, 2014; 75(1): e84-e88.
- 5- Liu Y, Li J, Tan YR, Xiong P, Zhong LP. Accuracyofdiagnosisofsalivaryglandtumorswiththe use ofultrasonography, computedtomography, andmagneticresonanceimaging: a meta-analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2015; 119(2):238-45.

Palavras Chave:

tumor saúde oral câncer de boca

COMPARTILHE



Autor(es)

Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado / CROBA 4211

Possui graduação em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia, mestrado e doutorado em Patologia Humana pela Fundação Oswaldo Cruz/ UFBA. Atualmente, é professora adjunta da Universidade Federal da Bahia e da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Na graduação, leciona nos componentes curriculares de Interação Microorganismo-hospedeiro, Processos Gerais de Patologia, Biomorfofuncional I e Processo Saúde Doença II. É integrante do corpo permanente do Programa de Pós-graduação da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, orientando mestrandos e desenvolvendo projetos de pesquisas nas áreas de patologia geral e bucal. Ademais, é Tutora do Programa de Educação Tutorial (PET-Odonto-EBMSP) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.


Flávia Godinho Costa Wanderley / CROBA 14373

Possui Graduação em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Mestranda em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia.

ANEXO 3- Manuscrito 1: Artigo de Revisão de Literatura

J. Oral Diag. 2018; 03:e20180010

REVIEW ARTICLE

Flávia Godinho Costa
 Wanderley Rocha ¹
 Roberto Paulo Corrêa de
 Araújo ²
 Gabriela Botelho Martins ³
 Alana Ribeiro Alves Peixoto
 Medrado ^{4*} 

The role of pleomorphic adenoma stroma on its neoplastic progression: state of art

Abstract:

The tumor development is linked to its stroma. The study of tumor stromal cells enables the understanding of the neoplastic progression. The present narrative literature review aimed to describe tumor stromal cells, such as endothelial and inflammatory cells, that may induce the neoplastic progression of pleomorphic adenomas. The Latin American and Caribbean Center on Health Sciences Information (BIREME) and PubMed electronic databases were searched for scientific articles on this subject published in Portuguese and English from 2007 to 2017. The search focused on information about the clinical, imaging, and anatomopathological characteristics of pleomorphic adenomas and its neoplastic progression. After analysing abstracts and reading the cataloged manuscripts, 44 articles were selected. It was shown that the tumor stroma is important for neoplastic progression by providing elastic properties to the tumor and by enabling its nutrition. Thus, it is relevant to study the cellular and molecular mechanisms that occur in extracellular matrix in order to understand the biological behavior of pleomorphic adenoma.

Keywords: Extracellular Matrix; Neoplasm; Pleomorphic Adenoma

¹ MSc. student, Graduate Program in Organs and Systems Interactive Processes, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil.

² Professor of Biochemistry, Program in Organs and Systems Interactive Processes, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil.

³ PhD in Stomatology, Adjunct Teacher, Program in Organs and Systems Interactive Processes, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil.

⁴ PhD in Human Pathology, Adjunct Teacher, Biointeraction Department, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil.

Correspondence to:
 Alana Ribeiro Alves Peixoto Medrado,
 E-mail: alanamedrado@hotmail.com

Article received on June 5, 2018.
 Article accepted on July 10, 2018.

DOI: 10.5935/2525-5711.20180010



INTRODUCTION

Salivary glands tumors comprise a heterogeneous group of neoplasms in the maxillofacial region with complex morphological characteristics and variable clinical behavior. These peculiarities may hinder the diagnosis and selection of an adequate clinical approach by dental surgeons¹. Thus, a detailed medical history; correlation between clinical, imaging, and morphological findings; and the anatomopathological analysis of the lesion are critical for a reliable diagnosis.

Regarding the epidemiological data, tumors of the salivary glands account for approximately 3% to 10% of head and neck tumors. Of these, 54% to 79% are benign, while 21% to 46% are malignant². The parotid gland is the anatomical site most affected by these lesions (63.9%), followed by the minor salivary (26.2%), submandibular (9.6%), and sublingual (0.3%) glands. Although the parotid is the most frequent site of onset of salivary gland tumors, the incidence of malignant neoplasms in this gland is less (15% to 32%) when compared to the incidence rates of the sublingual (70% to 90%), submandibular (45%), and minor salivary (50%) glands³. When the tumor affects the minor salivary glands, it usually develops in the region of the hard palate, followed by the upper lip, tongue, floor of the mouth, and retromolar space.

Among benign neoplasms located in the parotid, the most frequent is pleomorphic adenoma, which accounts for approximately 53% of all reported tumors, followed by Warthin's tumor (7.7%), oncocytoma (1.9%), and basal cell adenoma (1.4%). In general, these tumors grow silently and the increased volume of the anatomical region affected is, most often, the only observed clinical manifestation. The mucoepidermoid carcinoma (9.6%) stands out among the malignant neoplasms of salivary glands, followed by acinar cell adenocarcinoma (3.6%), cystic adenoid carcinoma (3.3%), mixed malignant tumor (3.2%), and squamous cell carcinoma (2.1%)⁴. Such tumors generally show variable symptoms, including pain, facial paralysis, and skin ulceration^{5,6}. The rates of local, regional, and remote recurrence of malignant tumors are 40%, 15%, and 11%, respectively, and are related to a worse prognosis⁷.

Studies on tumor progression have reported cytogenetic evidence on the transformation of pleomorphic adenomas into ex-pleomorphic adenoma carcinomas. El-Naggar et al.⁸ suggested that some genes could be related to this malignant transformation. In their study, the authors comparatively analyzed the

8q, 12q, and 17p genes in the DNA of 26 neoplasms and 13 pleomorphic adenomas. They proposed that these chromosomes could be involved in the malignant transformation of the pleomorphic adenoma because the onset of adenomas with the potential development of transformation into carcinomas was concomitant to successive changes in the chromosomal arms of 8q and /or 12q. Furthermore, they observed many mutations in the 17p chromosome arm prior to the malignant transformation and progression of pleomorphic adenomas.

The present narrative literature review highlights the clinical and histopathological characteristics of pleomorphic adenoma, the most prevalent salivary gland tumor in the oral cavity. Furthermore, this review analyzes how the extracellular matrix of the tumor stroma may contribute to the development and progression of this neoplasm.

MATERIAL AND METHODS

This was a narrative literature review study. The Latin American and Caribbean Center on Health Sciences Information (BIREME) and PubMed electronic databases were searched for scientific articles on the subject and manual searches were performed for citations in the studies identified in the above databases. The following health sciences descriptors (DeCS) were used to perform these searches: "tumor stroma", "neoplastic progression", "pleomorphic adenoma", and "carcinoma ex-pleomorphic adenoma". The Boolean expressions "E" or "AND" were used for the associations of words, thus allowing for combinations of descriptors. Six combinations were used with the following descriptors: "Tumoral stroma and neoplastic progression", "Tumoral stroma and pleomorphic adenoma", "Tumoral stroma and e carcinoma ex-pleomorphic adenoma", "Neoplastic progression and pleomorphic adenoma", "Neoplastic progression and carcinoma ex-pleomorphic adenoma", and "Pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma".

Two authors individually analyzed the abstracts of the articles to assess which studies were relevant to the subject of this review. Based on the inclusion criteria, full-length articles in Portuguese and English available online and published from 2007 to 2017 that reported the clinical, imaging and anatomopathological characteristics of pleomorphic adenomas and their neoplastic progression were selected. Some relevant articles published before this period were also included.

Studies published outside the established criteria and in databases other than those chosen for the search were excluded.

After analyzing the abstracts and reading the cataloged manuscripts, 40 papers were selected for the present review.

State of Art

1. Epidemiological profile of pleomorphic adenomas

Although pleomorphic adenoma may occur in any of the minor salivary glands, the parotid is the major salivary gland most frequently affected by this tumor. The age group most affected corresponds to the fifth decade of life (25.2%), with a higher prevalence among women (74.5%)^{1,2}. Araya et al.³ when assessing 279 cases of salivary gland tumors found that 151 were located in the parotid and that pleomorphic adenoma was the most frequent benign tumor of this gland (53.8%).

From the clinical standpoint, pleomorphic adenoma is a single nodular lesion with well-defined margins and lobulated surface that is hardened, mobile, and painless on palpation⁴. Malignant transformation primarily occurs after tumor recurrence or in cases of long-term progression. In this situation, the tumor is termed carcinoma ex-pleomorphic adenoma.

Although carcinoma ex-pleomorphic adenoma is a rare malignant tumor of the salivary gland, Mariano et al.⁵ reported 38 cases of this neoplasm among Brazilian patients with a mean age of 57.6 years. No gender differences were reported.

2. Histopathological characterization of the tumor parenchyma and stroma

Pleomorphic adenoma parenchyma is characterized by a wide variety of cell types, not only between different tumors but also in different parts of the same tumor. Thus, epithelial, myoepithelial, and mesenchymal cells can be observed forming ductal and cystic structures as well as nests or islands. The pleomorphic adenoma stroma is eosinophilic and hyalinized, and may have a mucoid, myxoid, chondroid, or even osteoid matrix⁶.

Among the parenchymal cells of the pleomorphic adenoma, the myoepithelial cells are the most relevant in the tumor context because they have a tumor suppressor role⁷. In addition to the salivary glands, myoepithelial cells are present in other exocrine glands such as the mammary, sweat, and lacrimal glands as well as in the mucous and seromucous glands of the digestive tract. In the salivary glands, the myoepithelial cells are located

between the acinar and ductal cells and the basement membrane and are characterized by an eosinophilic, hyaline, and homogeneous cytoplasm, most often with an eccentric nucleus. They may have an epithelioid, polygonal or fusiform pattern¹⁰.

The myoepithelial cells of the salivary gland presumably have a function limited to contractile action, helping in the excretion of the glandular contents. They reportedly also participate in extracellular matrix synthesis, particularly that of the basal membrane, and also play a key role in tumor suppression⁸. This tumor suppressor role was attributed to myoepithelial cells because they accumulate large quantities of extracellular matrix, and thus promote the onset of a mechanical barrier against tumor development. Their potential to secrete high levels of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) is linked to their tumor suppressor role¹.

