



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

MARIA CLARA FALCÃO RIBEIRO DE ASSIS

**ANÁLISE DA MATRIZ EXTRACELULAR NOS TUMORES DE
GLÂNDULAS SALIVARES: UM ESTUDO MORFOLÓGICO E
HISTOQUÍMICO**

**Piracicaba
2024**

MARIA CLARA FALCÃO RIBEIRO DE ASSIS

**ANÁLISE DA MATRIZ EXTRACELULAR NOS TUMORES DE
GLÂNDULAS SALIVARES: UM ESTUDO MORFOLÓGICO E
HISTOQUÍMICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Estomatopatologia, na Área de Patologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Viviane Mariano Brum Corrêa

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Maria Clara Falcão Ribeiro de Assis e orientada pelo Profa. Dra. Fernanda Viviane Mariano Brum Corrêa.

**Piracicaba
2024**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

R354a Ribeiro-de-Assis, Maria Clara Falcão, 1997-
Análise da matriz extracelular nos tumores de glândulas salivares : um estudo morfológico e histoquímico / Maria Clara Falcão Ribeiro de Assis. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Fernanda Viviane Mariano Brum Corrêa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Neoplasias das glândulas salivares. 2. Matriz extracelular. 3. Colágeno.
4. Microscopia de geração de segundo harmônico. 5. Histoquímica. I. Mariano, Fernanda Viviane, 1984-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Analysis of the extracellular matrix in salivary gland tumors : a morphological and histochemical study

Palavras-chave em inglês:

Salivary gland neoplasms

Extracellular matrix

Collagen

Second harmonic generation microscopy

Histochemistry

Área de concentração: Patologia

Titulação: Mestra em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Fernanda Viviane Mariano Brum Corrêa [Orientador]

Fabricio Passador-Santos

Danielle Resende Camisasca Barroso

Data de defesa: 30-07-2024

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3731-7856>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6604951936725623>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 30 de julho de 2024, considerou a candidata MARIA CLARA FALCÃO RIBEIRO DE ASSIS aprovada.

PROF^a. DR^a. FERNANDA VIVIANE MARIANO BRUM CORRÊA

PROF. DR. FABRICIO PASSADOR-SANTOS

PROF^a. DR^a. DANIELLE RESENDE CAMISASCA BARROSO

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistemade Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó, Miminha, que mais do que qualquer um, foi incentivo e entusiasmo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Deus, porque “Ele disse-me: ‘Basta-te a minha graça. Pois é na fraqueza que a força se manifesta’” (2Cor 12, 9a). E em quem encontrei a coragem necessária para iniciar, fortaleza para persistir e paz de espírito para finalizar. Tem a ver com vida e entendimento, tem a ver com amor e escolha. Por todas essas graças eu sou feliz e reconheço.

Família, como é grande a saudade. Agradeço aos meus pais, **Solange** e **Demerval** pela incansável tentativa de estar perto de modo que a experiência da nova e solitária moradia foi menos dura. Minha irmã, **Maria Júlia**, que segue quebrando galhos, agradeço pelas opiniões e por ser minha primeira aluna. Meus avós, **Bina** e **Miminha**, meus amores maiores, em quem penso nas horas de aperto e felicidade e são sem dúvidas, meus maiores incentivadores.

Lucas, agradeço por cada momento em que pudemos compartilhar nossa vida, incluindo a experiência do mestrado, especialmente por entender a distância, mesmo quando eu mesmo não o pude fazer. Agradeço ainda pela valiosa ajuda com a estatística aqui apresentada, afinal “na alegria e na tristeza” pode ser traduzido em “no Power Point e na estatística”.

Prof. Dra. Fernanda agradeço a grande oportunidade de me receber como aluna de mestrado, de me dispor este projeto e depositar em mim a confiança para executá-lo. É uma honra poder ser parte do LAPMOL, aprender com a senhora e acompanhar de perto sua dedicação e comprometimento por sua profissão. Agradeço por apostar em mim e me dar autonomia para aprender na prática, a senhora é exemplo de autoridade e competência.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas**, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. **Flávio Henrique Baggio Aguiar**.

À **Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, na pessoa do Prof. Dr. **Valentim Adelino Ricardo Barão**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia**, pela possibilidade de realizar este trabalho, e por toda oportunidade de crescimento oferecida, em nome do ex-coordenador Prof. Dr. **Pablo Augustin Vargas** e do atual coordenador, **Márcio Ajudarte Lopes**.

Ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular – INFABIC** por tornar este trabalho possível. Em especial a **Thiago Campos** pelo suporte e recomendações durante toda a etapa de realização da Geração de Segundo Harmônico, agradeço sua grande dedicação e ajuda, sem eles este trabalho não seria o mesmo. Ao Prof. Dr. **Sílvio Roberto Consonni** por dispor das dependências do Laboratório para a realização do trabalho e suas importantes sugestões a respeito das técnicas utilizadas. A técnica **Cíntia Rizoli** que me auxiliou com algumas técnicas de coloração utilizadas aqui.

Ao **Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas** por oferecer oportunidades de crescimento e ensinamentos, disponibilizando espaços de aprendizagem e suporte. Aos funcionários do Departamento, que são solícitos e de extrema importância no desenvolver da ciência. Em especial às funcionárias **Divani de Fatima de Almeida, Tayna Takahashi e Thaina Oliveira Liu** pelo grande auxílio e valorosa instrução a respeito das técnicas histoquímicas utilizadas neste trabalho, sou muito grata por todas as manhãs em que pude aprender com vocês.

À professora **Albina Altemani** pelo sorriso constante e ensinamentos valiosos, é um privilégio tê-la como referência na patologia. À professora **Maria Letícia Cintra** pelos importantes ensinamentos, encaminhamentos, oportunidades e em especial pela ajuda com a técnica do GSH.

Ao **Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço** da FCM pela oportunidade de estágio, em especial ao prof. **Dr. Alfio José Tincani**, pela sempre gentil acolhida e caros ensinamentos, aos médicos assistentes **Dr. André Del Negro, Dr. Pedro Deak e Dr. Thiago Baldasso** e ao residente **Wezza Nataniel** pela experiência de acompanhar os atendimentos do Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Aos colegas **Moises, Tayná e Iara** pelos importantes momentos de confraternização dentro e fora do laboratório, vocês foram o alívio necessário em muitos momentos em que o chão ameaçou faltar, agradeço pelo nosso encontro, as importantes sugestões para esse trabalho e o incentivo recebido.

Reydsen, pela admissão instantânea e grande apoio em momentos tão diversos que seria impossível listar, obrigada pelo encorajamento quando a firmeza pareceu desaparecer, obrigada por passar horas comigo resolvendo quebra-cabeças que eu mesma criei e esclarecer as coisas quando não foi só o grau do óculos que eu precisava corrigir, você é um anjo, já disse algumas vezes. **Luccas**, sinto que não saberia expressar meu reconhecimento, há tanto a agradecer, obrigada, do início ao fim, desde a inscrição até a última linha deste trabalho, agradeço por acreditar em mim e estar aqui, mesmo daí. **Talita** pela acolhida inicial e por ser grande exemplo de dedicação e gentileza, obrigada pelos momentos de debate acadêmico e sobre entretenimento.

Aos demais colegas de laboratório **Ingrid, Nádia, Paola, Francisco, Marcelo, João e Gustavo**, pela parceria na jornada, que de bolos a lâminas pudemos compartilhar. Passar pelos momentos de desafio em boa companhia colabora para um bom resultado.

À **Prof. Dra. Danielle Resende Camisasca**, pelo entusiasmo e contínua disposição como profissional, é um dos meus maiores exemplos de excelência. Espero um dia retribuir a significativa ajuda e encaminhamento para essa especialidade que tanto amo. Agradeço o frequente incentivo e encorajamento.

Finalmente, agradeço ao laboratório enquanto lugar físico, por me permitir tanto crescimento, em meio a tubetes, vidrarias e um pouco de música, compartilhamos momentos inesquecíveis e engrandecedores.

RESUMO

Os tumores de glândulas salivares (TGS) constituem uma categoria rara de tumores de cabeça e pescoço, representando entre 3 e 10% dos casos nessa região. Esses tumores são conhecidos por sua diversidade morfológica, tornando o diagnóstico desafiador. A presença de células mioepiteliais contribui significativamente para essa complexidade, influenciando tanto a estrutura tumoral quanto a síntese da matriz extracelular (MEC). A MEC, uma rede complexa que sustenta células e tecidos, regula diversas funções celulares por meio de sinais químicos e mecânicos. O objetivo desse trabalho foi descrever componentes da MEC em TGS com e sem diferenciação mioepitelial. Para este estudo, foram selecionados 5 casos de cada tumor: adenoma pleomórfico (AP), mioepitelioma (ME), carcinoma adenoide cístico (CAC), carcinoma mioepitelial (CM), carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM) e carcinoma do ducto salivar (CDS). Foram realizadas colorações histoquímicas específicas para visualizar fibras colágenas (Vehoeff, Weigert-Van Gieson, Tricromio Masson, Picrossirius Red), elastina (Vehoeff, Weigert-Van Gieson), proteoglicanos (PG) e glicosaminoglicanos (GAG) (Azul de Toluidina e Alcian Blue). Além disso, foram feitas análises de fibras de colágeno através da técnica de geração de segundo harmônico (GSH) e analisadas em três áreas: estroma tumoral, estroma extratumoral e cápsula. Para cada área, foram selecionadas quatro regiões de interesse para análise de fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste, utilizando o software ImageJ. Os dados foram tabulados e submetidos a análise estatística com um limite de significância estabelecido em $p < 0,0005$. Os resultados histoquímicos revelaram que os diferentes subtipos de TGS apresentaram características distintas na composição da MEC, AP mostrou baixa marcação para elastina e colágeno, enquanto proteoglicanos e glicosaminoglicanos estavam presentes em mais de 50% dos casos. Em contraste, o ME exibiu variação na marcação de colágeno e elastina, e o CAC apresentou colágeno predominante. O CM apresentou marcação controversa para elastina, a marcação para colágeno foi baixa em todos os casos. CEM e CDS apresentaram marcação alta para colágeno. A análise do SHG mostrou maior fração de área e níveis de cinza na região extratumoral que a intratumoral. Na análise de segunda ordem, a entropia foi significativamente maior na região extratumoral. Quando houve a comparação apenas entre os tumores com diferenciação mioepitelial, os tumores malignos apresentaram valores significativamente mais elevados que os benignos em todos os aspectos. Os perfis clínico-patológicos dos TGS foram confirmados pela literatura existente, com técnicas histoquímicas revelando variações na MEC dos tumores. Tumores benignos apresentaram maior expressão de PG e GAG em comparação aos malignos, que exibiram colágeno com maior quantidade, mas com alterações na estrutura. A análise do GSH evidenciou diferenças na organização do colágeno. A caracterização histoquímica e a análise do colágeno ressaltam a importância da MEC na biologia tumoral, sugerindo que futuros estudos devem explorar as funções específicas dos componentes da MEC para melhores abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: Neoplasias das Glândulas Salivares. Matriz Extracelular. Colágeno. Microscopia de geração de segundo harmônico. Histoquímica.

ABSTRACT

Salivary gland tumors (SGTs) are a rare category of head and neck tumors, accounting for 3 to 10% of cases in this region. These tumors are known for their morphological diversity, making diagnosis challenging. Myoepithelial cells contribute significantly to this complexity, influencing tumor structure and extracellular matrix (ECM) synthesis. The ECM, a complex network that supports cells and tissues, regulates several cellular functions through chemical and mechanical signals. This study aimed to describe ECM components in SGTs with and without myoepithelial differentiation. For this study, 5 cases of each tumor were selected: pleomorphic adenoma (PA), myoepithelioma (ME), adenoid cystic carcinoma (ACC), myoepithelial carcinoma (MC), epithelial-myoepithelial carcinoma (EMC), and salivary duct carcinoma (SDC). Specific histochemical stains were performed to visualize collagen fibers (Vehoeff, Weigert-Van Gieson, Masson Trichrome, Picrosirius Red), elastin (Vehoeff, Weigert-Van Gieson), proteoglycans (PG) and glycosaminoglycans (GAG) (Toluidine Blue and Alcian Blue). In addition, collagen fibers were analyzed using the second harmonic generation (GSH) technique and analyzed in three areas: tumor stroma, extratumoral stroma, and capsule. Four regions of interest were selected for analysis of area fraction, mean gray level, entropy, and contrast for each area using ImageJ software. Data were tabulated and subjected to statistical analysis with a significance limit set at $p < 0.0005$. Histochemical results revealed that the different subtypes of GST presented distinct characteristics in the composition of the ECM, AP showed low staining for elastin and collagen, while proteoglycans and glycosaminoglycans were present in more than 50% of the cases. In contrast, ME exhibited variation in the staining of collagen and elastin, and CAC showed predominant collagen. CM presented controversial staining for elastin, the staining for collagen was low in all cases. CEM and CDS presented high staining for collagen. The SHG analysis showed a higher area fraction and gray levels in the extratumoral region than in the intratumoral region. In the second-order analysis, the entropy was significantly higher in the extratumoral region. When comparing only the tumors with myoepithelial differentiation, malignant tumors presented significantly higher values than benign ones in all aspects. The clinicopathological profiles of GST were confirmed by the existing literature, with histochemical techniques revealing variations in the ECM of the tumors. Benign tumors showed higher expression of PG and GAG compared to malignant tumors, which exhibited greater collagen quantity but with structural alterations. GSH analysis showed differences in collagen organization. Histochemical characterization and collagen analysis highlight the importance of ECM in tumor biology, suggesting that future studies should explore the specific functions of ECM components for better therapeutic approaches.