Tumor dissemination starts with the extracellular matrix degradation by matrix metalloproteinases (MMPs). In addition to these enzymes, neoangiogenesis enables tumor growth. The vascular plexus facilitates oxygen transport to neoplastic cells. Thus, in the absence of vascularization, tumor cells fail to spread, and cell death occurs due to hypoxia^{11,12}.

3. Relevance of the stroma to tumor development

The tumor stroma plays a key role in the development of neoplasms. A large quantity of connective tissue and extracellular matrix (ECM) and numerous mesenchymal cells such as fibroblasts and adipocytes, blood and lymphatic vessels, nerves, and inflammatory and immune cells have also been observed in the tumor stroma¹³. The ECM consists of fibrous proteins and glycoproteins. The fibrous proteins include collagen and elastin, whereas the glycoproteins include fibronectin, proteoglycans, and laminin¹⁴.

The tumor stroma is important for neoplastic progression because its composition may vary; for example, increased collagen biosynthesis may render the tumor elastic¹⁵. Furthermore, the tumor stroma enables neoplasm nutrition through the formation of blood vessels¹⁶. The tumor stroma comprises fibroblasts, which are responsible for producing the collagen present in the extracellular matrix¹⁷. Fibroblasts play a key role in tumors because they are the precursors of myofibroblasts¹⁸, which are cells of mesenchymal origin found in physiological and pathological conditions. For example, under physiological conditions, they can

modulate tissue healing¹⁴, whereas they can promote tumor progression under pathological conditions¹⁵.

In addition to fibroblasts, other cell types may act as precursors for myofibroblasts. For example, smooth muscle cells, pericytes, endothelial cells, adipocytes, and myoepithelial cells can be transdifferentiated into myofibroblasts. Recent studies have also shown that tissue-resident mesenchymal stem cells can also differentiate into myofibroblasts¹⁶.

In the tumor stroma, myofibroblasts may contribute to the deposition of collagen fibers. The increased presence of these fibers renders the stroma desmoplastic¹⁷. Clinically, this reaction of the stroma is characterized by the hardening and retraction of several malignant tumors. This tumor retraction is attributed to the contractile forces generated by myofibroblasts^{18,19}.

The collagen matrix of the tumor stroma primarily contains type I and III collagen. Type III collagen is most often observed in newly-formed stroma, whereas type I collagen is most evident in the fibrous zones of carcinomas and is more related to tumor progression and metastasis²¹. *Picrosirius* is a staining enables the differentiation of collagen fibers, particularly between types I and II^{18,20}.

4. Neovascularization and inflammation of the pleomorphic adenoma stroma

Neovascularization is defined as the formation of new blood vessels from pre-existing vessels. It occurs under both physiological and pathological conditions such as embryogenesis, tissue healing, tumor growth, and metastasis^{22,23}.

The main physiological stimulus of neovascularization is hypoxia. This occurs due to the activation of pro-angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), which binds to receptors on endothelial cells, smooth muscle cells, and pericytes. This ligand-receptor interaction activates the cells and promotes the budding of new capillaries from pre-existing vessels²⁴.

VEGF is one of the main neovascularization-inducing growth factors. Although it may directly stimulate endothelial cells and fibroblasts to form new vessels, the underlying molecular mechanism of its stimulation remains unknown²⁵. Although the function of VEGF in neovascularization is well established in the literature, little is known about its involvement in tumors of the salivary glands, particularly in pleomorphic adenomas.

Swelam et al.²⁷ studied VEGF immunostaining in 20 pleomorphic adenomas and seven normal submandibular glands. In normal salivary glands, VEGF staining was observed in the serous acini and epithelial ducts, whereas staining occurred in the ductal formations and solid areas of pleomorphic adenomas and was stronger in these areas than that in tumor nests. The myxoid areas were also strongly stained by VEGF. Thus, the authors concluded that pleomorphic adenoma is a poorly vascularized tumor because areas with hypoxia were clearly identified in these tumors by VEGF labeling.

The vessels formed in angiogenesis are loosely delimited by solitary cells termed pericytes, a cell group derived from mesenchymal smooth muscle cell lines that play a key role in the tumor context because they may contribute to neoplastic progression²⁶. Pericytes affect the stability of blood vessels by activating or producing molecules that promote the differentiation or quiescence of endothelial cells. Thus, pericytes contribute to neoplastic progression when they induce the differentiation of endothelial cells, allowing the formation of new vessels, which favors the nutritional contribution to neoplastic cells. In addition, studies have also shown that pericytes may be myofibroblast precursors because pericyte are stem cells capable of differentiating into a number of different cell lines^{26,28}.

Although some studies have suggested that pericytes and myofibroblasts may be strategic targets for the treatment of malignant neoplasms^{18,29}, studies that clarify the molecular mechanisms whereby they can affect the biological behavior of malignant tumors are still necessary.

In spite of inflammatory cells, they comprise macrophages or tumor-associated macrophages (TAMs), mast cells, neutrophils, T and B lymphocytes, natural killer (NK) cells, and invariant T lymphocytes (NKT cells). Although each inflammatory cell is important in the tumor context, TAMs are the most prominent cells in the regulation of tumorigenesis³⁰.

TAMs may be activated by the classical or alternative pathways. When activated by the classical pathway, they differentiate into M-1 macrophages, whereas they differentiate into M-2 macrophages when activated by the alternative pathway. M-1 macrophages are usually found in the tumor microenvironment of early lesions and are able to eliminate tumor cells by producing reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively). Furthermore, M-1 macrophages secrete large quantities of interleukin [IL]-12 and

activate CD8+ T lymphocytes, which are responsible for promoting an efficient antitumor response¹¹.

To maintain homeostasis or through the mechanisms of tumor cell evasion, macrophages activated by the alternative pathway of the immune system differentiate into M-2 macrophages. These macrophages, in turn, secrete IL-10, which negatively regulates the immune response to tumors by impairing the activation of cytotoxic cells and by favoring an immunosuppressive environment that promotes tumor progression. In addition, M-2 macrophages also produce growth factors such as VEGF, which contribute to tumor maintenance and facilitate the development of metastases¹¹.

Although some studies have suggested that M-2 macrophages may contribute to tumor survival^{11,16}, studies that may clarify the molecular mechanisms by which they are able to influence the biological behavior of the tumor are still required. Similarly, although the literature has shown the importance of macrophages for tumor development, studies about the participation of these cells in tumors of salivary glands, especially pleomorphic adenomas, are needed to further understand its immunopathogenesis.

3. Profiles of the genes involved in the neoplastic progression of pleomorphic adenomas

Pleomorphic adenoma has well-defined clinical and histological characteristics¹. However, the effect of molecular factors related to its malignant transformation is still not fully elucidated. Thus, cytogenetic studies are necessary to assess the biological behavior of this neoplasm.

Mitelman et al.¹⁷ constructed a database of chromosomal changes in cancer. Analysis of 224 pleomorphic adenomas revealed that 30% of these tumors had a normal karyotype, whereas 70% had some type of chromosomal alteration. The most commonly observed changes were balanced, inverted, and unbalanced chromosomal translocations. The balanced chromosome translocations included the gene regions t(3;8)(p21;q12), t(8;9)(q12;p22), and t(5;8)(p13;q12), whereas the inversions involved the 12p12-p13 and 12q15-q24 gene fragments. The unbalanced changes were characterized by the 8p23 and 8q12 regions.

The genes involved in balanced chromosomal translocations in pleomorphic adenomas are *PLAG1* and *HMGIC*. *PLAG1* is the most important for the tumor context of the pleomorphic adenoma and is frequently

altered in cytogenetic studies of this type of lesion¹⁷. Knowing that changes in *PLAG1* in pleomorphic adenomas result from recurrent, balanced chromosomal translocations, Voz et al.¹⁸ reported that the most frequent chromosomal translocations in the onset of altered *PLAG1* expression involved the t(3;8)(p21;q12) and t(5;8)(p13;q12) regions.

Altered *PLAG1* expression apparently contributes to the onset of pleomorphic adenomas. Asp et al.¹⁹ and Kandasamy et al.²⁰ performed cytogenetic and molecular assays, reporting that the heterogeneity of rearrangements in the *PLAG1* gene contributes to the development of pleomorphic adenomas. The recurrence of these lesions may be caused by the increased number of genetic mutations¹⁸.

Some factors may significantly affect the malignant transformation of tumors¹. Deguchi et al.²¹ assessed the expression of *c-myc*, *ras*, *p21*, and *p53* in pleomorphic adenomas and carcinoma ex-pleomorphic adenomas. Although the expression of these proteins has been observed in pleomorphic adenomas, these oncoproteins were overexpressed in carcinoma ex-pleomorphic adenomas. Their study showed the importance of these oncoproteins for the prognosis of pleomorphic adenomas, particularly regarding malignant transformation. According to Felix et al.²² the activation of the oncogenes *p53* and *c-erbB-2* was implicated in the malignant transformation of pleomorphic adenomas. They observed that *p53* was involved in the neoplastic progression of this tumor, whereas *c-erbB-2* participated in the development of a more aggressive phenotype.

CONCLUSION

The current knowledge regarding the role of pleomorphic adenomas stroma in the neoplastic progression is increasing. However, studies that point out the molecular profile of these tumors are still necessary in order to elucidate their biological behavior.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Everson JW, Cannon EA. Salivary gland tumors. A review of 1410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol.* 1975;146:51-8.
- de Oliveira FA, Duarte EC, Taveira CT, Mázaro AA, de Aquino EC, Alencar Nde C, et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. *Head Neck Pathol.* 2009;7:171-5.