Key words: Salivary Gland Neoplasms. Extracellular Matrix. Collagen. Second Harmonic Generation Microscopy. Histochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – MEC normal.....	18
Figura 2 – Colorações especiais – controle	36
Figura 3 – Configuração do sistema experimental de GSH.	38
Figura 4 – Seleção de RI em imagens captadas através de NLOM por GSH.	39
Figura 5 – Fórmula para o cálculo do descritor de entropia.....	40
Figura 6 – Fórmula para o cálculo do descritor de contraste.	40
Figura 7 – Fotomicrografias em HE ilustrando TGS benignos com diferenciação mioepitelial	43
Figura 8 – Fotomicrografias em HE ilustrando os TGS malignos com diferenciação mioepitelial	45
Figura 9 – Fotomicrografias em HE ilustrando o CDS	46
Figura 10 – Coloração de VHF para observar colágeno em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.	54
Figura 11 – Coloração de VHF para observar elastina em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.	55
Figura 12 – Coloração de WVG para observar colágeno em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.	56
Figura 13 – Coloração de WVG para observar elastina em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.	57
Figura 14 – Coloração de PCR para observar colágeno em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.	58
Figura 15 – Coloração de TMA para observar colágeno em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.	59
Figura 16 – Coloração de RET para observar FR em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.	60
Figura 17 – Coloração de ATO para observar PG e GAG em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.	61
Figura 18 – Coloração de ALB para observar PG e GAG em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.	62
Figura 19 – Distribuição dos componentes da MEC pelas colorações especiais	63
Figura 20 – GSH dos TGS.....	65
Figura 21 – Gráficos de distribuição dos valores obtidos através da GSH nos TGS comparado aos valores da região extratumoral para fração de área, nível de cinza, contraste e entropia.....	67
Figura 22 – Comparação entre tumores benignos e malignos com diferenciação mioepitelial	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de colágenos, suas localizações e funções (continua)	19
Tabela 2 – Descrição das cores esperadas para os componentes da MEC estudados através das colorações especiais.	35
Tabela 3 – Informações clínico-patológicas dos TGS (continua).....	47
Tabela 4 – Descrição da distribuição das colorações especiais nos TGS (continua).....	52
Tabela 5 – Variáveis avaliadas utilizando a GSH para observação de fibras colágenas entre a região intratumoral e extratumoral.	66
Tabela 6 – Variáveis avaliadas utilizando a GSH para observação de fibras colágenas entre a região intratumoral e cápsula.	68
Tabela 7 – Comparação dos TGS entre si.....	69
Tabela 8 – Comparação entre tumores benignos e malignos com diferenciação mioepitelial.	69

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALB	Alcian Blue
AP	Adenoma pleomórfico
ATO	Azul de Toluidina
CAC	Carcinoma adenoide cístico
CAF	Fibroblastos associados ao câncer
CAT	Colágeno associado ao tumor
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CDS	Carcinoma do ducto salivar
CEC	Carcinoma espinocelular
CEM	Carcinoma epitelial-mioepitelial
CGA	Campo de grande aumento
CLG	Colágeno
CM	Carcinoma mioepitelial
CNN	Calponina
CXAP	Carcinoma ex-adenoma pleomórfico
DAP	Departamento de Patologia
ELT	Elastina
EXT	Extratumoral
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FR	Fibras reticulínicas
GAG	Glicosaminoglicanos
GLCM	<i>Gray level co-occurrence matrix</i>
GSH	Geração de segundo harmônico
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina-eosina
IC	Instituto de Biologia
INFABIC	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular
MAT	Microambiente tumoral
máx	Máximo
ME	Mioepitelioma
MEC	Matriz extracelular

min	Mínimo
MMP	Metaloproteinase de matriz
NDD, R	<i>Non-descanned detector</i> , refletido
NDD, T	<i>Non-descanned detector</i> , transmitido
NI	Não informado
NLOM	<i>Nonlinear optics microscopy</i>
PCR	Picrosirius Red
PG	Proteoglicanos
RET	Reticulina
RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i>
RI	Região de interesse
SAM	Serviço do Arquivo Médico
TGS	Tumores de glândulas salivares
TMA	Tricromio Masson
TPEF	<i>Two-Photon Excitation Fluorescence</i>
VHF	Verhoeff
WVG	Weigert-Van Gieson

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES.....	17
2.2. MATRIZ EXTRACELULAR.....	17
2.2.1. Componentes da matriz	18
2.2.2. MEC no microambiente tumoral	23
2.2.3. Matriz extracelular em tumores de glândulas salivares.....	24
2.3. COLORAÇÕES ESPECIAIS.....	31
2.4. GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO	32
3. PROPOSIÇÃO	33
3.1. OBJETIVOS GERAIS	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	34
4.2. COLORAÇÕES ESPECIAIS.....	34
4.3. GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO.....	37
4.3.1. Aquisição das imagens do segundo harmônico	37
4.3.2. Análise das imagens	39
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5. RESULTADOS.....	42
5.1. CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	42
5.2. COLORAÇÕES ESPECIAIS.....	50
5.3. GSH	64
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE 1 PROTOCOLOS DE COLORAÇÕES ESPECIAIS.....	91
ANEXO 1 Aprovação no Comitê de Ética FCM–UNICAMP	102
ANEXO 2 Relatório de Similaridade	104

1. INTRODUÇÃO

Os tumores de glândulas salivares (TGS) correspondem entre 3 a 10% de todos os tumores de cabeça e pescoço, com uma incidência anual de aproximadamente 2:100.000 pessoas ao ano (Mckenzie et al., 2023; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). São entidades de notável diversidade morfológica, sendo discutido como o grupo de neoplasias mais heterogêneo. Essa variação ocorre tanto entre diferentes tipos de tumores quanto dentro do mesmo tumor, tornando o diagnóstico dessas neoplasias uma tarefa desafiadora (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023).

As células mioepiteliais, componentes de muitos TGS, contribuem para complexidade histológica dessas neoplasias devido sua capacidade em adquirir diferentes fenótipos. Essas células influenciam a estrutura e a composição dos tumores através de uma ampla gama de mudanças celulares e de sua participação na síntese da matriz extracelular (MEC) (Chitturi, 2015; Shah et al., 2016).

A MEC é uma intrincada rede de macromoléculas extracelulares secretadas pelas células nos tecidos (Raitz et al., 2003), com características físicas, bioquímicas e biomecânicas específicas. Essa rede desempenha um papel importante na sustentação das células e na formação dos tecidos, constitui uma armadura arquitetônica do organismo dos vertebrados, proporcionando um substrato organizado no qual as células podem realizar movimentos migratórios e interagir entre si (Najafi et al., 2019; Pickup et al., 2014; Raitz et al., 2003; Theocharis et al., 2019). A MEC, devido à sua composição, desempenha um papel multifuncional ao fornecer sinais químicos e mecânicos que regulam uma variedade de funções celulares, incluindo a homeostase tecidual, o controle do crescimento celular, a sobrevivência, a motilidade e a diferenciação por meio da interação com receptores específicos (Girigoswami et al., 2021; Pickup et al., 2014; Theocharis et al., 2019).

As alterações no padrão normal de organização da MEC podem comprometer a organização e função dos tecidos, desencadeando transformações que permitam o desenvolvimento de doenças como fibrose e câncer (Malik et al., 2015; Theocharis et al., 2019). Em TGS, o entendimento da participação da MEC na histogênese e progressão dos tumores pode fornecer importantes compreensões para o diagnóstico e prognóstico dessas neoplasias. Além disso, a MEC tem sido alvo de estudos em terapia alvo devido sua contribuição para a manutenção e nutrição tumoral (Allon et al., 2006), conhecimento que pode ser aplicado para componentes específicos da MEC nos TGS em futuros estudos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES

Os TGS compreendem um grupo incomum de neoplasias benignas e malignas com características histopatológicas complexas. Um dos maiores desafios para o estabelecimento do diagnóstico dos TGS diz respeito a ampla variedade morfológica que as células que compõem as glândulas salivares podem apresentar (Shah et al., 2016), podendo levar a dificuldades no estabelecimento do diagnóstico histopatológico definitivo (Mariz et al., 2019; Wagner et al., 2014).

A maior parte dos TGS ocorrem nas glândulas parótidas (70%), mas podem acometer as glândulas submandibulares, sublinguais e glândulas salivares menores, estas últimas quando acometidas, normalmente se tratam de tumores malignos. As mulheres são mais frequentemente acometidas do que os homens, com maior prevalência a partir da terceira década de vida. Os principais sinais e sintomas se concentram em aumentos de volume e dor local. Os TGS benignos correspondem a aproximadamente 80% dos diagnósticos. O tratamento em geral é a excisão cirúrgica completa da glândula acometida (Mckenzie et al., 2023; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023)

2.2. MATRIZ EXTRACELULAR

A MEC compõe a fração não celular presente em todos os tecidos e órgãos, sendo responsável pela estruturação física que sustenta os componentes celulares, sinalização bioquímica e biomecânica para a morfogênese, diferenciação e homeostase tecidual (Frantz et al., 2010; Najafi et al., 2019; Pickup et al., 2014; Theocharis et al., 2019).

Apesar de ser composta fundamentalmente por água, proteínas e polissacarídeos, cada tecido apresenta uma MEC única em termos de morfologia e porção de componentes. A MEC é formada durante o desenvolvimento tecidual através de interações bioquímicas e biofísicas dinâmicas entre os componentes celulares e o ambiente microscópico em constante remodelação, sendo variáveis de acordo com o tipo de tecido (Frantz et al., 2010). A remodelação da MEC é constante e ocorre de acordo com as condições que são aplicadas a ela, podendo alterar a estrutura, integridade e funcionalidade do tecido em condições normais, como a cicatrização de uma área, ou em condições patológicas, como o desenvolvimento de um tumor. A destruição da MEC ocorre ao mesmo tempo em que ela se regenera com novos componentes recém-formados. Os fibroblastos são uma importante fonte de componentes para a remodelação da MEC, porém seus componentes podem ser provenientes de todas as células do tecido. Uma vez que a remodelação da matriz acontece de maneira desregulada, alterações

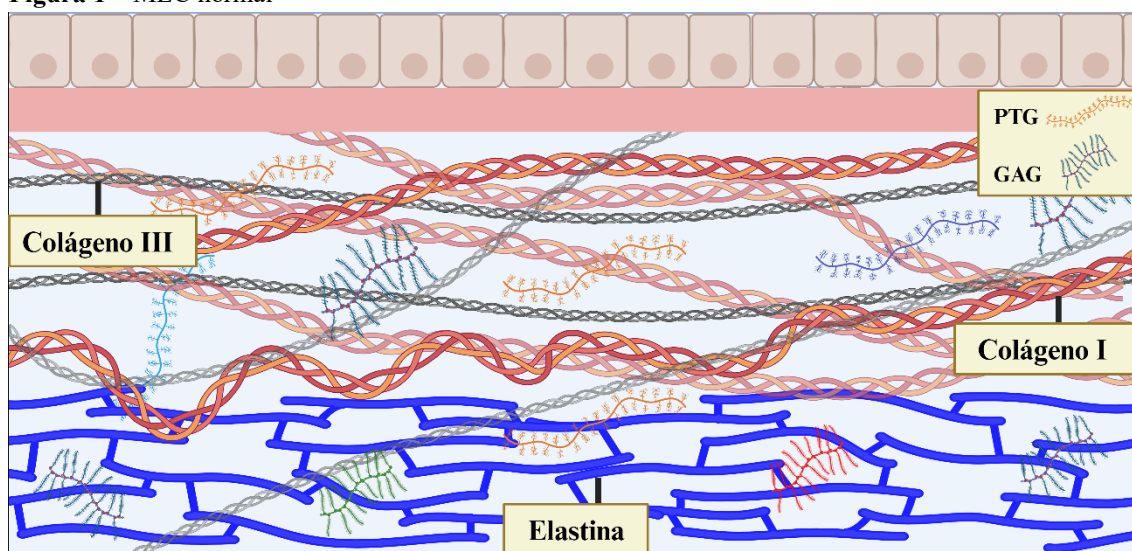
teciduais podem ocorrer e gerar uma patologia (Theocharis et al., 2019). A partir de suas características de composição, a MEC fornece sinais químicos e mecânicos para a realização de diferentes funções, como: homeostase tecidual, regulação do crescimento celular, sobrevivência, motilidade e diferenciação quando ligadas a receptores específicos (Girigoswami et al., 2021; Pickup et al., 2014; Theocharis et al., 2019).

A MEC geralmente é composta por colágenos, elastina, fibronectina, lamininas, proteoglicanos (PG), hialuronano e glicoproteínas que interagem entre si e geram uma trama que integra vários tipos de células. As moléculas presentes na MEC interagem ainda com receptores celulares e regulam sinalizadores ajustando as funções e o comportamento celular (Clause and Barker, 2013; Theocharis et al., 2019).

2.2.1. Componentes da matriz

A composição da MEC pode ser dividida em duas classes: PG e proteínas fibrosas, sendo elas colágenos, elastinas, fibronectinas e lamininas (Figura 1)(Frantz et al., 2010). Esses componentes interagem entre si e geram uma trama que integra vários tipos de células. As moléculas presentes na MEC interagem ainda com receptores celulares e regulam sinalizadores ajustando as funções e o comportamento celular (Clause and Barker, 2013; Theocharis et al., 2019).

Figura 1 – MEC normal



Proteoglicanos (PTG) e Glicosaminoglicanos (GAG)

Colágenos

Os colágenos são componentes expressos em todos os tecidos do organismo. Até o momento foram identificados 28 tipos de colágeno em vertebrados, que formam complexos supramoleculares como fibrilas e redes. São as proteínas mais abundantes presentes no tecido

conjuntivo, sendo o colágeno tipo I a proteína mais abundante no corpo (Karsdal, 2023). Na MEC os colágenos também são os componentes que estão presentes em maior quantidade e em ampla distribuição entre os tecidos, na MEC faz parte de cerca de um terço das proteínas totais da MEC e forma parte importante do estroma do tecido conjuntivo (Devendra et al., 2018; Frantz et al., 2010)(**Tabela 1**). O colágeno é sintetizado e secretado por fibroblastos com a função de construção de fibras, redes e filamentos teciduais (Rozario and DeSimone, 2010). Os colágenos fibrosos têm a função estrutural das fibrilas de colágeno no estroma do tecido intersticial, enquanto os colágenos de rede estão presentes na membrana basal (Frantz et al., 2010).

Na MEC, os colágenos estão relacionados a funções estruturais como: fornecer resistência à tração, regular a adesão celular, apoiar a quimiotaxia e a migração e direcionar o desenvolvimento do tecido (Devendra et al., 2018). A maior parte do colágeno intersticial é transcrita e secretada por fibroblastos que residem no estroma ou são recrutados para ele a partir de tecidos vizinhos (Frantz et al., 2010). Quando exercem tensão sobre a MEC, os fibroblastos organizam as fibrilas de colágeno em folhas e cabos, influenciando significativamente o alinhamento dessas fibras. Embora as fibras de colágeno em um tecido sejam uma mistura heterogênea de diferentes tipos, geralmente um tipo de colágeno predomina (Karsdal, 2023).

Tabela 1 – Tipos de colágenos, suas localizações e funções (continua)

Tipos de colágeno	Localização	Função
I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII (Fibrilares)	Fibrilas heterotípicas de colágeno I, III e V existem na derme, tendão e ossos. Fibrilas heterotípicas de colágeno tipo II, IX e XI predominam na cartilagem e no vítreo	Os tipos mais encontrados nos tecidos, sendo responsáveis por construir fibrilas heterotípicas, que variam de tecido para tecido
IV, VIII e X (redes de colágenos - FACIT)	IV: principal constituinte das membranas basais; VIII: presente nas matrizes subendoteliais; X: cartilagens	Formam redes
IX, XII, XIV, XIX, XX, XXI e XXII (associados a fibrilas com tripla hélice interrompida MACIT)	O tipo IX é encontrado junto com o tipo II em cartilagens, vítreo e córnea; XII junto com o tipo I na derme e nos tendões; os demais são encontrados em derme, rim, membranas basais, córnea e junções teciduais.	São moléculas curtas que se ligam a outros colágenos fibrilares juntamente com outros componentes da MEC para auxiliar na regulação da fibrilogênese e funcionalidades dos colágenos

Tabela 1 – Tipos de colágenos, suas localizações e funções (conclusão)

Tipos de colágeno	Localização	Função
XIII, VXII, XXIII e XXV (associados a membrana com tripla hélice interrompida)	Junções neuromusculares, pele, células endoteliais, hemidesmosmosos do epitélio, retina, cérebro e coração	Operando como receptores celulares e exercendo função na motilidade celular e adesão
VI (Fibras de ancoragem)	Junção dermo-epidérmica	Formam fibrilas de ancoragem que atuam interconectando componentes da matriz e entidades estruturais nos tecidos
VII, XXVI e XXVIII (Filamentos frisados)	Ossos, cartilagem, córnea, derme, músculo	-
XV e XVIII (de multiplexia)	Encontrados nas membranas basais vasculares e epiteliais	Contendo endostatina antiangiogênica, capazes de interagir com fatores de crescimento e citocinas e estão envolvidos na conexão das membranas basais com o tecido conjuntivo

Elastina

A elastina também faz parte da composição da MEC, e está presente em tecidos que sofrem especificamente alongamentos contínuos, como os pulmões, vasos sanguíneos, pele, tecidos elásticos, cartilagens e ligamentos (Frantz et al., 2010; Halper, 2021; Kristensen and Karsdal, 2016). A elastina é formada a partir da combinação de tropoelastina com seus resíduos de lisina, modificados por proteinases para assim formar as fibras elásticas maduras. Sua deposição e alinhamento é feita em forma de andaime microfibrilar composto por diferentes proteínas de matriz (Grosso, 1996; Kristensen and Karsdal, 2016; Theocharis et al., 2019). A distribuição da elastina depende da atividade de reticulação da mesma. Seus fragmentos não são apenas consequência de destruição do tecido, mas podem ser importantes marcadores patológicos de sinalização e podem estimular a resposta imune local (Kristensen and Karsdal, 2016).

A elastina é encontrada em maiores quantidades nas neoplasias mais densamente celulares e com menos diferenciação mixocondróide. Em muitos tumores, a elastina está intimamente associada às células tumorais em vez de estar ligada à cápsula de tecido fibroso ou aos vasos sanguíneos do tumor, sugerindo que a elastina pode ser produzida pelas próprias células neoplásicas (Grosso, 1996).

Laminina

As lamininas são componentes da membrana basal formadas por heterotrímeros. Ao se auto associarem, criam uma rede na membrana basal que interage com a rede de colágeno através de moléculas de ligação, favorecendo a fixação da membrana basal ao estroma subjacente (G. K. Rasmussen and Karsdal, 2016). Além disso, também interagem com células epiteliais de receptores de superfície celular regulando a diferenciação, adesão e migração (Theocharis et al., 2019). As lamininas dos tipos -5, -6 e -7 estão presentes principalmente nos tecidos epiteliais, incluindo cavidade oral e tecidos glandulares (G. K. Rasmussen and Karsdal, 2016).

Integrina

Integrinas são moléculas transmembrana heterodiméricas compostas por subunidades α e β . A família $\beta 1$ desempenha um papel crucial na adesão de células epiteliais, ligando-se principalmente a componentes da MEC, como colágeno, laminina e fibronectina (Lourenço et al., 2004; Sunardhi-Widyaputra and Van Damme, 1994).

A expressão das integrinas está associada a mecanismos biológicos dinâmicos, como a manutenção de contatos entre células, sinalização celular e regulação da expressão gênica, que influenciam migração, proliferação e diferenciação em processos normais e neoplásicos (Lourenço et al., 2004; Sunardhi-Widyaputra and Van Damme, 1994).

Fibronectina

A fibronectina é uma glicoproteína que faz parte da MEC formando fibrilas, um importante componente estrutural (Halper, 2021). Em sua síntese, ela é secretada como um dímero conectado por duas ligações dissulfeto C-terminais e possui diversos locais de ligação. A ligação do dímero solúvel de fibronectina à superfície celular é importante para sua montagem em fibrilas mais longas (Frantz et al., 2010). A fibronectina interage com glicosaminoglicanos (GAG) e receptores de superfície celular, com função de ligar moléculas, organizar a estruturalmente a matriz e mediar as interações entre as células e a matriz (Halper, 2021; Schöler et al., 2022; Theocharis et al., 2019).

A fibronectina pode se estender sob forças de tração celular, expondo locais de ligação à integrina que influenciam o comportamento celular e a regulação mecânica extracelular. Especificamente, a forma estirada da fibronectina modula a ativação da ligação e montagem de um tipo de integrina que interfere na migração celular e implicando-a em doenças cardiovasculares e metástases tumorais. Além disso, outras proteínas da MEC, como a tenascina, também exercem efeitos pleiotróficos na migração celular e na interação com a fibronectina, influenciando o crescimento tumoral e metástase (Frantz et al., 2010).

Proteínas matricelulares

As proteínas matricelulares são um grupo de proteínas não estruturais que interagem com outros componentes da matriz como fatores de crescimento e receptores de superfície celular, atuando como importantes reguladores da comunicação entre as células e a MEC. Algumas proteínas matricelulares são tromboespondinas, tenascinas, fibulinas, osteopontina, proteínas de matriz oligomérica da cartilagem, proteínas da família CNN, periostina e R-espondinas (Karamanos et al., 2021; Theocharis et al., 2019).

Raitz e colaboradores (2003) em um estudo, verificaram que a tenascina exibe uma presença notável durante o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e o processo de crescimento tumoral. A expressão da tenascina apresenta correlação com a proliferação celular, a migração celular, o crescimento e a remodelação da MEC, bem como a padronização durante o desenvolvimento normal (Raitz et al., 2003).

Tenascinas

A tenascina é uma glicoproteína de alta massa molecular que se encontra na MEC na interface entre tecidos epiteliais e mesenquimais (Shintani et al., 1997; Shrestha et al., 1994). Sua expressão está associada a processos biológicos, como cicatrização de feridas, desenvolvimento embrionário e progressão tumoral. Sugere-se que essa proteína tenha influência na adesão celular, migração e proliferação, delimitação de fronteiras entre tecidos, hemaglutinação, estímulo do crescimento celular e definição de rotas para a migração de células da crista neural durante o desenvolvimento fetal (Shrestha et al., 1994).

A tenascina produzida pelas células tumorais pode ser liberada no espaço extracelular, enfraquecendo as aderências entre as células e as proteínas adesivas da MEC, como a fibronectina. Isso aumenta a mobilidade das células tumorais e facilitando a invasão de tecidos (Shintani et al., 1997).

Proteoglicanos

Outros importantes componentes da MEC são os PG, compostos por moléculas de GAG que permitem várias combinações que resultam em diferentes PG, que por sua vez apresentam características e funções distintas (Karamanos et al., 2021; Shi et al., 2009; Theocharis et al., 2019).

Os PG interagem com fatores de crescimento, citocinas e receptores de superfície celular, atuando também na organização, sinalização, fenótipos de propriedades da matriz (Shi et al., 2009). As cadeias de GAG ligadas às proteínas centrais desempenham um papel fundamental nesses processos, pois carregam diferentes citocinas e ligantes. Portanto, as propriedades

biológicas e as funções dos PG estão estreitamente relacionadas à produção das cadeias de GAG (Shi et al., 2009). Essas moléculas estão presente em todas as MEC e são classificados de acordo com sua localização e características genéticas, estruturais e funcionais (Karamanos et al., 2021; Theocharis et al., 2019).

Hialuronano

O hialuronano é bem distribuído através dos tecidos em grandes agregados para garantir resiliência. Ainda, atuam regulando funções celulares e processos biológicos interagindo com receptores de superfície celular (Theocharis et al., 2019).

2.2.2. MEC no microambiente tumoral

O câncer é uma doença caracterizada por transformação celular e perda da organização tecidual. O microambiente tumoral (MAT) trata-se do ambiente que circunda e interage com as células tumorais dentro de um tumor, incluindo uma variedade de componentes celulares e não celulares que desempenham funções distintas na progressão do câncer. Além de microrganismos e leucócitos, os componentes celulares do microambiente incluem fibroblastos, vasculatura composta por pericitos e células endoteliais, nervos estromais formados por células neuronais e adipócitos (Atiakshin et al., 2020).

O estroma do tumor desempenha um papel interessante no que diz respeito a carcinogênese. Para que o tumor possa crescer além de 2 mm, existe a necessidade de a presença do estroma que fornece nutrição pelo suprimento vascular e limita o influxo de células inflamatórias, sendo uma barreira para rejeição imunológica (Devendra et al., 2018)

O componente não celular do MAT é a MEC. Nesse cenário, a remodelação da MEC que surge através de mutações genéticas e alterações epigenéticas pode levar à tumorigênese. A remodelação da MEC no estroma do tumor leva a características semelhantes ao estroma de uma ferida não cicatrizada: uma matriz rígida, com presença de mediadores inflamatórios como fatores de crescimento, citocinas e enzimas de degradação de matriz (de Andrade Natal et al., 2021; Frantz et al., 2010; Glabman et al., 2022; Malik et al., 2015; Theocharis et al., 2016). As células tumorais e inflamatórias secretam os fatores de crescimento que ativam os fibroblastos residentes, que se diferenciam em fibroblastos associados ao câncer (CAF), com um fenótipo semelhante ao dos miofibroblastos, com características contráteis (Glabman et al., 2022; Malik et al., 2015).

Os CAFs são os principais responsáveis pela remodelação da MEC. Em conjunto com as células tumorais, secretam enzimas que degradam a MEC, prejudicando a membrana basal. Isso permite que células tumorais migrem e invadam o estroma subjacente, penetrando a matriz

intersticial ou sendo arrastada para fora da massa tumoral. Durante esse processo, se estabelece contatos heterotípicos com células tumorais via N- e E-caderinas (de Andrade Natal et al., 2021; Cannone et al., 2022; Theocharis et al., 2016; Wu et al., 2022). As enzimas que degradam a MEC liberam fatores de crescimento endotelial vascular, que permite aumentar o crescimento, invasão e neovascularização das células tumorais (Frantz et al., 2010). Os CAFs também secretam fibronectinas que tem papel essencial na fibrilogênese do colágeno I, e na regulação do fenótipo dos fibroblastos contráteis. Ao fim da maturação da MEC, a proporção entre fibronectina e colágeno I diminui pelo aumento na deposição de colágeno. Dessa forma, a rede de fibronectina relaxa, e os colágenos se agrupam e tornam a matriz rígida (Cannone et al., 2022; Theocharis et al., 2016; Wu et al., 2022).

O microambiente com as células tumorais apresenta níveis de fibronectina inferiores aos níveis encontrados em tecido de reparo, favorecendo a invasão celular (Halper, 2021). Outro componente que altera a proporção colágena são alguns tipos de MMPs, através da degradação da MEC e formação de novos espaços onde os componentes colágenos são substituídos por lamininas (Aleman et al., 2023). Em tumores de glândulas salivares, os MMP-2, quando superexpressos, estão relacionados a comportamentos mais agressivos (Huang et al., 2021). Já as lamininas e fibronectinas parecem ser responsáveis pela proliferação, migração e invasão celular, além do papel nas metástases. Já as tenascinas, podem estar envolvidas na iniciação e progressão de tumores de glândula salivar, câncer de cabeça e pescoço e mama (Araújo et al., 2009; Kinoshita et al., 2021; Raitz et al., 2003). Resultados semelhantes são notados em colágenos associados ao tumor (CAT), onde há aumento de colágeno I ao passo que aumenta a proliferação, adesão, invasão e migração de células cancerígenas (Malik et al., 2015; Theocharis et al., 2016).

Portanto, há um ciclo vicioso de feedback positivo entre o endurecimento da MEC associado ao tumor, a resistência recíproca da MEC induzida pelas células tumorais e a contratilidade mioepitelial, que atuam como um impulsionador do crescimento e sobrevivência do tumor. Esse processo induz a angiogênese, a invasão e, eventualmente, a metástase (de Andrade Natal et al., 2021; Devendra et al., 2018; Frantz et al., 2010).

2.2.3. Matriz extracelular em tumores de glândulas salivares

Adenoma Pleomórfico

O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia de glândula salivar mais comum, sendo definido como um tumor benigno com características arquiteturais e histopatológicas variáveis (Pérez-de-Oliveira et al., 2019). A maioria dos casos ocorre nas glândulas parótidas, enquanto o

restante dos casos geralmente acometerem glândulas salivares menores e glândula submandibular (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). O AP pode acometer pacientes de qualquer idade, porém apresenta um pico de incidência entre a terceira e a sexta década de vida (Pérez-de-Oliveira et al., 2019; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023), com predileção pelo sexo feminino (Fonseca et al., 2012; Ito FA, Jorge J, Vargas PA, 2009; Wang et al., 2015). Clinicamente, o AP se manifesta, como um nódulo mucoso ou subcutâneo de consistência variando de fibroelástica à firme (Alves et al., 2018; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023) de crescimento lento e progressivo e indolor, com tempo de evolução variando de meses a anos (Rout and Lath, 2013).

Histopatologicamente, o AP é caracterizado por exibir uma variação de padrões epiteliais e mesenquimais, além da presença de secreção e diversos tipos de diferenciação e metaplasias. A bipopulação celular é uma característica típica, porém não exclusiva do AP (Alves et al., 2018; Triantafyllou et al., 2015). As células luminais se estabelecem em diversos padrões, sendo o padrão ductal o mais frequentemente observado (Pérez-de-Oliveira et al., 2019) enquanto as células mioepiteliais perfazem grande parte do parênquima tumoral (Pérez-de-Oliveira et al., 2019; Triantafyllou et al., 2015). Geralmente as células tumorais se dispõem em um estroma mixoide, hialino e/ou condroide, sendo o último especialmente sugestivo do tumor (Ito FA, Jorge J, Vargas PA, 2009; Triantafyllou et al., 2015).

Do ponto de vista da MEC, a laminina e o colágeno IV apresentaram imunorreatividade positiva na periferia de estruturas tubulares e em torno de aglomerados de células sólidas, ocasionalmente manifestando-se ora como uma camada contínua ora descontínua, com espessamento focal em algumas regiões (Félix et al., 1999; Raitz et al., 2003). Nas células luminais neoplásicas, as integrinas $\alpha 2$ e $\alpha 5$ apresentaram forte coloração positiva, principalmente na região luminal, com um padrão de expressão bipolar. Nas células mioepiteliais neoplásicas, a integrina $\alpha 2$ apresenta uma positividade discreta nas junções intercelulares, enquanto a subunidade $\alpha 5$ foi negativa. As células luminais dos ductos neoplásicos expressaram amplamente a integrina $\beta A1$, formando pontos ou discos na região luminal (Lourenço et al., 2004).

A tenascina parece compor, principalmente as áreas condroides, estromais fibrosas, ninhos parenquimatosos (Bento et al., 2006; Shrestha et al., 1994), e estroma hialino (Raitz et al., 2003; Shrestha et al., 1994). A fibronectina também está presente no estroma fibroso e condroide ao redor de ninhos celulares na membrana basal e capsula fibrosa (Bento et al., 2006; Raitz et al., 2003; Shrestha et al., 1994).

Estudos têm registrado a presença frequente e a quantidade significativa de elastina na matriz extracelular dos AP. Análises histoquímicas e ultraestruturais revelaram a presença tanto de elastina quanto de fibras elásticas nessa matriz (Grosso, 1996). Hialuronano foi encontrado no estroma mixoide, condroide, hialinizado e fibroso dessa lesão. O agrecano por sua vez foi observado em áreas mixoides e condroides (Kuwabara et al., 2016).

O padrão ouro para o tratamento do AP é a excisão cirúrgica sendo o tipo de cirurgia escolhido de acordo com a glândula afetada, tamanho do tumor e histórico de recidiva (Abu-Ghanem et al., 2016; Dombrowski et al., 2019). Em uma porção limitada dos casos, o AP pode sofrer transformação maligna para carcinoma ex-AP (CXAP) (de Angelis et al., 2021; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023).