3. Nader ME, Bell D, Szanyi EM, Glanberg LE, Gidley FW. Facial Nerve Paralysis due to a Pleomorphic Adenoma with the Imaging Characteristics of a Facial Nerve Schwannoma. *J Neurol Surg Rep.* 2014;7(5):24-8.
4. Liu Y, Li J, Tian YR, Xiong F, Zhong LP. Accuracy of diagnosis of salivary gland tumors with the use of ultrasonography, computed tomography, and magnetic resonance imaging: a meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;119:138-45.
5. Saldar E, Haack JD, Tekeli KM, Tarver II, Nowlin DC. Elopity of parotid masses: Review of current techniques. *World J Radiol.* 2016;8:501-5.
6. El-Naggar AK, Collier D, Coombes MM, Harr K, Lusa MA, Efstathiou JG. Molecular genetic alterations in carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a putative progression model? *Genet Chromosom Cancers.* 2008;17:141-8.
7. Araya J, Martinez E, Niklander S, Marshall M, Engorp A. Incidence and prevalence of salivary gland tumors in Valparaiso, Chile. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20:531-9.
8. Maricao FV, Noroaka AI, Goadak RO, Altemani AM, de Almeida OT, Kowalski LP. Carcinoma ex pleomorphic adenoma in a Brazilian population: clinic-pathological analysis of 58 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44:685-91.
9. Chittar NT, Veeravarnam V, Nirmal KM, Reddy BV. Myoepithelial cells (MEC) of the salivary glands in health and tumours. *J Clin Diagn Res.* 2015;9:2214-8.
10. Shah AA, Mulla AP, Mayank M. Pathophysiology of myoepithelial cells in salivary glands. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016;20:480-90.
11. Wickelmaier DM, Zetter EE. The Contribution of Angiogenesis to the Progress of Metastasis. *Cancer J.* 2015;11:167-73.
12. Mun E, de la Fuente F, Anab F, Anab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl).* 2015;3:37-41.
13. Weinstein AM, Storkan WJ. Therapeutic Lymphoid Organogenesis in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res.* 2015;119:197-233.
14. Moore JK, Ou C, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:771-85.
15. Han W, Chen S, Yuan W, Fan Q, Tian J, Wang X, et al. Oriented collagen fibers direct tumor cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:11102-7.
16. Hoyt JF, Ditzler U, Weiss JA. Formation of microvascular networks: role of stromal interactions directing angiogenic growth. *Microcirculation.* 2014;11:178-89.
17. Schwartz M. Collagen I and the fibroblast: high protein expression requires a new paradigm of post-transcriptional feedback regulation. *Biochem Biophys Res.* 2015;5:38-44.
18. de-Arsh MM, Pincetti LG, Costa-e-Silva E, Sousa PE, Norta MC. Stromal myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012;17:737-8.
19. Whitcomb CJ, Drey CH, Jiang F, Watanabe A, LaFelle J, Sims C, et al. Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;11:541-8.
20. Miles PL, Miller KA. Instidious changes in stromal matrix fuel cancer progression. *Mol Cancer Res.* 2014;11:107-111.
21. Tsang J, Zhang Y, Zhang MF, Li YM, Pei X, Song ZG. Tissue elasticity displayed by elastography and its correlation with the characteristics of collagen type I and type III in prostatic stroma. *Asian J Androl.* 2014;16:785-8.
22. Liu L, Liu L, Yao HH, Zhu ZQ, Wang ZL, Huang Q. Stromal myofibroblasts are associated with poor prognosis in solid cancer: a meta-analysis of published studies. *PLoS One.* 2016;11:e0159947.
23. Adjei AA, Blaska I. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. *J Funct Biomater.* 2015;6:81-107.
24. Li M, Lusa F, Zhao Y, Hao H, Zhou Y, Han W, et al. Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in cancer fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;141:1-7.
25. Tom C, Leonard A, Felting NG, Affolter M. Cell behavior and dynamics during angiogenesis. *Development.* 2016;143:1149-60.
26. Roy S, Senanayak GI. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodeling. *Cardiovasc Res.* 2010;86:136-41.
27. Swidan W, Ida-Yoshinochi H, Maruyama I, Ohshiro K, Cheng J, Saku T. Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenoma: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. *Virchows Arch.* 2005;446:653-61.
28. Hosaka K, Yang Y, Seki T, Fischer C, Drabey O, Froehner E, et al. Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:25418-27.
29. Stapor PC, Sweet RL, Daskal DC, Eftanacour AM, Marfor WL. Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. *J Vasc Res.* 2014;51:167-74.
30. Khan MA, Ansh AM, Brooking DC. Complement and macrophage crosstalk during process of angiogenesis in tumor progression. *J Biomed Sci.* 2015;11:58.
31. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol.* 2017;10:58.
32. Tharso M, Ledone W, Tschirner A, Hummel B, Hoesmann T, Kubojek C, et al. Quantitative changes in tumor-associated M2 macrophages characterize cholangiocarcinoma and their association with metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:5045-50.
33. Mitchell F, Johnston E, Merritt F. The impact of translocations and gene fusion on cancer causation. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:132-45.
34. Ellidge E. Current concepts in research related to oncogenes implicated in salivary gland tumorigenesis: a review of the literature. *Oral Dis.* 2009;15:140-54.
35. Von ME, Ansh AK, Kai K, Mark J, Stearns G, Van de Ven WJ. The recurrent translocation t(5;9)(p13;q11) in pleomorphic adenomas results in upregulation of PLAG1 gene expression under control of the LTR promoter. *Oncogene.* 1992;16:1405-16.
36. Asp J, Petroni F, Kost-Alimova M, Stearns G. CHCHD7-PLAG1 and TCEAL1-PLAG1 gene fusions resulting from cryptic intrachromosomal 5q rearrangements in pleomorphic salivary gland adenomas. *Genet Chromosom Cancers.* 2004;45:810-8.
37. Kandaswamy J, Smith A, Diaz E, Nore E, O'Brien C. Heterogeneity of PLAG1 gene rearrangements in pleomorphic adenomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;177:1-5.
38. Forman JV, Kaldi A, Jackson SP. Chromothripsis and cancer: cause and consequences of chromosome shattering. *Nat Rev Cancer.* 2012;11:667-78.
39. Deguchi H, Harasuo H, Hayashi Y. c-myc, ras p21 and p53 expression in pleomorphic adenoma and its malignant form of the human salivary glands. *Acta Pathol Jpn.* 1997;47:415-21.
40. Felix A, Ross-Sattouh J, Meindinger ME, Tomshak F, Sauer J. Intra-ocular carcinoma ex pleomorphic adenoma. Report of a case with unusual metastatic behaviour. *Oral Oncol.* 2002;8:107-10.

ANEXO 4- Manuscrito 2: Artigo Original**Caracterização da densidade vascular e matriz colagênica em adenomas pleomórficos orais**

Characterization of vascular density and collagenic matrix in oral pleomorphic adenomas

Flávia Godinho Costa Wanderley Rocha¹, Silvia Regina de Almeida Reis², Roberto Paulo Correia de Araújo³, Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado⁴, Gabriela Botelho Martins⁴

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, UFBA. ²Professora Adjunto da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. ³Professor titular do Instituto de Ciências da Saúde, ICS/UFBA e do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, UFBA. ⁴Professora Adjunto da Universidade Federal da Bahia, ICS/UFBA.

RESUMO

No contexto tumoral, a densidade vascular e a organização da matriz colagênica representam fatores críticos para o desenvolvimento e a progressão da neoplasia. **Objetivo:** Este estudo objetivou analisar essas variáveis da matriz extracelular em adenomas pleomórficos orais. **Metodologia:** Trata-se de um estudo de corte transversal que avaliou comparativamente 21 casos de adenoma pleomórfico e 21 secções de mucosa oral normal, obtidos em arquivos de um Serviço de Patologia Bucal. As secções teciduais foram submetidas ao estudo imuno-histoquímico com anticorpo monoclonal específico para a proteína CD31 e para o estudo da densidade vascular, sendo e coradas com Sírius vermelho para avaliação do colágeno. Células individuais com padrão de marcação positiva foram contadas em campos específicos, por meio de estudo morfométrico, com posterior análise estatística. **Resultados:** Observou-se que o número de células CD31+ foi maior nas lesões tumorais, quando comparadas àquelas de mucosa oral normal ($p=0,004$), as quais se situavam sempre ao redor de vasos sanguíneos. Nas lesões tumorais, a correlação da área do colágeno com a densidade vascular foi discreta entre essas duas variáveis ($p=0,843$). **Conclusão:** Os dados apresentados sugerem que a crescente expressão de células CD31+ associadas aos capilares sanguíneos pode estar relacionada à neoangiogênese no contexto tumoral. Além disso, o aumento da concentração de fibras colágenas proporcional à quantidade de vasos, que, nessas lesões, o processo de remodelamento ocorre ativamente.

Palavras-chave: Adenoma pleomórfico. Colágeno. Vasos sanguíneos.

Abstract

Tumor vascular density and collagen matrix organization are critical factors to neoplasia development and progression. Objective: This study aimed to analyze the variables associated with the extracellular matrix in oral pleomorphic adenomas. Methodology: This cross-sectional study comparatively evaluated 21 cases of pleomorphic adenomas and 21 sections of regular oral mucosa from the files of an oral pathology department. The tissue sections were subjected to immunohistochemical study with a monoclonal antibody specific to CD31 protein to assess vascular density and were also stained with Sirius red to evaluate the levels of collagen. The numbers of positively-stained cells were enumerated in specific fields through morphometric study, with subsequent statistical analysis. Results: Higher numbers of CD31-positive cells were observed in tumor cells than in cells in the regular oral mucosa ($p = 0.004$), which were always located around blood vessels. In tumor lesions, the correlation of the collagen area with vascular density was weak between these two variables ($p=0.843$). Conclusion: The results suggested that the increased expression of CD31+ in cells associated with capillaries may be related to tumor neoangiogenesis. Furthermore, an increase in the concentration of collagen fibers proportional to the number of blood vessels in the neoplastic sections suggested the active role of these lesions in the remodeling process.

Keywords: Pleomorphic adenoma. Collagen. Blood vessels.

Correspondência:

Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n, Canela, Salvador, Bahia, Brasil. CEP 40110-100.
Telefone/Fax: 55 71 32838899
E-mail: alenedrado@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O estroma tumoral é um constituinte importante para o desenvolvimento das neoplasias (SATPATHY; SPADIGAM; SYED, 2014). A matriz extracelular (MEC) tumoral, pode influenciar na progressão do tumor, por lhe conferir propriedades específicas (PONT et al., 2013; WEINSTEIN; STORKUS, 2015) e também por exercer papel na nutrição, por meio da formação de vasos sanguíneos (HOYING; UTZINGER; WEISS, 2014).

A proteína mais abundante que integra estruturalmente a MEC é o colágeno (HAN et al., 2016). Durante o crescimento neoplásico, pode ocorrer um aumento na deposição de colágeno, principalmente dos tipos I e III, o que caracteriza a reação desmoplástica do estroma. Esse fenômeno, juntamente com a resposta imune e a neoangiogênese, constituem as principais respostas do hospedeiro em relação à presença de células neoplásicas (DE OLIVEIRA et al., 2009; TANG et al., 2014).

Recentes estudos têm procurado enfatizar a caracterização da MEC que compõe o estroma tumoral em diversos tipos de neoplasia (FILIPE; CHITTY; COX, 2018; TZANAKAKIS et al., 2018). De fato, percebe-se que, ao longo dos anos, muita ênfase foi direcionada ao estudo das células neoplásicas em detrimento dos constituintes do estroma tumoral. Essa abordagem mais atual, voltada para o estudo da MEC e de seus constituintes, tem sido útil para determinar o comportamento biológico das neoplasias. Nesse contexto, percebe-se essa mesma premissa em relação ao tumor benigno de glândulas salivares mais prevalente da cavidade oral, o adenoma pleomórfico, pois se verifica que seu comportamento biológico não tem sido muito explorado na literatura, em especial no tocante às características do estroma tumoral (WANG et al., 2015).

Do ponto de vista clínico, o adenoma pleomórfico apresenta-se como lesão nodular única, com margens bem delimitadas, superfície lobulada, consistência endurecida, móvel e indolor à palpação. Histologicamente, observam grande variedade de tipos celulares, não apenas entre diferentes tumores mas, também, em diferentes partes de um mesmo tumor. Sendo assim, é possível observar a presença de estruturas ductais e císticas, além de ninhos ou ilhas de células, nas dependências do tecido epitelial, ao passo que ele apresenta um estroma eosinófilo e hialinizado, com células epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais envoltas por tecido mucoide, mixoide, condroide ou mesmo osteoide. Normalmente, essa lesão se apresenta encapsulada (SATPATHY; SPADIGAM; SYED, 2014).

A transformação maligna do adenoma pleomórfico ocorre principalmente após recidivas do tumor, ou em casos nos quais ele apresente um longo tempo de evolução. Nessa situação, recebe a denominação de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (BETZ et al., 2016; HOYING; UTZINGER; WEISS, 2014; NADER et al., 2014). Embora o carcinoma ex-adenoma pleomórfico seja um tumor maligno raro, representa 2 a 4% de todas as neoplasias de glândulas salivares (KEERTHI et al., 2014). Entretanto, ainda não está totalmente esclarecida na literatura a influência dos fatores moleculares relacionados à sua malignização.

Alguns marcadores imuno-histoquímicos têm sido utilizados para identificar alterações no estroma de neoplasias de glândulas salivares, a exemplo daqueles que evidenciariam um aumento da densidade vascular, tal como o CD 31, o qual pode sugerir sobre o processo de neoangiogênese, uma vez que eles são expressos por células endoteliais, que integram os vasos sanguíneos presentes no estroma neoplásico (BETZ et al., 2016; HOYING; UTZINGER; WEISS, 2014; NADER et al., 2014). Sabe-se que a densidade vascular constitui uma variável relevante para o desenvolvimento do tumor, pois, além de atender às demandas metabólicas das células neoplásicas, pode contribuir para o incremento do processo inflamatório que ocorre como resposta do organismo ao ambiente neoplásico (BIELENBERG; ZETTER, 2015; MUZ et al., 2015).

Adicionalmente, alguns autores demonstraram que a formação de novos vasos no contexto tumoral e o conseqüente aumento da densidade vascular podem estar relacionados com o aumento da biossíntese de colágeno e outros constituintes da matriz extracelular por parte dos fibroblastos (HAN et al., 2016; HOYING; UTZINGER; WEISS, 2014).

O presente estudo objetivou avaliar comparativamente, através da técnica de imuno-histoquímica, a densidade vascular e sua relação com o colágeno em MEC de adenomas pleomórficos e na mucosa oral normal.

METODOLOGIA

ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi submetida à avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (CEP-Bahiana/EBMSP) e aprovada com o parecer nº 2.224.520. (ANEXO 1).

DESENHO DO ESTUDO

O estudo tem um caráter retrospectivo, de corte transversal e caráter observacional. Contemplou 21 casos de adenomas pleomórficos orais diagnosticados de janeiro de 2008 a dezembro de 2017 e selecionados dos arquivos do laboratório de Patologia Oral da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). Dados sobre sexo, idade e localização da lesão foram coletados em indivíduos com adenoma pleomórfico oral. O diagnóstico anatomopatológico das secções teciduais coradas por hematoxilina-eosina (HE) foi revisado e confirmado por dois patologistas experientes.

Para integrar o grupo de controle, 21 secções de mucosa oral normal, obtidas a partir de biópsias de mucocela, foram selecionadas randomicamente dos mesmos arquivos.

Foram considerados como critérios de inclusão: tecidos incluídos em parafina não ressecada e que apresentassem amostras representativas, além de fichas de biópsia que incluíssem detalhes completos referentes às lesões. Em relação à amostra de mucocelas, considerou-se a presença de tecido normal preservado como condição para inclusão no estudo.

PROCEDIMENTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Em todos os materiais incluídos em parafina, foram realizados cortes de tecido de quatro micrômetros (μm) de espessura, e, a seguir, foram montados em lâminas de vidro previamente preparadas com 3-Aminopropyl triethoxysilane (Sigma Aldrich, St. Louis - USA). Algumas secções foram submetidas à coloração de Hematoxilina-eosina e Sírius vermelho, ao passo que outras foram reservadas para o estudo imuno-histoquímico.

O método de imunomarcção utilizado foi o da streptavidina-biotina peroxidase, e o anticorpo monoclonal primário utilizado foi o anti-CD31 (1:80; Dako Corporation, Denmark). Os cortes histológicos dos grupos de estudo foram submetidos à desparafinização em banhos sequenciais de xilol, acetona, álcool (absoluto, 95%, 70%, 50%, 30%) e água destilada, em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato, pH 6.0, com posterior bloqueio das ligações inespecíficas (leite desnatado a 10%) e então incubados “*overnight*” a 4° C, com o anticorpo primário. O anticorpo secundário utilizado seguiu as orientações do Kit 1. SAB-Peroxidase (DAKO Corporation, USA), e a revelação foi realizada por meio do DAB com peróxido de hidrogênio a 30%. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina e montadas com lamínula e bálsamo do Canadá para avaliação morfológica e análise quantitativa.

Foram utilizados, como controle positivo, cortes de hemangioma removidos por indicação cirúrgica prévia e, como controle negativo, os mesmos tecidos, com omissão dos respectivos anticorpos primários. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo-Moniz, Salvador/Ba.

HISTOMORFOMETRIA

A captura das imagens dos cortes teciduais submetidos à técnica de imuno-histoquímica para CD31 e coradas por Sirius foi realizada com o software Motic Images Advanced 3.0[®] (Motic China Group CO. LTD) no Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Foi estabelecida uma área padrão de 3467902,976 μm^2 . Dez imagens padrão, próximas à junção de parênquima e estroma, correspondentes a cada caso foram capturadas com a dimensão estabelecida e, nelas, foi quantificado o número de células positivas resultantes da imunomarcção. Em seguida, esses dados foram comparados em relação à área total selecionada. A mensuração da área representativa do quantitativo de colágeno, na coloração por Sirius vermelho, foi realizada de modo semelhante, considerando o percentual de coloração em relação à área total. Todas as análises foram feitas por um mesmo examinador calibrado previamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi criado no *Microsoft® Excel®* 2010 (versão 14.0.7132.5000), *Microsoft® Office Professional Plus* 2010, USA e analisado no *software R* (versão 3.1.1). Procedeu-se à análise descritiva (frequência absoluta e relativa, média, mediana, desvio padrão e quartis). Para verificar a existência de diferenças significativas nas medidas referentes às células positivas para os anticorpos, de acordo com os grupos de estudo, foram utilizados diferentes testes estatísticos. A distribuição dos dados quanto à normalidade foi testada com o teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste ANOVA, seguido do teste post hoc de Bonferroni. O nível de significância estabelecido para este trabalho foi de $p < 0,05$. Para correlacionar a área do colágeno com a densidade vascular, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson.

RESULTADOS

Do total de 21 casos de adenoma pleomórfico, verificou-se que 11 (52,4%) corresponderam a indivíduos do sexo masculino e 10 (47,6%) a pessoas do sexo feminino. Em relação à faixa etária dos casos catalogados, houve variação entre a primeira e a sexta década de vida, com idade média de 39 anos. O maior número de casos das neoplasias concentrou-se entre a terceira e a quinta décadas de vida (57,1%). Do total de lesões apresentadas, 38,1% localizaram-se no palato, 14,3% na mucosa jugal, 14,3% no lábio superior, 9,5% na glândula sublingual e 4,8% na parótida. A ocorrência em regiões mais raras, como a região do seio zigomático, fundo do sulco em lábio superior direito, vestibulo lingual da região de mandíbula e lesão intra-óssea em área de 2º pré-molar, assim como outras áreas não especificadas compuseram 19% da amostra (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados clínicos obtidos a partir dos laudos de biópsia de pacientes com adenoma pleomórfico na amostra estudada (EBMSP, 2018).

Variável	n=21	%
Sexo		
Masculino	11	52,4
Feminino	10	47,6
Idade (anos)		
Até 30	5	23,8
31 a 50	12	57,1
≥ 51	3	14,3
Não referido	1	4,8
Localização da lesão		
Palato	8	38,1
Regiões incomuns e não especificadas	4	19
Lábio superior	3	14,3
Mucosa jugal	3	14,3
Sublingual	2	9,5
Parótida	1	4,8

Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 2 demonstra a distribuição da densidade vascular por meio da expressão do anticorpo anti-CD31. Ela foi significativamente superior nos Adenomas Pleomórficos, quando comparados ao grupo de controle ($p=0,004$). Nas lesões tumorais e nas secções do controle, observou-se presença de células CD31+ com padrão de marcação citoplasmático, que contornavam o lúmen dos capilares sanguíneos e pequenas arteríolas (Figura 1). Em relação à área correspondente ao colágeno, observou-se que ela foi maior nas secções de mucosa oral normal do que no estroma tumoral ($p=0,041$) (Figura 2, Tabela 2).

Figura 1 – Expressão do anticorpo anti-CD31 em células situadas no endotélio, presentes em secções de Adenoma Pleomórfico (A) e Mucosa Oral Normal (B). Expressão muno-histoquímica, anti-CD31. 400X (ICS, 2018).