Mioepitelioma

O mioepitelioma (ME) é um tumor benigno de glândulas salivares de composição quase exclusiva por células mioepiteliais (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Clinicamente, o ME se apresenta como uma massa irregular, bem circunscrita, indolor, de crescimento lento e longo tempo de evolução (Mireles et al., 2021; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023) sem predileção de sexo com um pico na terceira década de vida. A glândula parótida é a mais acometida pelo tumor, enquanto o palato duro é a localização de maior incidência nas glândulas salivares menores (Mireles et al., 2021; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023; Young and Okuyemi, 2022).

Microscopicamente, células mioepiteliais fusiformes, plasmocitoide, hialinas, epitelioides ou claras e se dispõem em um padrão de crescimento sólido, trabecular ou mixoide, rodeadas por uma matriz mixoide ou hialina (Mireles et al., 2021). Ductos e espaços microcísticos intercelulares ocasionalmente podem estar presentes (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Uma variante do ME segue o padrão reticular, caracterizado por arranjos em forma de rede de cordões celulares interconectados. O ME apresenta um padrão diverso de expressão de componentes da MEC. Um estudo mostrou a laminina, o colágeno tipo IV, a fibronectina e a tenascina foram positivos em torno de grandes aglomerados de células. No estroma, observou-se intensa coloração em teia para colágeno tipo IV, geralmente acompanhando os vasos sanguíneos (Raitz et al., 2003).

De acordo com o subtipo histológico, alguns componentes modificavam sua expressão, sendo: No subtipo sólido, observou-se reatividade positiva de laminina, colágeno tipo IV, fibronectina e tenascina nas proximidades dos aglomerados de células. No subtipo trabecular, foi evidenciado que os componentes anteriores delinearam as trabéculas, sendo o colágeno tipo IV

o mais proeminente formando uma linha reticular que separava os cordões epiteliais do estroma adjacente, o qual era hipocelular. Essa linha reticular se intensificava notavelmente ao redor das estruturas tubulares, adquirindo uma morfologia condensada. Quanto ao subtipo tubular, foi possível constatar a presença de laminina, colágeno tipo IV, fibronectina ao redor das estruturas tubulares (Raitz et al., 2003).

O tratamento do ME é excisão cirúrgica completa. O prognóstico da lesão é excelente, enquanto a transformação maligna é rara (Mireles et al., 2021; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023).

Carcinoma Adenoide Cístico

O carcinoma adenoide cístico (CAC) faz parte do grupo de neoplasias malignas de glândulas salivares caracterizado pela presença de células epiteliais e mioepiteliais que se arranjam em padrões tubulares, cribriformes e sólidos (Mireles et al., 2021; Tchekmedyian, 2021; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). O CAC acomete principalmente pacientes nas quinta e sexta décadas de vida (Young and Okuyemi, 2022), apresenta leve predileção pelo sexo feminino (Atallah et al., 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Essa lesão ocorre com mais frequência nas glândulas salivares maiores, com predileção pela glândula parótida (Tan et al., 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Clinicamente, o CAC se apresenta como uma massa de crescimento lento geralmente associado a dormência, parestesia ou dor na região acometida (Atallah et al., 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023; Young and Okuyemi, 2022).

Histopatologicamente o CAC se manifesta como uma massa não encapsulada com componentes ductais e mioepiteliais com três padrões: tubular, cribriforme e sólido. A forma mais comum é o padrão cribriforme, composto por pseudocistos cilíndricos revestidos por células epiteliais envoltos por material hialino. O padrão tubular apresenta bicamadas tubulares com luz verdadeira com células tumorais de citoplasma escasso, núcleos pequenos, angulados e hipercromáticos. O padrão sólido tem camadas de células sem formação de lúmen e pode apresentar elementos epiteliais e mioepiteliais. Há presença de invasão perineural e áreas centrais de necrose quando o tumor tem apresentação mais agressiva (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023; Young and Okuyemi, 2022).

A MEC desempenha um papel importante na criação do microambiente tumoral essencial para o crescimento e a disseminação de metástases no CAC, e foi levantada a possibilidade de que os PG são consideráveis componentes para essa função (Shi et al., 2009).

Integrinas subA foram encontradas na membrana das células luminiais e concentraram-se principalmente no polo apical, formando aglomerados. Por outro lado, nas células mioepiteliais, apenas a integrina $\alpha 2$ mostrou positividade discreta nas junções intercelulares, enquanto a $\alpha 3$ apresentou um padrão de expressão em forma de disco na mesma região. A $\alpha 5$ teve uma positividade fraca, principalmente na porção basolateral, e a integrina $\beta A1$ foi expressa como pontos discretos nas junções intercelulares. As células neoplásicas ao redor de espaços pseudocísticos em sua maioria não apresentaram positividade para integrinas ou exibiram coloração fraca, limitada aos contatos basolaterais de algumas células mioepiteliais (Lourenço et al., 2004).

Em seu subtipo tubular, o CAC expressa laminina, colágeno IV e fibronectina. No CAC cribriforme também foi observada a expressão de lamininas, fibronectina e colágeno IV. O subtipo sólido apresentou todos os marcadores dos subtipos anteriores, com acréscimo da tenascina que apresentou expressão intensa (Raitz et al., 2003). Tenascina apresentou diferentes expressões nos subtipos tumorais de acordo com os estudos, ora sendo positiva nos padrões cribriforme e tubular, ora não apresentando imunorreatividade (Shrestha et al., 1994). O hialuronano foi encontrado de forma fraca ou moderada no estroma e no espaço pseudocístico, o agrecano estava ausente (Kuwabara et al., 2016).

Shintani et al (1997) observaram um aumento da expressão de laminina, colágeno IV e fibronectina na região do CAC. Outro estudo mostrou que a relação da presença da laminina-111 para elevar a produção de colágeno I e tenascina nas células de CAC *in vitro* em comparação com o grupo controle. Esses resultados foram corroborados por meio de imunotransferência, indicando outro importante componente responsável pela arquitetura da MEC. A laminina parece desencadear, em um estágio inicial, a liberação de MMP pelas células do CAC. Essa degradação da MEC ao redor das células é um passo inicial na formação de espaços pseudocísticos. Posteriormente, após a criação dos pseudocistos, a laminina pode estimular as células CAC a secretar proteínas da matriz extracelular para preencher esses espaços pseudocísticos (Jaeger et al., 2008).

O tratamento do CAC é feito com cirurgia de excisão radical na região acometida, com ou sem radiação pós-operatória (Atallah et al., 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Os tumores sólidos geralmente apresentam um curso clínico mais agressivo que do que aqueles cribriformes e tubulares (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). O prognóstico da doença apresenta uma sobrevida alta em 10 anos (50-70%), entretanto, a taxa de recorrência local é variável e a metástases a distância são frequentes, o que pode tornar o prognóstico a longo prazo reservado (Tan et al., 2022; Tchekmedyian, 2021).

Carcinoma Mioepitelial

O carcinoma mioepitelial (CM) é uma neoplasia maligna, geralmente de baixo grau, composta por células mioepiteliais com crescimento infiltrativo. CM são bastante incomuns, e acometem pacientes em qualquer faixa etária, mas com pico de incidência na sexta década de vida (Giridhar et al., 2019; Wang et al., 2015; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023; Xiao et al., 2016), e uma leve predileção pelo sexo feminino (Ali et al., 2020; Giridhar et al., 2019; Wang et al., 2015). As localizações mais comuns são a glândula parótida, seguido de palato e glândula submandibular (Giridhar et al., 2019; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023; Xiao et al., 2016).

Esses tumores podem ser classificados em subtipos de acordo com o fenótipo de células mais predominantes, como: fusiformes, plasmocitoides, epitelioides, células claras e células mistas (Ali et al., 2020; Wang et al., 2015). As células malignas geralmente se organizam em nódulos desorganizados de bordas infiltrativas. As células tumorais podem ainda formar padrões sólidos, trabeculares e reticulares (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). O CM é um tumor raro, e frequentemente não é alvo de pesquisa na literatura. Dessa forma, as informações a respeito da composição da MEC do CM são limitadas.

A ressecção cirúrgica com margens livres é o tratamento de escolha, porém, ainda não há evidências sólidas a respeito da resposta do CM a terapias adjuvantes (Ali et al., 2020; Giridhar et al., 2019; Luo, 2022). O prognóstico dessa lesão está associado a diferentes desfechos clínicos, porém, aproximadamente um terço dos pacientes são curados (Giridhar et al., 2019; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023).

Carcinoma Epitelial-mioepitelial

O carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM) faz parte do grupo de tumores malignos de glândulas salivares, geralmente de baixo-grau, caracterizado por um arranjo bifásico de células ductais luminiais internas e mioepiteliais externas (Gore, 2018; Vázquez et al., 2015; Wang et al., 2020; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Geralmente, o CEM possui uma predileção pelo sexo feminino e em pacientes na sexta e sétimas décadas de vida, acometendo principalmente as glândulas parótidas (Gore, 2018; Okuyama et al., 2021; Vázquez et al., 2015; Wang et al., 2020; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023) e submandibular, mas podem ocorrer em palato e a cavidade sinonasal (Arora et al., 2013; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023).

Histopatologicamente, o CEM exhibe um padrão multinodular com arranjo bifásico ou em dupla camada, com uma camada periférica de células mioepiteliais de citoplasma claro envolvendo

uma camada epitelial que se assemelha a ductos intercalados (Okuyama et al., 2021; Vázquez et al., 2015; Wang et al., 2020; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Pode ainda ser observado locais crescimento sólido, áreas de necrose, invasão perineural e vascular, e transformação de alto grau (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023).

O carcinoma epitelial-mioepitelial foi testado para a tenascina e demonstrou reatividade imunológica ao redor das ilhas de células tumorais e nos septos de tecido conjuntivo, além do lúmen das estruturas parecidas com ductos formadas dentro das ilhas de células tumorais também apresentar positividade (Shrestha et al., 1994). O tratamento é a ressecção cirúrgica, em alguns casos pode ser feita a radioterapia, apesar do uso de terapia adjuvante no CEM ser um tópico discutível. Esses tumores podem apresentar recorrência local com frequência, mas a metástase a distância é rara. (Okuyama et al., 2021; Vázquez et al., 2015).

Carcinoma de Ducto Salivar

O Carcinoma de Ducto Salivar (CDS) é uma neoplasia maligna agressiva que pode ser uma lesão primária ou pode se apresentar como a transformação maligna de um AP. O CDS acomete normalmente homens, idosos, com pico de incidência entre as sexta e sétima décadas de vida com uma predileção pela glândula parótida (Giridhar et al., 2022; Kohsaka et al., 2022; Kusafuka et al., 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Geralmente, o CDS é um tumor de crescimento rápido com frequente combinação de paralisia facial, dor e linfadenopatia cervical. Quando se origina de outras lesões, o crescimento tumoral está associado a uma massa já existente (Giridhar et al., 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023),

Histopatologicamente, o tumor apresenta grandes ductos com comedonecrose e características de pontes cribriformes. Comumente é observada invasão linfovascular e perineural.. As células são caracterizadas por citoplasma abundante e núcleos grandes e pleomórficos e nucléolos proeminentes, são células apócrinas e oncocitoides, também pode-se observar figuras mitóticas. São encontradas variadas apresentações histológicas como a sarcomatoide, micropapilar invasivo, rico em mucina e carcinomas oncocíticos. O tumor pode apresentar positividade para receptor de andrógeno em muitos casos (tanto em homens quanto em mulheres). O receptor de estrogênio e o receptor de progesterona são negativos (Alsanie et al., 2022; Delaine et al., 2023; Kusafuka et al., 2022; Wakely, 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023).

Poucos estudos descreveram os componentes da MEC no CDS. Kuwabara e colaboradores (2016) apontaram presença de hialuronano de forma difusa no estroma, enquanto o agrecano estava ausente (Kuwabara et al., 2016).

Por ser um tumor agressivo tem uma alta taxa de mortalidade em cinco anos (Kusafuka et al., 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). O tratamento é cirúrgico na maioria dos casos, até mesmo nas situações de metástase, com radioterapia adjuvante (Giridhar et al., 2022; Kohsaka et al., 2022). Em muitos casos, mesmo após o tratamento pode ocorrer metástase a distância (Kohsaka et al., 2022).

2.3. COLORAÇÕES ESPECIAIS

A técnica histoquímica de colorações especiais é um método eficaz para avaliar os componentes da MEC e visualizar elementos específicos dos tecidos que não são facilmente identificáveis com técnicas convencionais de coloração. Essas técnicas baseiam-se em diferentes abordagens, como a afinidade específica por componentes celulares, reações químicas que produzem coloração visível, e reações enzimáticas para localizar enzimas específicas ou seus substratos nos tecidos. Com isso, é possível obter uma visualização detalhada dos componentes teciduais, o que auxilia tanto no diagnóstico de doenças quanto no estudo da composição estrutural dos tecidos (Wick, 2012)

Dentre as técnicas utilizadas para visualizar componentes da MEC, a coloração de Verhoeff (VHF) é um excelente método para a visualização da elastina e colágeno. Entretanto, é uma técnica complexa em sua preparação, exigindo experiência do profissional responsável pela execução (Horobin, 2013). Neste sentido, pode-se lançar mão da coloração de Weigert-Van Gieson (WVG), uma técnica mais simples e também efetiva para a visualização destas fibras (Bancroft and Layton, 2013).

Alcian Blue (ALB) e Azul de Toluidina (ATO) são colorações especiais utilizadas para destacar PG e GAG. A coloração com ALB é efetuada em pH baixo, onde a repulsão de carga pelas proteínas, combinada com a considerável massa do corante, permite seletividade para marcação (Prentø, 2009; Schumacher and Adam, 1994; Scott, 1972; Tas, 1977). O ATO é um corante catiônico da família das tiazinas. Ele revela basofilia em substratos que possuem radicais aniônicos disponíveis. Soluções aquosas de ATO apresentam absorção máxima na faixa de 632-625 nm, com mudança para 546 nm e tonalidade violeta com aumento da concentração (hipocromismo), devido à metacromasia induzida pela proximidade e associação das moléculas de corante em dímeros ou polímeros (Vidal and Mello, 2019).

O colágeno apresenta naturalmente birrefringência, que é atribuída ao arranjo de suas fibras, e é realçada por coloração, como WVG, VHF, Tricromio Masson (TMA) e Picrosirius Red (PCR). A coloração PCR é considerada uma coloração altamente específica e seletiva para fibras de colágeno devido à sua capacidade de diferenciar entre diferentes tipos de fibras de

colágeno em várias condições patológicas, sendo considerada o padrão ouro para a observação dessas estruturas (Devendra et al., 2018; Lattouf et al., 2014).

A coloração de Reticulina (RET) é utilizada para a observação de fibras reticulínicas, compostas por uma mistura de colágeno tipo III e PG. Em uma de suas etapas a impregnação por sais de prata é realizada. A argirofilia das fibras reticulares é devida ao conteúdo de PG presentes nesse material interfibrilar. O colágeno tipo III tem como função fornecer suporte limitado, mas permitindo certa motilidade, facilitando a difusão e a troca de metabólitos (Bancroft and Layton, 2013; Puchtler and Waldrop, 1978).

2.4. GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO

A microscopia óptica não linear (Nonlinear Optics Microscopy - NLOM), tal como Geração de Segundo Harmônica (GSH), são técnicas minimamente invasivas e não destrutivas que permitem a obtenção de imagens com resolução subcelular de tecidos biológicos em suas condições naturais, sem a necessidade de marcadores (Adur et al., 2016). Esses fenômenos ópticos baseiam-se na interação simultânea de dois fótons com a matéria, sendo viabilizados pelo desenvolvimento de lasers de pulsados de femtosegundo e picosegundo.

A técnica GSH, utilizada neste estudo, é um processo óptico coerente que ocorre quando dois fótons na faixa do infravermelho próximo interagem com estruturas sem simetria de inversão, gerando um fóton com metade do comprimento de onda da excitação, ou seja, com dobro da frequência (Campagnola et al., 2002). Devido a esse fenômeno, a intensidade GSH é proporcional ao quadrado da intensidade do feixe de laser de excitação, conferindo à técnica uma característica intrinsicamente confocal, com o sinal sendo gerado exclusivamente no foco do laser (Zipfel et al., 2003). Além disso, a excitação com luz no infravermelho próximo minimiza o fotodano e o photobleaching, além de aumentar a profundidade de penetração em tecidos biológicos espalhadores e absorvedores (Mazumder et al., 2019).

A microscopia GSH proporciona imagens de maneira seletiva e específica de fibras de colágeno tipo I e II, miosina e microtúbulos (Campagnola, 2011; Olivier et al., 2010). As principais aplicações incluem informações com grande potencial no estudo de neoplasia (de Andrade Natal et al., 2021) e fibrose (Strupler et al., 2007). No estudo do câncer, o sinal GSH tem sido usado para descrever a morfologia do colágeno na matriz extracelular em diferentes estágios da invasão de tumores. Em um trabalho realizado por J. Adur e colaboradores usando microscopia GSH foram observadas mudanças significativas na distribuição e organização de fibras de colágeno no componente estromal dos tumores ovarianos serosos, mucinosos, endometrioides e mistos em comparação com o tecido ovariano normal (Adur et al., 2014b).

3. PROPOSIÇÃO

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Descrever componentes da MEC em tumores de glândulas salivares com e sem diferenciação mioepitelial.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar e comparar os componentes de MEC por meio de coloração especial e geração de segundo harmônico presentes em AP, ME, CAC, CM, CEM e CDS.

Correlacionar as características da MEC com os achados patológicos das lesões de AP, ME, CAC, CM, CEM e CDS.

Investigar a correlação dos achados patológicos (histoquímica e GSH) em tumores com componente mioepitelial, benignos e malignos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - FCM/UNICAMP (Nº do parecer 6.687.359).

Para a realização deste estudo, foram selecionados casos de tumores de glândulas salivares e fixados em formol e embebidos em parafina, obtidos da área de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia (DAP) da FCM/UNICAMP. Foram selecionados 5 casos de AP, 5 casos de ME, 5 casos de CM, 5 casos de CAC, 5 casos de CEM e 5 casos de CDS sem restrição de ano a partir do arquivo de controle de casos do DAP - FCM/UNICAMP. Todas as 30 amostras foram revisadas e reavaliadas, através de lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) para confirmação do diagnóstico de acordo com a atual classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial de Saúde para classificação de Tumores de glândulas salivares (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023) por dois patologistas. Amostras de pacientes menores de 18 anos e amostras com material insuficiente para confecção de novas lâminas foram excluídas do estudo.

A caracterização clínico-patológica foi realizada através da coleta de informações contidas nos prontuários médicos do Serviço de Arquivo Médico do Hospital de Clínicas da UNICAMP (SAM - HC/UNICAMP) para os pacientes atendidos no HC/UNICAMP, ficha de encaminhamento para os casos de consulta, laudos histopatológicos emitidos pela Anatomia Patológica DP/FCM/UNICAMP e pela avaliação das lâminas coradas em HE. Para caracterização clínica, foram coletados dados demográficos como sexo, idade, localização da lesão, hábitos, sintomatologia, aspecto clínico, tempo de evolução (a partir da descrição do paciente no prontuário), tratamento, presença de recidiva, e situação do paciente no último registro médico.

Para a caracterização patológica foram coletados tamanho do tumor, diagnóstico histopatológico, características histopatológicas, presença de invasão neural ou vascular. Os dados clínicos e microscópicos tabulados e analisados em planilhas do programa Excel (Microsoft Office) por estatística descritiva.

4.2. COLORAÇÕES ESPECIAIS

As amostras previamente selecionadas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% em PBS durante pelo menos 24h a temperatura ambiente. Após este período foi feito seu processamento através de uma sequência de banhos em álcool, xilol e parafina para que, então, o material pudesse ser colocado em moldes para confecção dos blocos em parafina. Após a

separação do material utilizado os blocos foram seccionados em micrótomo (Leica DM2500) com espessura do corte padronizada em 4 µm e colocado sobre lâminas de vidro. Posteriormente os cortes foram fixados em estufa a 60 °C, desparafinizados e hidratados. Foram realizadas as colorações histoquímicas de VHF e WVG para a observação de fibras elásticas e colágeno, TMA e PCR para a observação de colágeno; para fibras reticulínicas (FR) foi realizada a coloração de RET e as colorações de ALB e ATO, para a observação de PG e GAG (Schmitz et al., 2010). As colorações especiais de TMA, PCR e ATO foram realizadas no Instituto de Biologia da Unicamp (IB) e as demais colorações foram realizadas no DAP. Os protocolos e os resultados esperados em cada coloração estão apresentados no material complementar (Apêndice 1). As cores detalhadas dos componentes da MEC em cada coloração especial utilizada visualizada sob microscopia ótica tradicional estão descritas na **Tabela 2** e exemplificadas na **Figura 2** (Bancroft and Layton, 2013; Horobin, 2013).

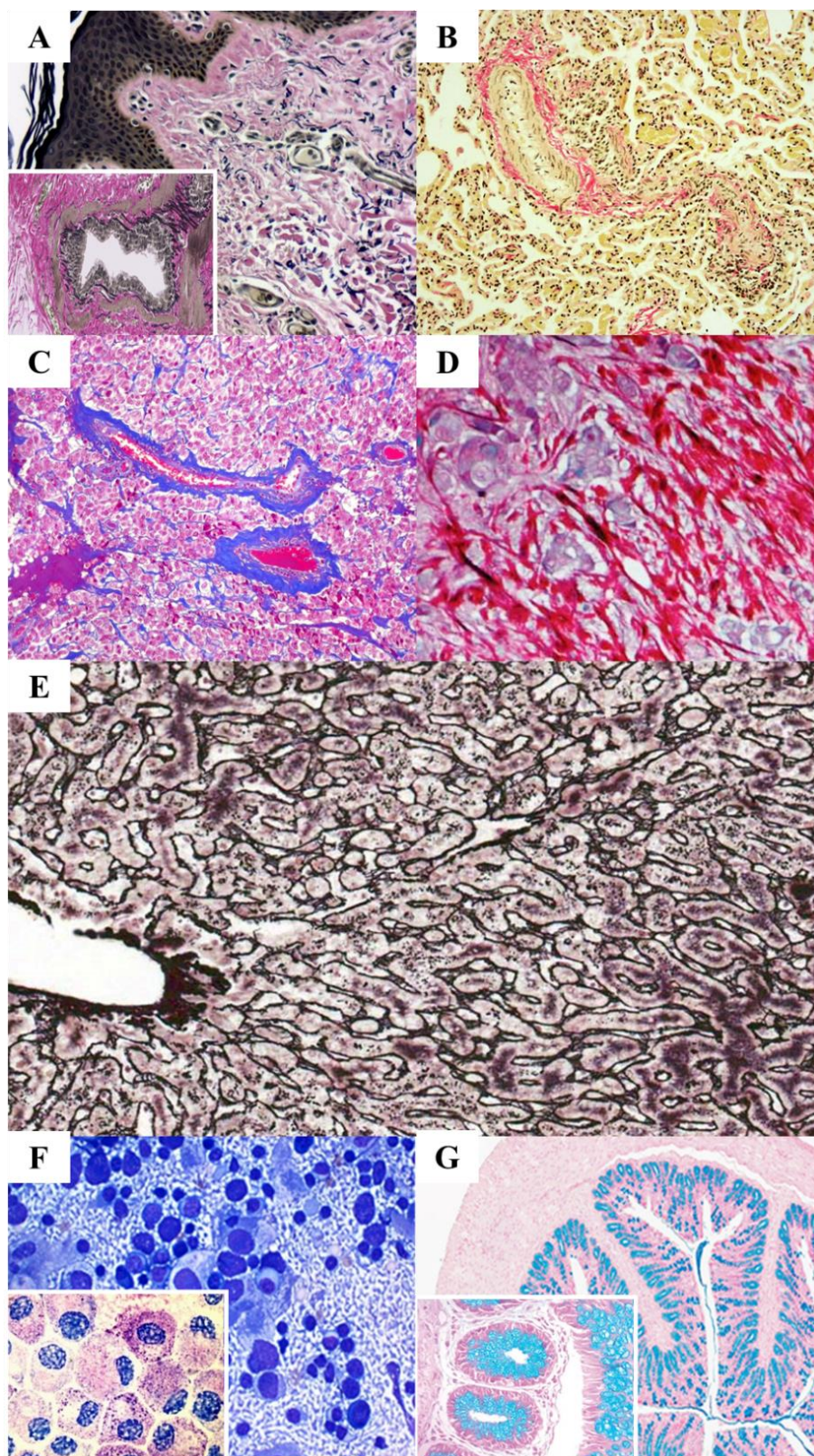
Tabela 2 – Descrição das cores esperadas para os componentes da MEC estudados através das colorações especiais.

Coloração /Componente MEC	Colágenos	Elastina	FR	PTG e GAG
VHF	Roxo avermelhado	Preto azulado	-	-
WVG	Roxo avermelhado	Preto azulado	-	-
TMA	Azul	-	-	-
PCR	Rosa avermelhado	-	-	-
RET	-	-	Preto acastanhado	-
ATO	-	-	-	Roxo
ALB	-	-	-	Azul claro

VHF: Verhoeff; WVG: Weigert-Van Gieson; TMA: Tricromio Masson; PCR: Picrossirius Red; RET: Reticulina; ATO: Azul de Toluidina e ALB: Alcian Blue

As colorações histoquímicas foram categorizadas para cada amostra de acordo com a quantidade da área intratumoral positivas para elas. A quantidade de expressão foi classificada da seguinte forma: nenhuma expressão detectada (0), expressão de 1-10% (+), expressão de 11-50% (++), e expressão superior a 50% (+++). A classificação foi realizada por 2 avaliadores de forma subjetiva de acordo com a exploração das lâminas. Os cortes foram visualizados e fotografados em microscópio óptico (Leica DM2500) com câmera digital acoplada e analisados em software específico (Leica Application Suite LAS Version 4.6.2).

Figura 2 – Colorações especiais – controle



A: Verhoeff; B: Weigert-Van Gieson; C: Tricomio Masson; D: Picrosirius Red; E: Reticulina; F: Azul de Toluidina; G: Alcian Blue. Fotos cedidas pelo Departamento de Patologia.

4.3. GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO

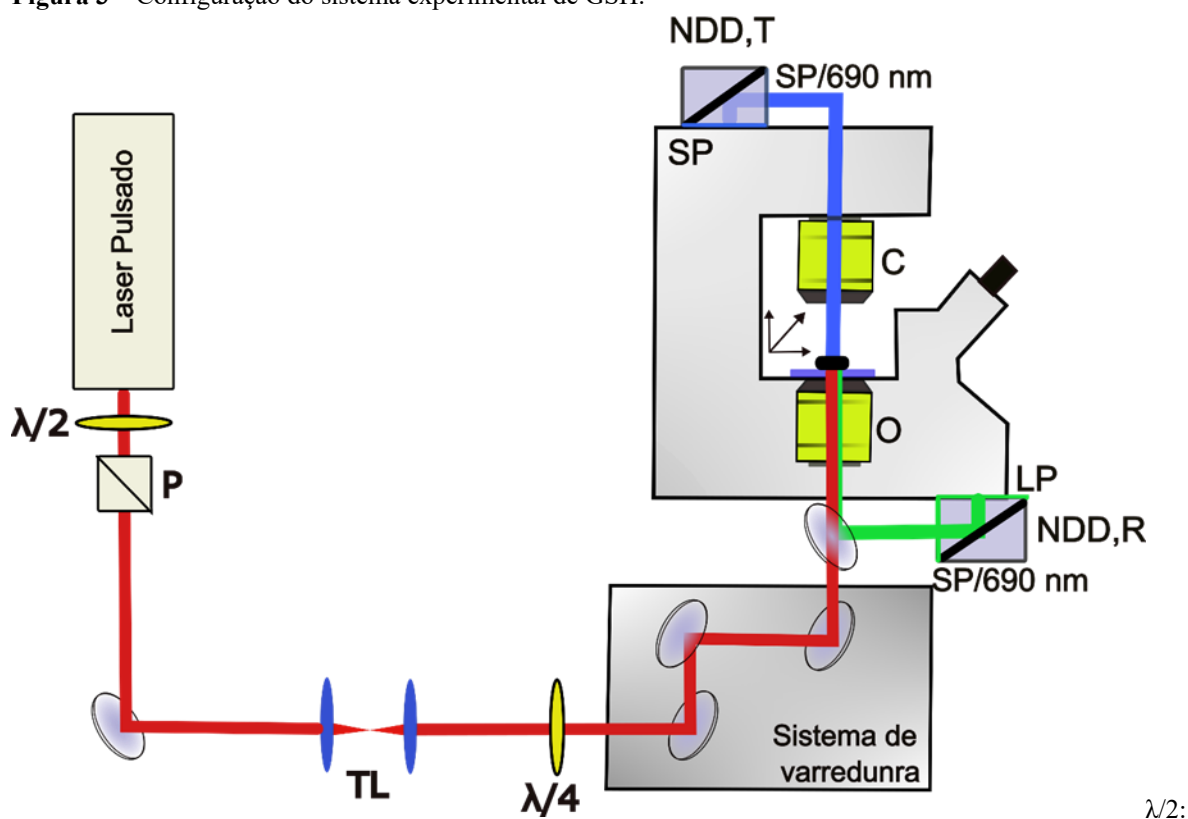
4.3.1. Aquisição das imagens do segundo harmônico

As imagens de fibras de colágeno e autofluorescência foram adquiridas utilizando as técnicas de GSH e fluorescência por excitação de dois fótons (Two-Photon Excitation Fluorescence - TPEF), respectivamente, no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC), localizado na Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. A fonte de laser utilizada para excitação do tecido biológico é um oscilador paramétrico óptico comercial, bombeado por um laser de fibra de femtosegundo (Chameleon Discovery NX, Coherent Inc., Santa Clara, Califórnia), emitindo pulsos com largura temporal de 100 fs, taxa de repetição de 80 MHz, comprimento de onda de excitação de 940 nm e potência média na amostra de 20 mW.