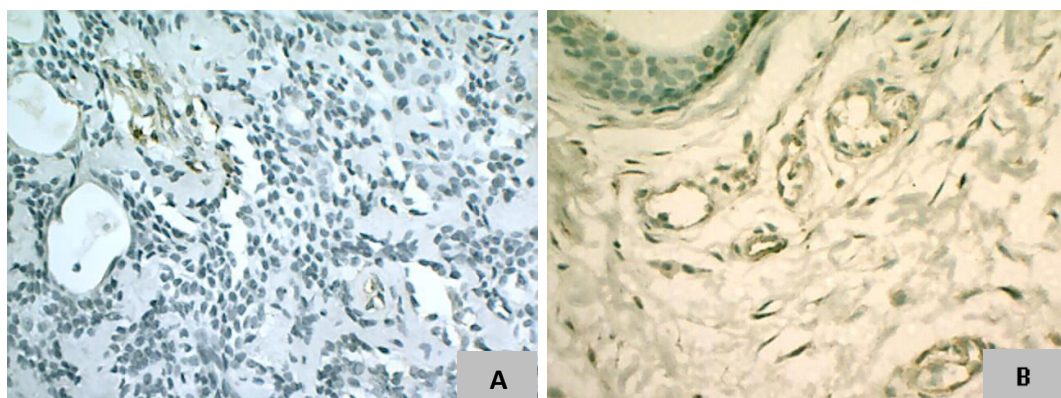
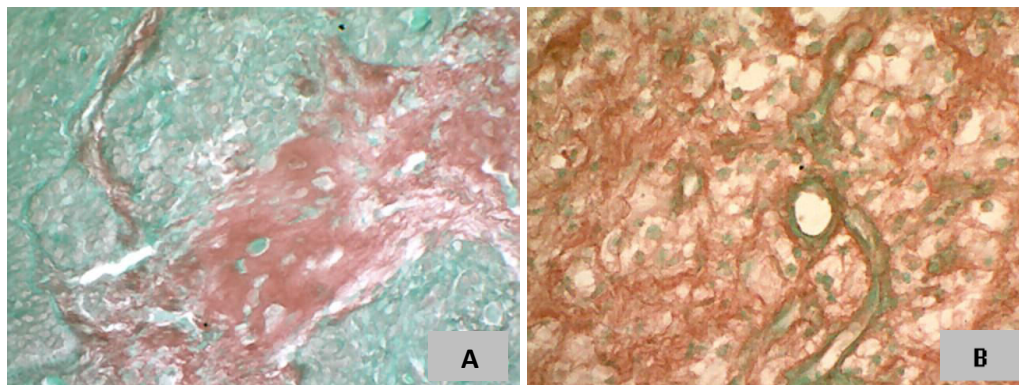


Figura 2 – Expressão de colágeno presente em secções de Adenoma Pleomórfico (A) e Mucosa Oral Normal (B). Expressão histoquímica com Sirius vermelho. 400X (ICS, 2018).



Fonte: Autoria própria

Tabela 2 – Quantitativo de vasos com células CD31+ e área correspondente ao colágeno em mucosa oral normal (controle) e adenoma pleomórfico (ICS, 2018).

Grupos de estudo	ÁREA DE COLÁGENO		NÚMERO DE CÉLULAS CD31+	
	Mediana	Quartis (Q1-Q3)	Mediana	Quartis (Q1-Q3)
Controle	1427,01	1023,25-1972,70	265,82	96,68-612,98
Adenoma pleomórfico	893,24	242,58-1922,05	641,93	496,92-816,79
p valor	0,041		0,004	

Fonte: Dados da pesquisa

A Tabela 3 ilustra a correlação entre a densidade vascular e a área do colágeno. Para o tumor, a correlação foi de $r=0,046$, embora não tenha sido estatisticamente significativa. Nas secções de mucosa oral normal, não houve correlação entre as variáveis $r=-0,081$.

Tabela 3 – Correlação entre a densidade vascular e a área de colágeno em mucosa oral normal (controle) e adenoma pleomórfico (ICS, 2018).

Variáveis	Área de colágeno		
	Coefficiente de correlação de Pearson	p-valor	
Número de vasos	Adenoma pleomórfico	0,046	0,843
	Controle	-0,081	0,726

Fonte: Dados da pesquisa

DISCUSSÃO

Embora o foco do presente estudo tenha sido caracterizar a MEC de adenomas pleomórficos orais, alguns aspectos de suas características clínicas também foram delineados. Esse tipo de neoplasia é o mais frequentemente observado na cavidade oral e compreende aproximadamente 1,5 a 5% dos tumores que afetam a região de cabeça e pescoço. A localização do adenoma pleomórfico é variável e pode acometer as glândulas parótidas, submandibulares, sublinguais e glândulas salivares menores (DE OLIVEIRA et al., 2009). Entre as neoplasias benignas localizadas na parótida, a mais frequente é o adenoma pleomórfico, que corresponde a cerca de 53% do total de tumores (DE OLIVEIRA et al., 2009). Neste trabalho, foram analisados 21 casos de adenomas pleomórficos com localização prevalente no palato (38,1%). Tais dados, ratificam aqueles descritos por Wang et al., que 2015, analisaram 485 casos de tumores em glândulas salivares menores e observaram que o sítio mais frequente do adenoma pleomórfico foi o palato (64,74%), seguido por mucosa bucal (7,63%) e língua (5,98%).

A literatura registra que a faixa etária mais acometida por adenoma pleomórfico corresponde à 5ª década de vida, com prevalência no sexo feminino (NADER et al., 2014). De fato, a ocorrência dessa faixa etária foi constatada na presente pesquisa, pois se observou que o maior número de casos se concentrou entre a terceira e a quinta décadas de

vida. Contudo, em relação à variável gênero, os autores constataram uma distribuição similar entre homens (52,4%) e mulheres 47,6%.

Sabe-se que o estroma tumoral é de grande importância para a progressão neoplásica. Ele pode apresentar variação em sua composição, como, por exemplo, aumento da biossíntese de colágeno, o que poderá conferir resistência ao tumor (HAN et al., 2016) e permitir a nutrição da neoplasia através da formação de vasos sanguíneos (BETZ et al., 2016; HOYING; UTZINGER; WEISS, 2014; MUZ et al., 2015).

A neoangiogênese tem sido objeto de crescente investigação no contexto tumoral. Independentemente do tipo de tumor, se benigno ou maligno, a presença de vasos recém-formados, que acabam por aumentar a densidade vascular no estroma, pode representar uma condição essencial para a expansão da neoplasia (BIELENBERG; ZETTER, 2015). Diante do exposto, foi a intenção dos autores desta pesquisa caracterizar a densidade vascular por meio das células CD31+. Embora o aumento do número de vasos no microambiente de qualquer tumor, seja um evento previsível, essa análise foi importante na descrição e caracterização da MEC desse tumor, permitindo uma ampliação do conhecimento de sua biologia.

Foi observado, um padrão de marcação para as células CD31+ maior nas secções teciduais oriundas da região tumoral, quando comparadas àquelas de mucosa oral normal ($p=0,004$). Tal fato parece indicar que, na matriz extracelular dos adenomas pleomórficos, o processo de neoangiogênese encontra-se ativo. Esse evento biológico é relevante para o crescimento da maioria dos tumores benignos e malignos, visto que fornece nutrientes e oxigênio para o metabolismo celular (MUZ et al., 2015). Além disso, a formação de novos vasos facilita a entrada de células tumorais na circulação, fato que viabiliza o desenvolvimento de metástase nas lesões neoplásicas benignas que evoluem para o fenótipo maligno (MUZ et al., 2015). Embora o adenoma pleomórfico seja a neoplasia benigna mais comum de glândula salivar (DE OLIVEIRA et al., 2009), a correlação entre a densidade vascular e o colágeno, no estroma dessa neoplasia, é pouco evidenciada na literatura.

Em um estudo realizado por Soares et al., em 2007, os autores compararam a microdensidade vascular de 10 casos de adenomas pleomórficos sem transformação maligna com 16 casos do carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Os carcinomas ex-adenomas pleomórficos apresentaram-se com e sem diferenciação mioepitelial. Os autores observaram que, no grupo do adenoma pleomórfico, os vasos sanguíneos eram raros e

geralmente pequenos. Entretanto, nos casos intracapsulares ou minimamente invasivos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, a quantidade de vasos foi significativamente mais numerosa, o que possibilitou aos autores afirmarem a existência de uma associação entre a neoangiogênese e a progressão da lesão em carcinomas ex-adenomas pleomórficos. Além disso, os autores observaram que, nos tumores com diferenciação mioepitelial, as células neoplásicas geralmente formavam grandes agregados celulares hipovascularizados. Tais resultados corroboraram a hipótese de que o microambiente tumoral das células mioepiteliais poderia estar relacionado com a baixa atividade angiogênica observada nos carcinomas ex-adenomas pleomórficos com diferenciação mioepitelial (SHAH; MULLA; MAYANK, 2016). No presente estudo, a comparação foi realizada entre estroma tumoral e tecido normal, evidenciando um maior número de vasos no tecido neoplásico. Embora esse resultado seja sugestivo de crescimento e progressão tumoral, o adenoma pleomórfico se caracteriza clinicamente como um tumor benigno, com baixa taxa de crescimento e invasão de tecidos adjacentes. Possivelmente, caso a comparação fosse realizada com as lesões malignas de carcinomas ex-adenoma pleomórficos, o número de vasos na lesão benigna seria menor do que na maligna, o que estaria relacionado ao comportamento biológico dessas lesões malignas.

Quanto à matriz colagênica do estroma tumoral, ela é representada principalmente pelos colágenos do tipo I e III. O colágeno do tipo III é mais observado quando o estroma está recém-formado, enquanto o colágeno do tipo I é mais evidente nas zonas fibrosas dos carcinomas e estão mais relacionados com a progressão e a metástase do tumor maligno (TANG et al., 2014).

Métodos de coloração histoquímica, como a coloração com Sirius vermelho, por exemplo, permitem a diferenciação das fibras colágenas no estroma, principalmente as do tipo I e III (LIU et al., 2016). Samar et al. (2012), ao realizarem um estudo em glândulas salivares de humanos, observaram o predomínio do colágeno tipo I em tumores malignos e do colágeno tipo III em tumores benignos. Nessa pesquisa não foi realizado um estudo histoquímico que nos permitisse distinguir os colágenos I e III. A área de colágeno total, identificada pela coloração histoquímica com Sírius vermelho, foi maior nas secções de mucosa oral normal do que no estroma tumoral ($p=0,041$). Estudos recentes têm demonstrado que a presença de metaloproteinases da matriz (MMPs) em tumores de glândulas salivares pode ser determinante para a degradação do colágeno da matriz extracelular e, conseqüentemente, aumentar a probabilidade de progressão tumoral

(MARDANI et al., 2014; RADUNOVIC et al., 2016). No presente trabalho, é provável que a menor área de colágeno nos adenomas possa estar relacionada com a atividade das MMPs presentes no estroma dessa neoplasia.

Embora as metaloproteinases não tenham sido objeto de investigação nesta análise, a crescente expressão das enzimas de degradação das MMPs nas lesões neoplásicas destaca a relevância desse processo biológico no contexto tumoral, visto que elas podem contribuir fortemente para a progressão neoplásica dos tumores.

Neste estudo, foi correlacionada a área do colágeno com a densidade vascular por meio do coeficiente de correlação de Pearson (MUKAKA, 2012). O aumento proporcional de fibras colágenas à quantidade de vasos sugere que, nessas lesões, está ocorrendo uma tentativa de remodelamento desses tecidos. À medida que se processa a biossíntese do colágeno, a neoangiogênese se faz presente mediante o aporte adequado de nutrientes e de oxigênio para a sobrevivência das células neoplásicas e estromais (DARBY et al., 2014).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, observou-se um aumento na densidade vascular dos tecidos neoplásicos em relação ao tecido normal. De maneira inversa, a expressão de colágeno mostrou-se aumentada nos tecidos normais, em detrimento do estroma tumoral. Embora a correlação entre essas variáveis tenha acontecido de forma discreta e não estatisticamente significativa, o aumento proporcional de fibras colágenas à quantidade de vasos, nas secções neoplásicas, permite concluir que, nessas lesões, está ocorrendo um remodelamento tecidual como forma de recuperar suas estruturas normais.

REFERÊNCIAS

- BETZ, C. et al. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. **Development**, Cambridge, v. 143, p. 2249-2260, 2016.
- BIELENBERG, D. R.; ZETTER, B. R. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. **Cancer J.**, Villejuif, v. 21, n. 4, p. 267-273, Jul-Aug. 2015.
- DARBY, I. A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.**, Nova Zelândia, v. 7, p. 301-311, 2014.
- FILIPE, E. C.; CHITTY, J. L.; COX, T.R. Charting the unexplored extracellular matrix in cancer. **Int. j. exp. pathol.**, Oxford, v. 99, n. 2, p. 58-76, Apr. 2018.
- HAN, W. et al. Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 113, n. 40, p. 11208-11213, Oct. 2016.
- HOYING, J. B.; UTZINGER, U.; WEISS, J. A. Formation of microvascular networks: role of stromal interactions directing angiogenic growth. **Microcirculation**, New York, v. 21, n. 4, p. 278-289, May. 2014.
- KEERTHI, R. et al. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: Diagnostic dilemma and treatment protocol. **Indian J. Dent.**, Bethesda, v. 5, n. 3, p. 157-160, 2014.
- LIU, L. et al. Stromal myofibroblasts are associated with poor prognosis in solid cancers: a meta-analysis of published studies. **PloS One**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0159947, 2016.
- MARDANI, M. et al. Serum level of matrix metalloproteinase-9 in patients with salivary gland tumor. **J Dent (Shiraz)**, Iran, v. 15, n. 4, p. 199-203, Dec. 2014.
- MUKAKA, M. M. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Med J.**, [s.l], v. 24, n. 3, p. 69-71, Sept. 2012.
- MUZ, B. et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. **Hypoxia (Auckl)**, [s.l], v. 3, p. 83-92, Dec. 2015.
- NADER, MARC-ELIE et al. Facial nerve paralysis due to a pleomorphic adenoma with the imaging characteristics of a facial nerve schwannoma. **J. Neurol. Surg. Rep.**, Alemanha, v. 75, n. 1, p. e84-88, Aug. 2014.
- DE OLIVEIRA, F. A. et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a brazilian population. **Head Neck Pathol.**, Secaucus, v. 3, n. 4, p. 271-275, Dec. 2009.
- PONT, E. et al. Salivary duct carcinoma: diagnostic clues, histology and treatment. **Acta Otorrinolaringol.**, Caracas, v. 64, n. 2, p. 150-153, March-Apr. 2013.

RADUNOVIC, M. et al. The MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms and susceptibility to salivary gland cancer. **J. BUON**, Bethesda, v. 21, n. 3, p. 597-602, May/June 2016.

SAMAR, M. E. et al. Identification of type I and III collagen by picosirius red/polarization of tumoral salivary stroma. **Int. j. odontostomatol.**, Temuco, v. 6, n. 1, p. 59-64, Apr. 2012.

SATPATHY, Y.; SPADIGAM, A. E.; SYED, S. Epithelial and stromal patterns of pleomorphic adenoma of minor salivary glands: a histopathological and histochemical study. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, Bethesda, v. 18, n. 3, p. 379-385, Sept./Dec. 2014.

SHAH, A. A. K.; MULLA, A. F.; MAYANK, M. Pathophysiology of myoepithelial cells in salivary glands. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, Bethesda, v. 20, n. 3, p. 480-490, Sept./Dec. 2016.

SOARES, A. B. et al. Angiogenic switch during tumor progression of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. **Virchows arch.**, Berlin, v. 451, n. 1, p. 65-71, July 2007.

TANG, J. et al. Tissue elasticity displayed by elastography and its correlation with the characteristics of collagen type I and type III in prostatic stroma. **Asian j. androl.**, Beijing, v. 16, n. 2, p. 305-308, 2014.

TZANAKAKIS, G. et al. Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon. **Dev. dyn.**, New York, v. 247, n. 3, p. 368-381, Mar. 2018.

WANG, X. D. et al. Frequency and distribution pattern of minor salivary gland tumors in a northeastern Chinese population: a retrospective study of 485 patients. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 73, n. 1, p. 81-91, Jan. 2015.

WEINSTEIN, A. M.; STORKUS, W. J. Therapeutic lymphoid organogenesis in the tumor microenvironment. **Adv. cancer res.**, New York, v. 128, p. 197-233. 2015.

ANEXO 5 – Normas da Revista de Ciências Médicas e Biológicas

Instruções aos Autores

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* é um periódico especializado que tem o objetivo de publicar, divulgar e propiciar o intercâmbio de informações científicas e tecnológicas nas áreas do conhecimento médico, bioético e biológico. Disponível para receber contribuições da comunidade científica nacional e internacional, a Revista amplia os seus objetivos, na medida em que acolhe os resultados decorrentes de experiências pedagógicas vivenciadas no ensino das ciências médicas e biológicas.

1 NORMAS EDITORIAIS

1.1 Os trabalhos científicos submetidos à publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, e versarão sobre temas das áreas médica, biológica e correlatas, enquadrados na seguinte classificação:

Editorial – cuja autoria deve ser decidida pelo editor científico, podendo ser redigido por terceiros em atendimento à solicitação do Conselho Editorial.

Artigos originais – resultados novos e consolidados de pesquisa experimental ou teórica, apresentados de maneira abrangente e discutidos em suas aplicações, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de divulgação – resultados novos de pesquisa experimental ou teórica em forma de nota prévia, apresentando e discutindo experimentos, observações e resultados, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de revisão – textos que reúnam os principais fatos e idéias em determinado domínio de pesquisa, estabelecendo relações entre eles e evidenciando estrutura e conceitual própria do domínio, abrangendo de 8 a 12 páginas.

Casos clínicos – descrição de casos clínicos com revisão da literatura e discussão, apresentados em 8 a 15 páginas.

Resenhas – Análises críticas de livros, monografias e periódicos recém-publicados, contendo de uma a 4 páginas.

Conferências e relatos de experiências inovadoras – apresentação, contendo de 8 a 15 páginas, sobre temas específicos do periódico ou relacionados aos interesses científicos do mesmo.

Carta ao editor – comunicação de acontecimentos e pesquisas científicas de relevância.

1.2 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico. A *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* reserva-se todos os direitos autorais dos trabalhos publicados, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação de fonte.

1.3 A Revista reserva-se ainda o direito de submeter todos os originais à apreciação da Comissão de Publicação, do Conselho Editorial e da Comissão de Ética, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência de sua aceitação, podendo, inclusive, reapresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto e/ou para que os adaptem às normas da Revista. Nesse caso, o trabalho será reavaliado pelos assessores e pelo Conselho Editorial. Os trabalhos não aceitos serão devolvidos aos autores. Os nomes dos relatores permanecerão em sigilo, omitindo-se, também, perante os relatores, os nomes dos autores.

1.4 Todos os trabalhos que envolvam estudos com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e seus complementos e ter sido aprovados por um Comitê de Ética e Pesquisa a serem consignados pela Comissão de Ética da Revista. Nos relatos sobre experimentos com animais, deve-se indicar se foram seguidas as recomendações de alguma instituição sobre o cuidado e a utilização de animais de laboratório.

1.5 Os textos dos trabalhos ficam sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião da Comissão de Publicação e do Conselho Editorial.

1.6 A Revista poderá introduzir alterações nos originais visando a manter a padronização e a qualidade da publicação, respeitados o estilo e a opinião dos autores. As provas tipográficas não serão enviadas aos autores, mas estes receberão um exemplar do número da Revista em que o trabalho for publicado.

1.7 Fotos coloridas serão custeadas pelos autores interessados na sua publicação.

1.8 A assinatura da declaração de responsabilidade é obrigatória. Sugere-se o seguinte texto a ser incorporado aos anexos:

"Certifico(amos) que o artigo enviado à *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* é um trabalho original, sendo que o seu conteúdo não foi ou não está sendo considerado para publicação em outra revista, seja no formato impresso ou eletrônico".

Data e assinatura

Os co-autores, quando for o caso, devem assinar juntamente com o autor principal a supracitada declaração, que também se configurará como a concordância com a publicação do trabalho enviado, se este vier a ser aceito pela Revista.