As imagens de GSH e TPEF foram adquiridas simultaneamente no microscópio confocal LSM 780-NLO Zeiss invertido Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha), utilizando uma objetiva de imersão em óleo EC Plan-Neofluor 40x/1.53 (Figura 1). O sinal de GSH foi coletado no modo transmitido pelo condensador de 0.55 NA-WD 26 mm (Carl Zeiss AG, Alemanha) e adquirido no detector non-descanned (NDD, T), após passar por um cubo de filtro contendo um espelho dicróico LP/490 e um filtro SP/485. O sinal de fluorescência foi obtido no modo refletido pelo detector non-descanned (NDD, R), passando por um cubo de filtro contendo um espelho (Carl Zeiss, 1512-461) e um filtro LP550 nm. Após a excitação do material, o laser foi bloqueado por um filtro SP/690 nm.

A potência do laser foi ajustada com uma placa de meia onda $\lambda/2$ combinado com um polarizador. Adicionalmente, inserimos um telescópio (TL) para adequar o diâmetro do laser com a abertura traseira da objetiva (O). Para eliminar a anisotropia em diferentes direções das fibras de colágeno, utilizamos uma placa de um quarto de onda ($\lambda/4$) para polarização circular (Figura 3).

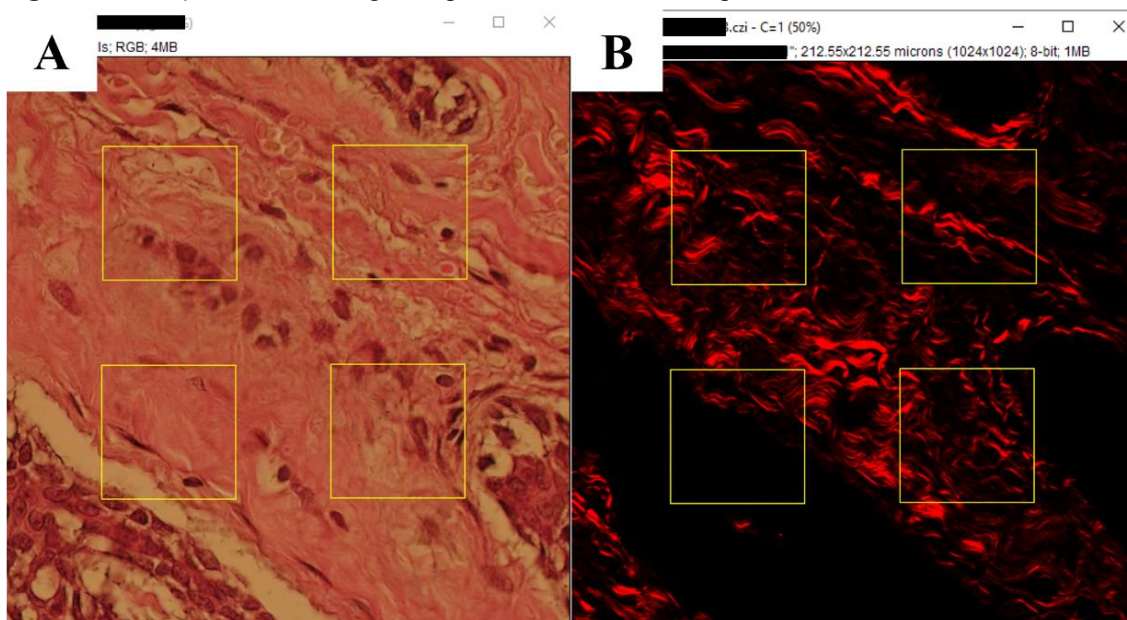
Figura 3 – Configuração do sistema experimental de GSH.



Placa de meia onda, P: Polarizador divisor de feixe de laser; TL: Telescópio, $\lambda/4$: Placa de um quarto de onda, O: Objetiva, C: Condensador, NDD,T: Detector transmitido, NDD,R: Detector refletido.

Em cada caso, foram estudadas três áreas: estroma tumoral (obrigatoriamente em cada caso), estroma extratumoral e cápsula, estes dois últimos capturados de acordo com a disponibilidade de material e presença de regiões representativas. Em cada área foi captado o sinal de GSH de acordo com as áreas escolhidas previamente com representação de colágeno através das lâminas coradas por PCR e TMA em campos de grande aumento (CGAs: x400) de acordo com a disponibilidade de áreas em cada caso. Em cada CGA (HE) foram manualmente selecionadas quatro regiões de interesse (RIs) representativas distintas com dimensão de 50,23 x 50,23 μm (Figura 4). A partir de cada RI foram obtidos fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste.

Figura 4 –. Seleção de RI em imagens captadas através de NLOM por GSH.



Em A (x400), nota-se o estroma intratumoral de um caso de CAC após coloração por HE. Em B, o mesmo CGA é observado mediante NLOM (microscopia ótica não linear) por GSH, sendo visualizadas basicamente fibras colágenas I e II (em vermelho: cor aleatória).

4.3.2. Análise das imagens

A análise das imagens foi realizada através do programa ImageJ. Inicialmente, as imagens de GSH foram transformadas em 256 níveis de cinza (8 bits por pixel). Em imagens transformadas em 256 níveis de cinza a ausência de sinal corresponde ao nível zero e o brilho máximo corresponde ao nível 255. A fração de área corresponde a porcentagem de pixels com valor de nível de cinza diferente de zero na região selecionada. Portanto, uma maior fração de área significa uma maior presença de fibras colágenas emissoras de GSH. O nível de cinza médio corresponde a soma do nível de cinza de todos os pixels da região selecionada dividida pelo número total de pixels dela, sendo o um valor proporcional a espessura das fibras colágenas. Ambas as variáveis foram obtidas diretamente das RIs e equivalem a textura da fibra de colágeno, baseados em análise estatística de primeira ordem.

Entropia e contraste, são descritores de textura baseados em análise estatística de segunda ordem, foram calculados a partir de matrizes de coocorrência de níveis de cinza (gray level co-occurrence matrix – GLCM) derivadas das RIs. A GLCM é uma matriz bidimensional quadrada cujo número de linhas e colunas é igual ao número de níveis de cinza da imagem em questão. Para obtenção desta matriz são considerados dois pixels por vez sendo que cada célula da GLCM indica o número de ocorrências de um par de níveis de cinza i, j em determinada direção (em graus: 0° , 45° , 90° ou 135°) e distância (em pixels: escolha livre) ¹⁰. Após a obtenção da

GLCM em determinada direção (0°, 45°, 90° ou 135°) foi feita a normalização da matriz dividindo-se o valor de cada célula pela fração de área da RI correspondente. A matriz normalizada aproxima as variáveis em uma mesma escala, após a normalização os valores foram multiplicados por 100 para melhorar a apresentação dos dados posteriormente.

Entropia e contraste foram calculados (Figura 5 e Figura 6) a partir das GLCMs obtidas nas quatro direções (0°, 45°, 90° e 135°), com distância de 5 pixels. O descritor de textura final foi obtido pela média aritmética dos descritores de textura previamente calculados nos quatro direcionamentos. Estes descritores de textura de Haralick traduzem para a linguagem matemática a impressão visual gerada pela variação regular ou aleatória dos pixels de uma imagem, ou seja, fornecem informações quantitativas sobre a relação espacial entre os pixels (Adur et al., 2014a)

Figura 5 – Fórmula para o cálculo do descritor de entropia.

$$-\sum_i \sum_j p(i,j) \log(p(i,j))$$

Figura 6 – Fórmula para o cálculo do descritor de contraste.

$$\sum_{i,j=0}^{N-1} (i-j)^2 p(i,j)$$

A entropia expressa a medida da desordem da imagem. Valores elevados de entropia indicam textura não uniforme, ou seja, alto número de transições de níveis de cinza (Laurito, 2019). A entropia está relacionada de modo inverso com o segundo momento angular (energia). Desta forma, a entropia refletiu a complexidade da imagem. Quanto maior a entropia, menos homogênea é a textura da imagem e, portanto, das fibras colágenas. O contraste mede a variação entre os níveis de cinza da imagem; valores elevados indicam uma distribuição de níveis de cinza mais distante da média. O contraste está inversamente relacionado à homogeneidade (momento da diferença inversa). Assim, o contraste quantifica a flutuação de brilho na imagem: quanto maior o contraste, maior a variação do diâmetro das fibras colágenas (Laurito, 2019).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados clinicopatológicos, morfológicos e histoquímicos foram tabulados em uma tabela do Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO (Versão 2406 Build 16.0.17726.20078) 64 bits e descritos com valor absoluto, média e desvio padrão. A correlação entre os parâmetros de

expressão das colorações especiais foi realizada pelo 2Way ANOVA e analisado pelo teste de múltiplas comparações de Sidak ou Tukey. Para a avaliação dos resultados obtidos na GSH, os dados foram divididos em três grupos: região intratumoral, extratumoral e cápsula. Além disso, foram comparados tumores benignos com diferenciação mioepitelial (AP e ME) e malignos com diferenciação mioepitelial (CAC, CM e CEM). Foram realizadas comparações entre as regiões intratumoral e extratumoral, bem como entre as regiões intratumoral e cápsula (em tumores que apresentavam essa característica), e tumores benignos contra malignos utilizando o teste de Mann-Whitney. Em relação aos dados da região intratumoral, todos os tumores foram comparados entre si usando o teste de Kruskal-Wallis. Por fim, utilizando o teste de Mann-Whitney. Os testes foram realizados no programa GraphPad Prism v.10.2.3(403), considerando-se um valor de p significativo $<0,0005$.

5. RESULTADOS

Foram obtidos ao todo 30 casos, 5 casos de cada grupo tumoral, sendo AP, ME, CAC, CDS, CM E CEM. Todos os cinco casos de CEM e três dos cinco casos de CM são subtipos histopatológicos de CXAP.

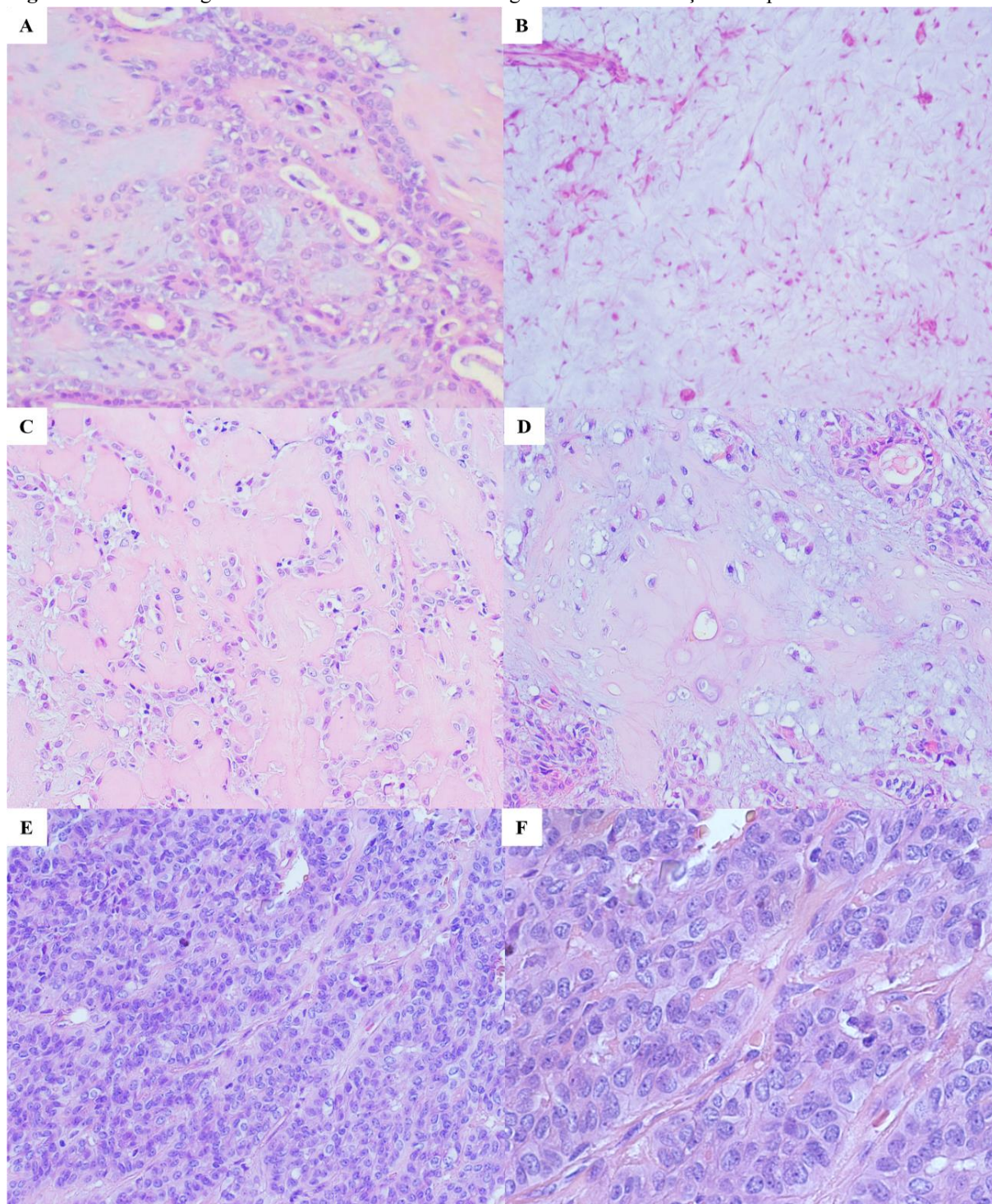
5.1. CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Dos 5 casos de AP (Tabela 3), todos eram localizados na glândula parótida, destes, 3 (60%) acometeram mulheres e 2 (40%) homens. A idade média dos pacientes deste grupo foi de 51,4 anos e o tempo de evolução relatado foi de 26,4 meses em média. Todos os casos foram tratados cirurgicamente e não houve relato de recidiva. Dos pacientes, 4 (80%) se encontram vivos e sem doença, enquanto 1 (20%) faleceu por causas alheias à doença. A respeito das características anatomopatológicas dos casos de AP, em 4 (80%) casos havia presença de cápsula íntegra, no caso restante, o tumor se apresentou parcialmente encapsulado. As células epiteliais se apresentaram em áreas de arranjo ductal em todos os casos (100%). Além disso, foram notadas áreas de arranjo cístico e cordonal em 4 (80%) dos casos, sólido em 3 (60%) casos e cribriformes em 1 (20%) caso. A respeito da morfologia das células mioepiteliais, havia presença de células epitelioides e fusiformes em todos (100%) os casos células claras foram notadas em 4 (80%) casos, e plasmocitoide em 3 (60%) casos. Áreas de estroma hialino e mixoide estavam presentes em todos os 5 (100%) casos, o estroma condroide estava presente em 3 (60%) casos (Figura 7). Foram notadas áreas de metaplasias escamosa e lipomatosa em 4 (80%) casos e mucosa em 1 (20%) caso. Áreas de necrose foram observadas em 1 (20%) caso, essas áreas podem estar relacionadas a punção prévia. Não houve registro de invasão neural ou angiolinfática em nenhum dos casos.