1.9 Submissão de artigos online

Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do site da revista de Ciências Médicas e biológicas disponível em: <http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio>

Outras formas de submissão não serão aceitas.

2 APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Os originais destinados à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** deverão ser apresentados de acordo com as normas a seguir, baseadas, principalmente, na NBR 6022/2003 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT):

- 2.1** Os textos deverão ser redigidos em português, inglês, francês e/ou espanhol e digitados na fonte Times New Roman 12, com espaço de 1,5 cm, margem de 3 cm de cada lado e com número máximo de 20 laudas.
- 2.2** As ilustrações (gráficos, desenhos, quadros, etc.) deverão ser limitadas ao mínimo indispensável, construídas preferencialmente em programa apropriado, como Excel, Harvard, Graphics, JPEG ou outro, inseridas no texto do arquivo submetido ou separadamente no formato digital. As figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. A indicação do tipo de ilustração (Figura, Quadro, etc.) deve estar localizada na parte inferior da mesma, seguida da numeração correspondente em algarismos arábicos (ex: Figura 1-Quadro 5) e do respectivo título precedido de travessão; a legenda explicativa deve ser clara e concisa, na fonte Times New Roman 10. No caso de ilustrações extraídas de outros trabalhos, será necessário indicar a fonte.
- 2.3** As tabelas estatísticas também serão numeradas consecutivamente em algarismos arábicos, mas apresentarão a respectiva identificação — p.ex., Tabela 1 – Título; Tabela 2 – Título, etc. — na parte superior, observando-se para a sua montagem as **Normas de apresentação tabular** do IBGE (1993).
- 2.4** Deverão ser indicados, no texto, os locais aproximados em que as ilustrações e as tabelas serão intercaladas.
- 2.5** As notas de rodapé serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.
- 2.6** Recomenda-se anotar no texto: os nomes compostos e dos elementos, em vez de suas fórmulas ou símbolos; os períodos de tempo por extenso, em vez de em números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica por extenso e em itálico, em vez de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos conforme as regras internacionalmente aceitas; e os símbolos métricos de acordo com a legislação brasileira vigente.
- 2.7** No preparo do texto original, deverá ser observada, na medida do possível, a estrutura indicada em **2.7.1 a 2.7.3**, **na mesma ordem** em que seus elementos apresentam-se a seguir.

2.7.1 Elementos pré-textuais**a) Cabeçalho**, em que deve figurar:

- o título do artigo e o subtítulo (quando houver) concisos, contendo somente as informações necessárias para a sua identificação. Quando os artigos forem em português, deve-se colocar o título e o subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em inglês, francês ou espanhol, na língua em que estiverem redigidos e em português;
- o(s) nome(s) do(s) autor(es) acompanhado(s) apenas da sua titulação mais importante e a instituição na qual está vinculado. Deverá ser inserido em nota de rodapé o nome do autor para correspondência, juntamente com o endereço profissional, telefone e email.

b) Resumo – apresentação concisa dos pontos relevantes do texto, salientando: introdução, objetivo, metodologia, resultados e conclusão, de modo a permitir avaliar o interesse do artigo, prescindindo-se de sua leitura na íntegra. Para a sua redação e estilo, deve-se observar o que consta na NBR – 6028 da ABNT e não exceder as 250 palavras recomendadas.**c) Palavras-chave** – Palavras ou expressos que identificam o conteúdo do texto. Deverão ser utilizados descritores da Área de Saúde a partir da consulta ao DeCs ou MeSH**2.7.2 Texto**

- a) Introdução** – Deve apresentar com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma linha ou área. Extensas revisões de literatura devem ser evitadas e, quando possível, substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, em que certos aspectos e revisões já tenham sido apresentados. Os trabalhos e resumos originários de dissertações ou teses devem sofrer modificações,

de modo a se apresentarem adequadamente como um texto em nova formatação e atendendo às demais exigências da Revista em relação a ilustrações, fotos, tabelas, etc.

- b) **Materiais e métodos** – A descrição dos métodos usados deve ser suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho, não sendo extensa. Técnicas já publicadas, a menos que tenham sido modificadas, devem ser apenas citadas (obrigatoriamente).
- c) **Resultados** – Devem ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal, acompanhados de tabelas e/ou material ilustrativo adequado, quando necessário. Dados estatísticos devem ser submetidos a análises apropriadas.
- d) **Discussão** – Deve se restringir ao significado dos dados obtidos, resultados alcançados, relação com o conhecimento já existente, evitando-se hipóteses não fundamentadas nos resultados.
- e) **Conclusões** – Devem estar baseadas no próprio texto.

2.7.3 Elementos pós-textuais

- a) **Título do artigo** (e subtítulo, se houver) em língua estrangeira, precedendo o resumo: para textos em português essa língua será o inglês; para aqueles em outros idiomas (v.1.3), a língua será o português.
- b) **Resumo** em língua estrangeira – inglês (**Abstract**) ou português (**Resumo**), conforme a alínea a.
- c) **Keywords** ou **Palavras-chave**, conforme o caso.

Obs.: Os autores estrangeiros estão dispensados da apresentação do Resumo em português, bem como do título do artigo e das palavras-chave neste idioma.

- d) **Referências** – Devem ser elaboradas de acordo com a NBR 6023/2002 da ABNT. As referências podem ser ordenadas alfabeticamente, caso seja utilizado o sistema autor-data para as citações no texto, ou podem ser organizadas em ordem numérica crescente (algarismos arábicos), se for adotado o sistema numérico de citação (v. NBR 10520/2002, da ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com a NBR 6032/1989 da ABNT e/ou com os índices especializados. A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Serão incluídas na lista final todas as referências de textos que contribuíram efetivamente para a realização do trabalho, as quais, no entanto, não devem ultrapassar o número máximo de 20. Quanto aos trabalhos citados no texto, todos serão obrigatoriamente incluídos na lista de Referências. Informações verbais, trabalhos em andamento ou não publicados não devem ser incluídos na lista de Referências; quando suas citações forem imprescindíveis, os elementos disponíveis serão mencionados no rodapé da página em que ocorra a citação.

Obs.: Os autores estrangeiros estão dispensados da aplicação das normas da ABNT, mas deverão indicar os elementos essenciais das referências, a saber:

- para **artigos de periódicos**: autor(es), título do artigo (e subtítulo, se houver), título do periódico, cidade em que o periódico é publicado, numeração correspondente ao volume e/ou ano, número do fascículo, paginação inicial e final do artigo, data do fascículo (ex.: jan. 2001; jul./set. 2000; Summer 1998, etc.); quando o fascículo citado for um Suplemento, Edição especial, etc., isso também deverá ser mencionado no final da referência;
- para **livros**: autor(es), título (e subtítulo, se houver), edição (quando não for a primeira), cidade em que foi publicado, editora e ano de publicação;
- para **trabalhos apresentados em eventos**: autor(es) e título do trabalho, seguidos da palavra *in.*; nome do evento e respectivo número (se houver), ano e cidade onde foi realizado; título do documento onde o trabalho foi publicado (Anais, Atas, etc.), cidade de publicação, editora, ano de publicação; página inicial e final do trabalho citado.

- e) **Agradecimentos** (quando houver).
- f) **Data de entrega dos originais** à redação da Revista.
- g) **Declaração de responsabilidade** (v. 1.8).

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The *Journal of Medical and Biological Sciences* is a specialized periodical which aims at publishing and promoting the exchange of scientific and technological information in the medical, bioethical and biological fields. Willing to receive contributions from the national as well as international scientific community, the Journal has expanded its objectives in order to include reports from pedagogical experiences in the teaching of medical and biological sciences.

1 GUIDELINES FOR PRESENTATION

1.1 The scientific papers submitted for publishing must be inedited; their simultaneous presentation in another periodical is not allowed. Their subject matter must be themes within the medical, biological and correlative areas, classified according to the following system:

Editorial – its author will be indicated by the scientific editor, and it might be written by another person by especial request from the Editorial Board.

Original articles – texts of 15-25 pages, presenting new attested results from either empirical or theoretical researches, presented in a comprehensive way and discussed with regard to their applications.

Articles of partial results – texts of 15-25 pages, presenting new results from either empirical or theoretical researches in progress, presented under the form of research notes; they should present and discuss the experiments, observations and findings.

Overview articles – texts of 8-12 pages, aiming at reviewing the main facts and ideas within certain fields of research, establishing the relationship between them and giving evidence of a structural and conceptual grasp of the subject.

Clinical cases – texts of 8-15 pages, reporting clinical cases, including discussions and literature reviews.

Reviews – texts of 1-4 pages, presenting critical analysis of recently published books, thesis and periodicals.

Lecture papers and reports from innovative experiments – texts of 8-15 pages about specific themes of the periodical or related to its scientific interests.

Letter to the Editor – communications on scientific events and relevant researches.

1.2 The scientific papers submitted for publishing must be inedited, their simultaneous presentation in another periodical is not allowed. The copyright of the published works belongs to the *Journal of Medical and Biological Sciences*, including translation rights, however, later publication is allowed in the form of transcription of the original text, with the respective indication of its source.

1.3 The Journal reserves the right to submit all original texts to the appreciation of the Publishing Committee, the Editorial Committee and the Ethical Committee, which have complete authority to decide on the convenience of its acceptance, having also the right to return the texts to the authors with suggestions for alterations in order to adapt them to the editorial instructions of the Journal. In this case, the work will be reassessed by the consultants and by the Editorial Committee. The rejected work will be sent back to its authors. The names of consultants and authors will remain mutually unknown.

1.4 Every work dealing with human beings, including human organs and/or tissue, as well as clinical reports and results of clinical examinations must be under the terms of the Resolution no. 196/96 from the National Health Board (Conselho Nacional de Saúde). Furthermore, they must have the approval of a Commission of Ethics and Research appointed by the Journal's Ethical Committee. The work which deals with animal experiments should clearly indicate if the experiments have followed the recommendations of any institution regarding the care and use of animals for lab research.

1.5 The texts remain under the entire responsibility of their authors and do not express the opinions of the Publishing Committee or the Editorial Committee at all.

1.6 The Journal reserves the right to alter the original text in order to ensure the standards and quality of the publication, respecting nevertheless the authors' style and opinions. The typographical proofs of the texts will not be sent to the authors, however, they will receive one print copie of the number of the Journal in which their work has been published.

1.7 The costs of color photographs will be paid by the authors interested in their publication.

1.8 The signing of the Declaration of Responsibility is mandstory. We suggest the authors enclose the text below:

I (We) declare hereby that the article sent for publication in the *Journal of Medical and Biological Sciences* is an original work and that its contents have not been previously published and it is not being considered for publication by any other periodical, either in printed or electronic form.

Date and signature

Both the main author and co-authors should sign the above Declaration which will be considered the authors' permission for publication if the work is accepted by the Journal.

1.9 Submitting articles online

Papers should be submitted electronically through the website of the journal of Medical Sciences and Biological available at: <http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio>

Other forms of submission will be accepted.

2 FORMAL PRESENTATION OF THE TEXTS

The originals sent to the **Journal of Medical and Biological Sciences** should be presented under the following instructions, which are based on the guidelines established by the NBR 6022/2003 of the Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT):

- 2.1** The text should be written in Portuguese, English, French and / or Spanish and typed in Times New Roman pitch 12, spaced 1.5 cm, margins 3 cm both sides, until 20 pages.
- 2.2** Illustrations (graphics, drawings, tables, etc.) must be limited to the absolutely indispensable, it must be worked preferably in appropriate program such as Excell, Harvard, Graphics, JPEG or other. It must be in the text file or separately submitted in digital format. Figures should be numbered in Arabic numerals. The indication of the type of illustration (Figure, Table, etc.) Must be located at the bottom of it, then the corresponding number in Arabic numerals (eg Figure 1 – Table 5) and the respective title preceded by indent; caption explanation must be clear and concise, in Times New Roman 10. In the case of illustrations taken from other works, must indicate the source.
- 2.3** Statistic tables should also be numbered consecutively in Arabic numerals but will bear their respective designation – for instance, Table 1 – Title; Table 2 – Title, etc. – at the top of the page. Their form should follow the **Guidelines for Statistic Tables**, issued by the IBGE (1993).
- 2.4** The probable place where the illustrations and tables are supposed to be inserted should be indicated in the body of the text.
- 2.5** Footnotes should be indicated by an asterisk and limited to the absolutely indispensable.
- 2.6** The following observations should be taken into consideration when presenting the text: names and designations of elements instead of their formulas and symbols; dates extensively written instead of figures, binomials of zoological and botanical terminology extensively written in italic characters instead of abbreviated forms; mathematical and physics symbols according to internationally accepted paradigms; metrical symbols according to Brazilian current legislation.
- 2.7** In the writing of the original text, the structure proposed in 2.7.1-2.7.3 should be followed, as far as possible, in the same order in which its elements are presented below.

2.7.1 Pre-textual elements

- a) Heading** – it should include: the title and (if any) subtitle of the article, which should be concise, including only the necessary information for its identification. When the language of the article is Portuguese, the title should be written in both Portuguese and English; when the language of the article is either E, French or Spanish, in the respective language and in Portuguese; – name (s) of author (s) and their most important academic degrees. Should be inserted in a footnote the name of the Correspondence along with business address, phone and email.
- b) Abstract** – concise presentation of the main content of the text emphasizing the most relevant conclusions, in order for the writer to be able to evaluate its interest without reading the whole article. As for the questions of style and language, it should be under the terms of the NBR – 6028 /1990 from ABNT and the abstract should not exceed the recommended 250 words.
- c) Keywords** – words or expressed which identify the content of the text. Must be used the Medical Subject Headings (MeSH).

2.7.2 Text

- a) Introduction** – it should be a clear presentation of the aims of the work and its relationship to other studies within the same field or lines of research. Extensive bibliographical review should be avoided and, if possible, replaced by references to the most recent works, where such review has already been made. Texts written originally as dissertations, thesis or their abstracts should be modified in order to be texts in new format, adjusted to all the Journal's requirements regarding illustrations, photographs, tables, etc.
- b) Methods and techniques** – The description of the methods employed should be short but explicit enough to ensure a clear understanding of the work and its reproduction. Tech must be only quoted, unless they

have been modified.

- c) **Results** – they should be presented with a minimum of discussion or personal interpretation, supplemented by tables and/or illustrations, when needed. Statistic data should be submitted to appropriate analyses.
- d) **Discussion** – it should be limited to the meaning of the data collected, the achieved results and its relationship to the existing knowledge, and hypotheses which have no bearing on the results should be avoided.
- e) **Conclusions** – they should be based upon the text itself.

2.7.3 Post-textual elements

- a) **Title of the article** (and subtitle, if any) in the foreign language, preceding the abstract: for articles in Portuguese, the language should be English; for articles in other languages (see 1.3.), the language should be Portuguese.
- b) **Abstract** in foreign language – English (**Abstract**) or Portuguese (**Resumo**), according to a).
- c) **Keywords** or **Palavras-chave**, according to the situation.

NB: Foreign authors are not expected to present the **Resumo** in Portuguese, as well as the title of the article and its keywords.

- d) **References** – limited to 20, may be they should be under the terms of the NBR 6023/2002 of the ABNT. References may be systematized in **alphabetical order**, if the system adopted is author-data for quotations within the text, or they might be organized in **numerical order** (Arabic algorisms) if the adopted system is the numerical quotation system (see NBR 10520/2002 from ABNT). Abbreviated forms of the title of quoted periodicals should be in accordance to the NBR 6023/2989 from ABNT and/or the nomenclature of specialized indexes. The accuracy of the references is on the authors' own responsibility. Verbally communicated information, work in progress or unpublished work should not be included in the list of References; when quotations from this type of material are indispensable, the available information should mentioned in the footnote, on the same page as the quotation. **NB:** Foreign authors are not expected to follow the guidelines issued by the ABNT, however, they should include the main elements of their references, as listed below:

- For **periodical articles**: author(s), title of article (and subtitle, if any), periodical, place of publication, number of volume and/or year, first and last page number for the article, date of publication (for instance, January 2001; July/September 2000; Summer 1998, etc.); when the issue is a Supplement, Special Issue or similar, this should also be mentioned.
- For **books**: author(s), title of article (and subtitle, if any), edition (if not the first), place of publication (city), publishing house and year of publication.
- For **papers presented at conferences and similar events**: author(s), title of article (and subtitle, if any), followed by the word in; title of the event and respective number (if any), year and place where it was held; title of the publication where the paper was published (Annals, Report, etc.), place of publication (city), publishing house, year of publication, first and last page number for the paper referred.

- e) **Thanks** (if any).
- f) **Date of delivering the original text** to the Journal.
- g) **Declaration of responsibility** (see 1.8).

MODELO DE RESUMO

Resumo

Introdução:

Objetivo:

Metodologia:

Resultados:

Conclusão:

Palavras chave: Palavra chave. Palavra chave. Palavra chave. Palavra chave.

Introduction:

Objective:

Methodology:

Results:

Conclusions:

Keywords: Keyword.. Keyword. Keyword. Keyword.

MODELO DE IDENTIFICAÇÃO

Título do artigo em português

Título do artigo em inglês

Nome do autor¹, Nome do autor², Nome do autor³, Nome do autor⁴¹Titulação do autor, filiação, resumo da biografia, ²Titulação do autor, filiação, resumo da biografia, ³Titulação do autor, filiação, resumo da biografia, ⁴Titulação do autor, filiação, resumo da biografia

Endereço para correspondência:

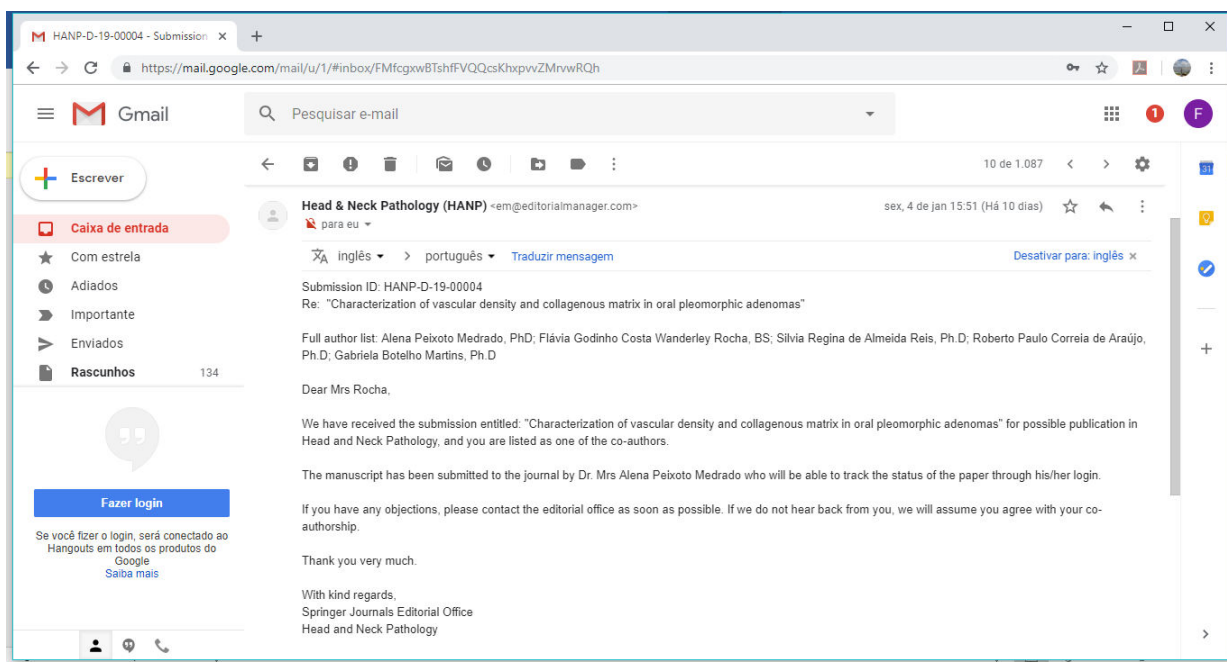
Nome: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Local: xxxxx

Fone: xxxxxx

E-mail: xxxxx@xxxxxxxxxx

ANEXO 6 – Comprovante de submissão do Artigo Original para a Revista Head & Neck Pathology





Instituto de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação

Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas

Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100

Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>