Dos 5 casos obtidos de ME (Tabela 3), 2 (40%) acometeram mulheres e 1 (20%) homem. Nos 2 (40%) casos restantes esta informação estava indisponível. A idade média dos pacientes foi de 63,3 anos. Houve acometimento de 1 (20%) caso em parótida, 1 (20%) em mucosa jugal e 1 (20%) em palato. Dois (40%) casos não informaram localização. A evolução da doença aconteceu em média por 29,3 meses. Em 3 (60%) casos o tratamento foi cirúrgico e 2 (40%) a informação não estava disponível. Um caso (20%) apresentou duas recidivas. Três (60%) pacientes permanecem vivos, não houve informação sobre a situação dos demais (40%). A respeito das características anatomopatológicas dos casos de ME o padrão sólido foi observado em 4 (80%) casos. Os padrões reticular, cordonal e trabecular estiveram presentes em 2 (40%) casos cada um. O estroma hialino esteve presente em todos os casos (Figura 7) enquanto o mixoide em 3 (60%) tumores. A morfologia das células mioepiteliais foi epitelióide e fusiforme em 4 (80%) casos cada uma, clara em 3 (60%) casos e em 1 (20%) caso apresentou células

plasmocitoides. Áreas de necrose foram observadas em 1 (20%) caso. Não houve registro de invasão neural ou angiolinfática. Os tumores continham capsula íntegra em 3 (60%) casos, parcialmente encapsulado em 1 (20%) caso e o um caso (20%) não era passível de avaliação de capsula.

Figura 7 – Fotomicrografias em HE ilustrando TGS benignos com diferenciação mioepitelial



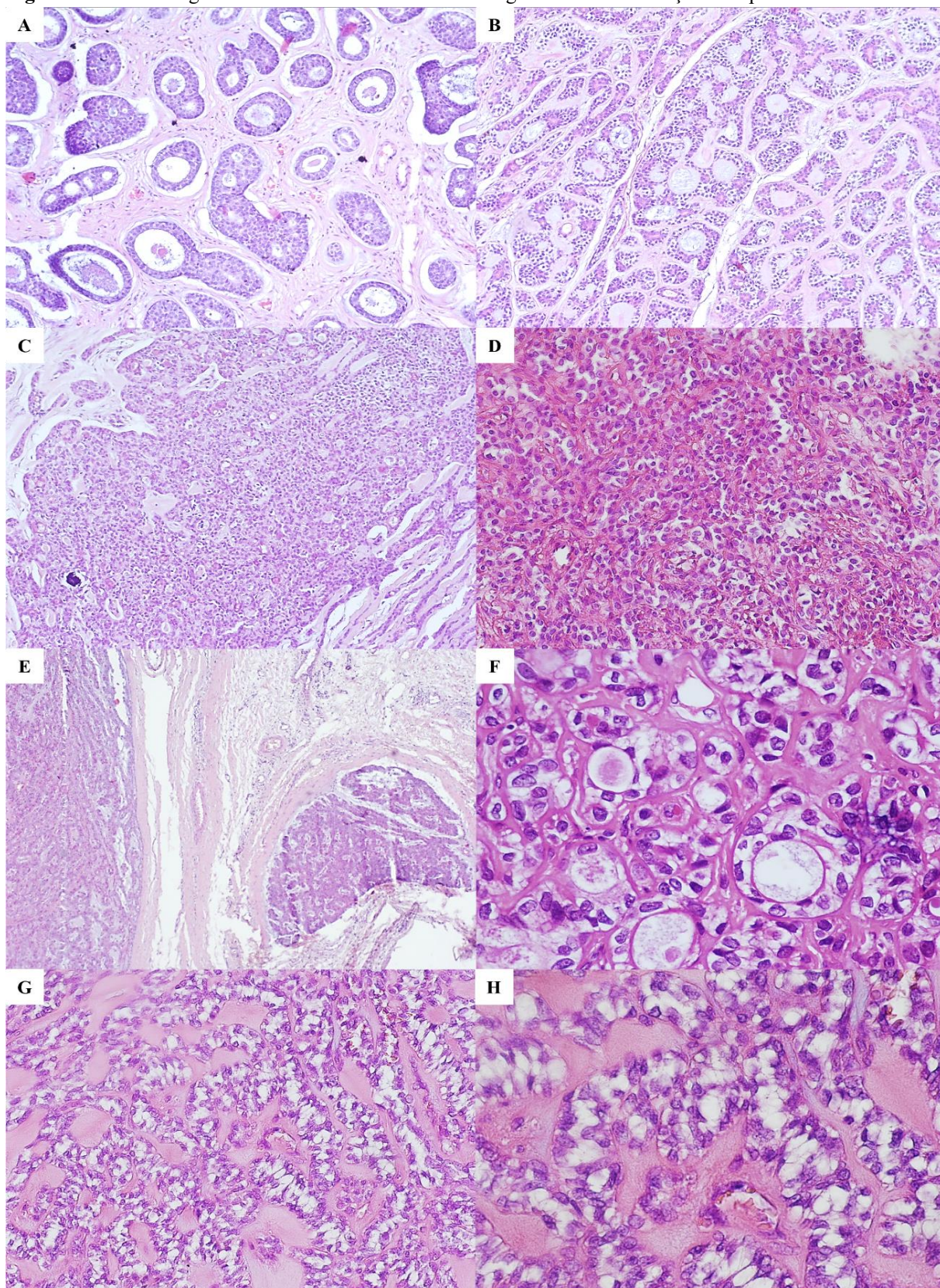
A-D: Adenoma pleomórfico. A: Padrão ductal [200x]; B: Estroma mixoide [200x]; C: Estroma hialino [200x]; D: Estroma condroide [200x]. E-F: Mioepitelioma. E: Estroma hialino [200x]. F: Estroma hialino e células epitelioides [400x].

Nos 5 casos de CAC (Tabela 3), 4 (80%) foram relatados em homens, e a idade média foi de 45,6 anos. O palato foi acometido em 3 (60%) casos e a parótida em 2 (40%) casos. O tempo de evolução médio da doença foi de 26 meses e o tratamento foi a combinação de cirurgia com radioterapia em todos os casos. Houve relato de metástase em 2 (40%) casos. Os pacientes se encontram vivos, porém 1 (20%) está em tratamento de metástase. A respeito das características anatomopatológicas, as células mioepiteliais se apresentaram uniformes e basaloídes. Foram encontradas áreas de padrão cribriforme em todos os casos, o padrão tubular esteve presente em 4 (80%) casos e o sólido em apenas 1 (20%). O estroma hialino esteve presente em todos os casos e o mixoide em 2 (40%) tumores (Figura 8). Foi observada necrose em 1 (20%) caso, invasão angiolinfática em 4 (80%) e neural em 2 (40%) casos.

Nos casos de CM (Tabela 3), 1 (20%) era mulher, 1 (20%) homem e os demais não indicaram sexo. A idade média foi de 69,5 anos e a localização mais frequente foi a parótida (2,40%), os demais casos não havia informação a respeito da região anatômica acometida. As lesões evoluíram em média em 132 meses e foram tratadas com cirurgia e radioterapia nas ocasiões em que a informação foi relatada (2, 40%) casos. Não houve registro de recidiva ou metástase. Um (20%) paciente está vivo livre da doença, 1 (20%) vivo ainda com a doença e em 3 (60%) casos não havia disponível a informação do status do paciente. A respeito das características histopatológicas, foram observadas áreas com arranjo sólido em 3 (60%) casos, cordonal ou reticular em 2 (40%) casos e trabecular em 1 (20%) caso. As células mioepiteliais se apresentaram claras e epitelioides em 3 (60%) casos cada, e fusiformes e plasmocitoides em 2 (40%) casos cada. O estroma foi hialino e mixoide em 3 (60%) ocasiões cada (Figura 8). Não houve registro de invasão angiolinfática ou neural e necrose. Quando foi possível avaliar, a cápsula esteve invadida em 1 (20%) caso, íntegra em 1 (20%) caso e em um caso (20%), o tumor estava parcialmente encapsulado.

Nos casos de CEM (Tabela 3), 4 (80%) pacientes eram homens e uma era (20%) mulher. A idade média dos pacientes foi de 65,4 anos. A parótida foi acometida em 3 (60%) casos e o palato em 2 (40%). Os casos foram tratados com cirurgia e radioterapia em 3 (60%) casos e com apenas cirurgia em 2 (40%) casos. Não houve recidiva. Quatro (80%) dos pacientes se encontram vivos e sem doença. A cápsula esteve ausente em todos os casos, áreas com arranjo morfológico sólido foram vistas em 4 (80%) casos, cordonal em 2 (40%) casos, misto e tubular em um caso (20%) cada. As células mioepiteliais se apresentaram claras em 4 (80%) casos. Foram observadas áreas de estroma hialino em todos os casos e mixoide em 3 (60%) (Figura 8). A invasão angiolinfática e neural esteve presente em 1 (20%) caso cada uma, e não foram observadas áreas de necrose.

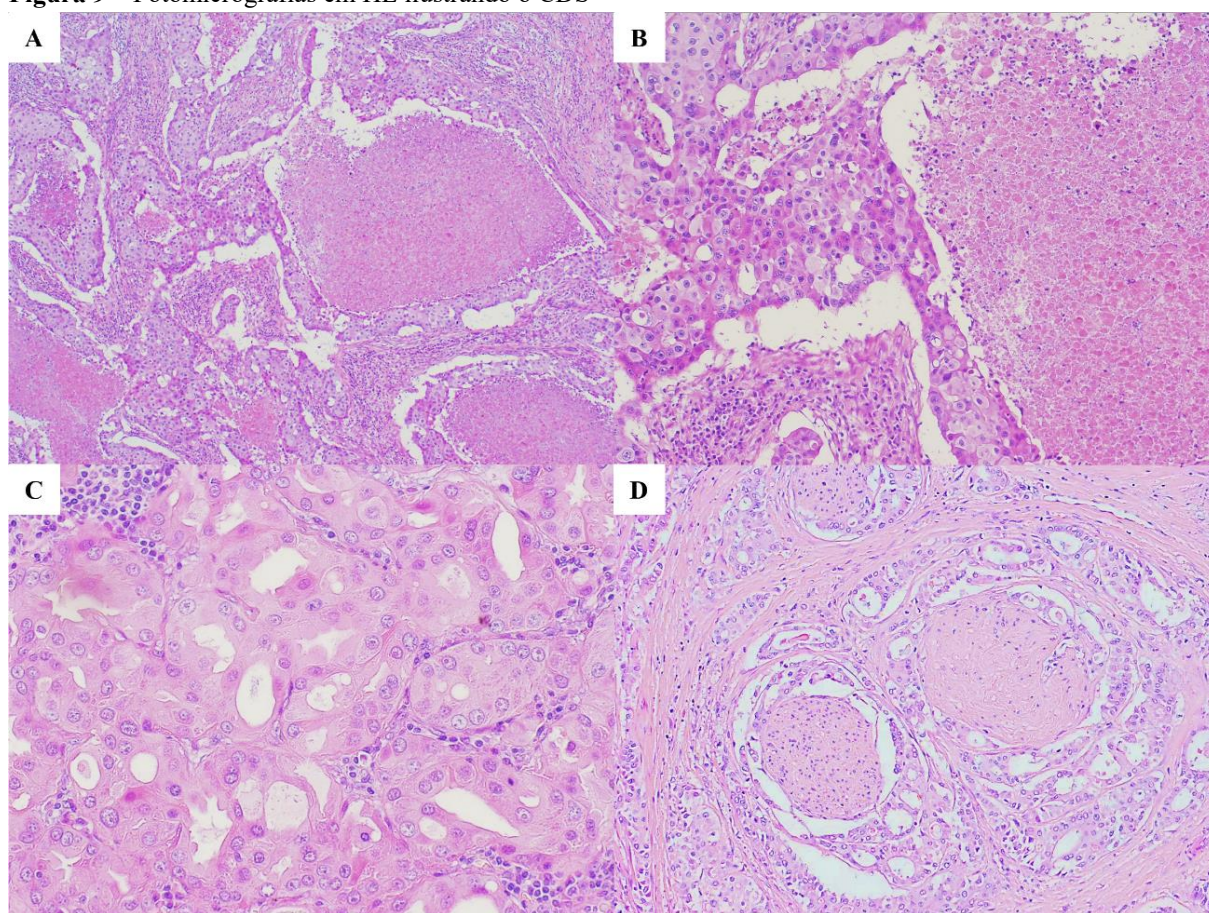
Figura 8 – Fotomicrografias em HE ilustrando os TGS malignos com diferenciação mioepitelial



A-C: Carcinoma adenoide cístico. A: Padrão tubular [20x]; B: Padrão cribriforme [200x]; C: Padrão sólido [200x]. D-E: Carcinoma mioepitelial. D: Estroma hialino e células dispostas em lençol [200x]; E: Invasão de estruturas adjacentes, que o diferencia do mioepitelioma [100x]. F-H: Carcinoma epitelial-mioepitelial. F: Padrão tubular [400x]. G: Padrão cordonal, com presença de estroma mixoide [200x]. H: Padrão cordonal, com presença de estroma mixoide [400x].

Os casos de CDS (Tabela 3) acometeram homens em 3 (60%) ocasiões e mulheres em 2 (40%), A idade média dos pacientes foi de 51,8 anos. A parótida foi a localização mais comum em 4 (80%) dos casos e em 1 paciente (20%), a glândula submandibular foi acometida. O tratamento de escolha foi a cirurgia acompanhada de radioterapia em 4 (80%) casos e em 1 (20%) deles além da cirurgia, o paciente foi tratado com radioquimioterapia. As metástases estiveram presentes em 4 (80%) casos, e a situação dos pacientes foi majoritariamente de óbitos: pela metástase em 3 (60%) ocasiões e 1 (20%) por segundo câncer primário, em 1 (20%) caso o paciente estava vivo, porém com outro câncer. A respeito das características histopatológicas dos casos, todos os casos eram não-encapsulados, havia áreas de arranjo celular cribriforme em 4 (80%) casos e de arranjo sólido em 1 (20%) caso. O estroma hialino foi observado em 4 (80%) casos e mixoide em 1 (20%) caso (Figura 9). A diferenciação lipomatosa esteve presente em 2 (40%) casos. Todos os casos apresentaram invasão angiolinfática e neural. Comedonecrose foi vista em 3 (60%) casos.

Figura 9 – Fotomicrografias em HE ilustrando o CDS



A-D: Carcinoma do ducto salivar. A: Comedonecrose [100x]; B: Comedonecrose e destaque para células dispostas em ninhos sólidos [200x]; C: Células com grandes núcleos pleomórficos com cromatina grosseira e nucléolos proeminentes, e citoplasma eosinofílico abundante e apócrino [400x]; D: Invasão neural e perineural [200x].

Tabela 3 – Informações clínico-patológicas dos TGS (continua)

Características clínico-patológicas		AP	ME	CAC	CM	CEM	CDS
Sexo	Feminino	3 (60)	2 (40)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	2 (40)
	Masculino	2 (40)	1 (20)	4 (80)	1 (20)	4 (80)	3 (60)
	NI	-	2 (40)	-	3 (60)	-	-
Idade média (min-máx.)		51,4±14,35 (32-72)	63,3±7,36 (71-56)	45,6±17,21 (22-68)	69,5±7,77 (61-72)	65,4±11,52 (53-84)	51,8±15,15 (29-65)
Localização	Parótida	5 (100)	1 (20)	2 (40)	2 (40)	3 (60)	4 (80)
	Mucosa jugal	-	1 (20)	-	-	-	-
	Submandibular	-	-	-	-	-	1 (20)
	Palato	-	1 (20)	3 (60)	-	2 (40)	-
	NI	-	2 (40)	-	3 (60)	-	-
Tempo de evolução médio em meses (min-máx.)		26,4±26,05 (12-72)	29,3±18,57 (4-48)	132±152 (24-240)	69,5±113 (8-240)	13,2±7,45 (7-24)	13,25±7,45 (7-24)
Tratamento	Cirurgia	5 (100)	3 (60)	-	-	2 (40)	-
	Cirurgia e radioterapia	-	-	5 (100)	2 (40)	3 (60)	4 (80)
	Cirurgia, radioterapia e quimioterapia	-	-	-	-	-	1 (20)
	NI	-	2 (40)	-	3 (60)	-	-

Adenoma pleomórfico (AP), mioepitelioma (ME), carcinoma adenoide cístico (CAC), carcinoma mioepitelial (CM), carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM), carcinoma do ducto salivar (CDS).

Tabela 3 – Informações clínico-patológicas dos TGS (continuação)

Características clínico-patológicas		AP	ME	CAC	CM	CEM	CDS
Recidiva/ Metástase	Não	5 (100)	2 (40)	3 (60)	5 (100)	5 (100)	1 (20)
	Sim	-	1 (20)	2 (40)	-	-	4 (80)
	NI	-	2 (40)	-	-	-	-
Situação do paciente	Vivo (sem doença)	4 (80)	3 (60)	4 (80)	1 (20)	4 (80)	-
	Vivo (com doença)	-	-	-	1 (20)	-	-
	Vivo (metástase)	-	-	1 (20)	-	-	-
	Vivo (outro câncer)	-	-	-	-	-	1 (20)
	Óbito (outras causas)	1 (20)	-	-	-	1 (20)	1 (20)
	Óbito (metástase)	-	-	-	-	-	3 (60)
	NI	-	2 (40)	-	3 (60)	-	-
Tempo de seguimento médio em meses (min-máx.)		14,4±12,4 (6-32)	12±0 (2-12)	93,6±31,06 (60-84)	192±0 (192)**	32,4±33,29 (6-84)	34,64±34,64 (12-72)
Morfologia das células mioepiteliais	Fusiforme	5 (100)	4 (80)	-	2 (40)	-	-
	Epiteloide	5 (100)	4 (80)	-	3 (60)	1 (20)	-
	Clara	4 (80)	3 (60)	-	3 (60)	4 (80)	-
	Plasmocitoide	3 (60)	1 (20)	-	2 (40)	-	-
	Basaloide	-	-	5 (100)	-	-	-

Adenoma pleomórfico (AP), mioepitelioma (ME), carcinoma adenoide cístico (CAC), carcinoma mioepitelial (CM), carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM), carcinoma do ducto salivar (CDS). ** Houve a informação apenas de um paciente neste grupo.

Tabela 3 – Informações clínico-patológicas dos TGS (conclusão)

Características clínico-patológicas		AP	ME	CAC	CM	CEM	CDS
Padrão morfológico	Ductal	5 (100)	-	-	-	-	-
	Cístico	4 (80)	-	-	-	-	-
	Cordonal	4 (80)	2 (40)	-	2 (40)	2 (40)	-
	Sólido	3 (60)	4 (80)	1 (20)	3 (60)	4 (80)	1 (20)
	Reticular	-	2 (40)	-	2 (40)	-	-
	Trabecular	-	2 (40)	-	1 (20)	-	-
	Tubular	-	-	4 (80)	-	1 (20)	-
	Cribriforme	1 (20)	-	5 (100)	-	-	4 (80)
	Misto	-	-	-	-	1 (20)	-
Estroma	Hialino	5 (100)	5 (100)	5 (100)	3 (60)	5 (100)	4 (80)
	Mixoide	5 (100)	3 (60)	2 (40)	3 (60)	3 (60)	1 (20)
	Condroide	3 (60)	-	-	-	-	-
Invasão angiolinfática	Presente	-	-	4 (80)	-	1 (20)	5 (100)
Invasão neural	Presente	-	-	2 (40)	5 (100)	-	1 (20)
Necrose	Presente	1 (20)	1 (20)	1 (20)	3 (60)	-	-
Cápsula	Presente	4 (80)	3 (60)	-	-	2 (40)	-

Adenoma pleomórfico (AP), mioepitelioma (ME), carcinoma adenoide cístico (CAC), carcinoma mioepitelial (CM), carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM), carcinoma do ducto salivar (CDS).

5.2. COLORAÇÕES ESPECIAIS

As colorações especiais realizadas foram VHF (elastina e colágeno) (Figura 10 e 11), WVG (elastina e colágeno) (Figura 12 e 13), TMA (colágeno I e III) (Figura 14), PCR (colágeno I e III) (Figura 15), RET (colágeno III) (Figura 16), ATO (PG ácidos) (Figura 17) e ALB (PG e GAG) (Figura 18). Todos os casos foram submetidos a cada uma das colorações especiais. A **Tabela 4** sumariza a quantificação de cada componente da matriz destacado pelas colorações especiais nos grupos de tumores.

O AP apresentou baixa marcação para elastina quando observada através do VHF e WVG, em que a maioria dos casos apresentou menos de 10% de marcação intratumoral. Em contrapartida, o colágeno observado em VHF, WVG, TMA, PCR, RET esteve presente na maioria dos casos apresentando até 50%, e em um caso mais de 50%. O PG e GAG foram observados pelo ATO e ALB com marcação de pelo menos 10%, mas na maioria dos casos esteve presente em mais de 50% do tumor.

O ME por sua vez, apresentou marcação para elastina de até 50% da área na maioria dos casos e em 2 ocasiões foi observada acima desse valor. Quanto ao colágeno, este foi observado de forma variada de acordo com a coloração utilizada: no VHF esteve presente na maioria dos casos em até 50% da área, enquanto no WVG e PCR foi observado em até 10% da área tumoral na maioria dos casos, já no TMA e RET, a maioria dos casos apresentou marcação em mais de 10%) da área. Os PG e GAG estiveram marcados no ATO e ALB em sua maioria em mais de 10% da área, mesmo que distribuídos de forma diferente entre as colorações.

Para o CAC, as marcações de elastina variaram entre VHF e WVG, no primeiro, todos os casos apresentaram marcação em até 10% da área enquanto no segundo, a maioria dos casos foi marcado acima desse valor. Quanto aos colágenos, as colorações de VHF e WVG foram equivalentes, assim como TMA e PCR, nessas colorações a maioria dos casos apresentou marcação positiva para colágeno em mais de 50%) da área intratumoral. A RET apresentou marcação abaixo de 10% de área na maioria dos casos. A respeito dos PG e GAG na MEC do CAC, de acordo com as colorações realizadas, sua presença foi abaixo de 10% de área em todos os casos, e em sua maioria não houve marcação.

O CM apresentou marcação para elastina controversa, em que a maioria dos casos foi negativa, mas em 2 (VHF) e um (WVG) a marcação ultrapassou os 50%, para essas colorações, o colágeno também teve sua marcação considerada baixa, com todos os casos abaixo de 10% e alguns com marcação negativa. Já para o TMA e PCR a maioria também esteve abaixo de 10% de área, porém casos isolados apresentaram marcação em mais de 50% do tumor. Em

contrapartida, a RET apresentou grande marcação, com mais de 50%) de área na maioria dos casos. Os PG e GAG marcados em ATO e ALB preencheram em sua totalidade área menor do que 50% em todos os casos, em que a maioria não passou de 10%, apresentando também marcação negativa em 4 ocasiões.

O CEM apresentou marcação de elastina positiva no VHF na maioria dos casos e acima de 10%, no WVG a distribuição da marcação da elastina foi variada, quando positivo, metade dos casos estiveram marcados acima de 10% da área do tumor e metade abaixo. O colágeno (VHF, WVG, TMA e RET) esteve presente em áreas acima de 10% em todos os casos, e no PCR todos os casos tiveram marcação alta (acima de 50%). A presença dos PG e GAG (ATO, ALB) foi baixa, em que sua marcação positiva foi abaixo de 10% em todos os casos e em alguns a marcação foi negativa (Tabela 4).

A respeito das marcações no CDS, a elastina apresentou marcação abaixo de 10% na maioria dos casos, tanto no VHF, quanto no WVG. Já para a marcação de colágeno a maioria das marcações foi acima de 10% (VHF, WVG, TMA) e no PCR todos os casos marcaram positivo acima de 50 % da área do tumor. Quanto a RET, a marcação foi mais fraca, estando todos os casos positivos para até 10% da área. A marcação para PG e GAG (ATO e ALB) foi negativa em todos os casos.

Tabela 4 – Descrição da distribuição das colorações especiais nos TGS (continua)

TUMOR	QTD	VHF n (%)		WVG n (%)		TMA	PCR	RET	ATO	ALB
		Elastina	Colágeno	Elastina	Colágeno	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
AP	0	2 (40)	-	2 (40)	-	-	-	-	-	-
	+	2 (40)	-	2 (40)	-	-	-	-	-	-
	++	1 (20)	4 (80)	1 (20)	4 (80)	4 (80)	4 (80)	5 (100)	-	1 (20)
	+++	-	1 (20)	-	1 (20)	1 (20)	1 (20)	-	5 (100)	4 (80)
ME	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (20)
	+	-	-	1 (20)	3 (60)	1 (20)	3 (60)	1 (20)	1 (20)	1 (20)
	++	4 (80)	4 (80)	2 (40)	1 (20)	2 (40)	1 (20)	1 (20)	2 (40)	3 (60)
	+++	1 (20)	1 (20)	2 (40)	1 (20)	2 (40)	1 (20)	3 (60)	2 (40)	-
CAC	0	-	-	-	-	-	-	-	4 (80)	3 (60)
	+	5 (100)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	-	-	4 (80)	1 (20)	1 (20)
	++	-	1 (20)	2 (40)	1 (20)	-	-	1 (20)	-	-
	+++	-	3 (60)	2 (40)	3 (60)	5 (100)	5 (100)	-	-	1 (20)

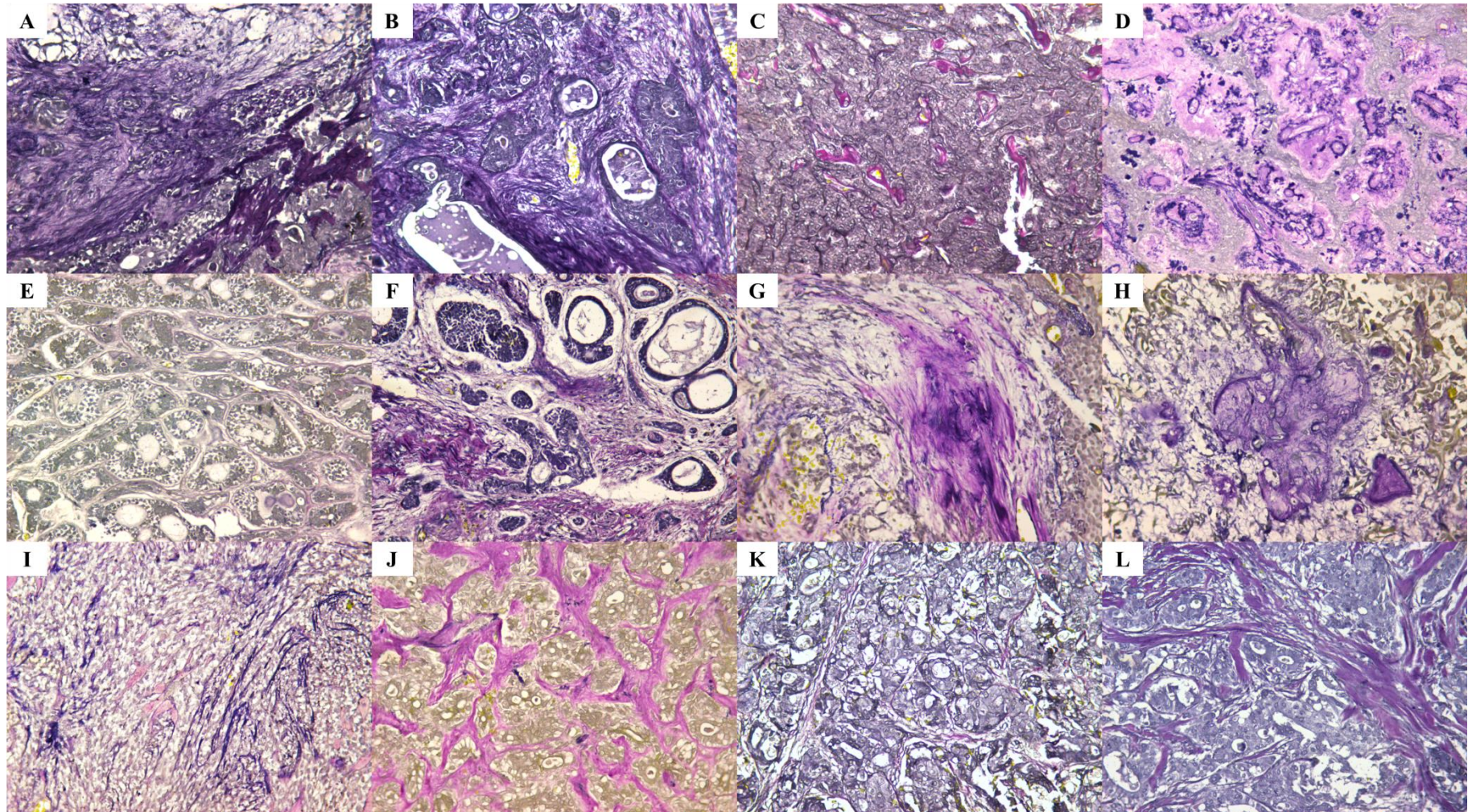
Grupos: Adenoma pleomórfico (AP) n=5; Mioepitelioma (ME) ME n=5; Carcinoma adenoide cístico (CAC) n=5. Colorações: Verhoeff (VHF); Weigert-Van Gieson (WVG); Tricromio Masson (TMA); Picrosirius Red (PCR); Azul de Toluidina (ATO); Alcian Blue (ALB). + <10%, ++ 11 – 50%, +++ >50%.

Tabela 4 – Descrição da distribuição das colorações especiais nos TGS (conclusão)

TUMOR	QTD	VHF n (%)		WVG n (%)		TMA	PCR	RET	ATO	ALB
		Elastina	Colágeno	Elastina	Colágeno					
CM	0	3 (60)	1 (20)	4 (80)	2 (40)	2 (40)	-	-	3 (60)	1 (20)
	+	-	4 (80)	-	3 (60)	2 (40)	3 (60)	-	2 (40)	1 (20)
	++	-	-	-	-	-	-	1 (20)	-	3 (60)
	+++	2 (40)	-	1 (20)	-	1 (20)	2 (40)	4 (80)	-	-
CEM	0	2 (40)	-	1 (20)	-	-	-	-	1 (20)	3 (60)
	+	-	2 (40)	2 (40)	2 (40)	1 (20)	-	-	4 (80)	2 (40)
	++	2 (40)	2 (40)	1 (20)	2 (40)	2 (40)	-	2 (40)	-	-
	+++	1 (20)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	2 (40)	5 (100)	3 (60)	-	-
CDS	0	2 (40)	1 (20)	-	-	-	-	1 (20)	5 (100)	5 (100)
	+	3 (60)	-	5 (100)	1 (20)	-	-	4 (80)	-	-
	++	-	2 (40)	-	3 (60)	4 (80)	-	-	-	-
	+++	-	2 (40)	-	1 (20)	1 (20)	5 (100)	-	-	-

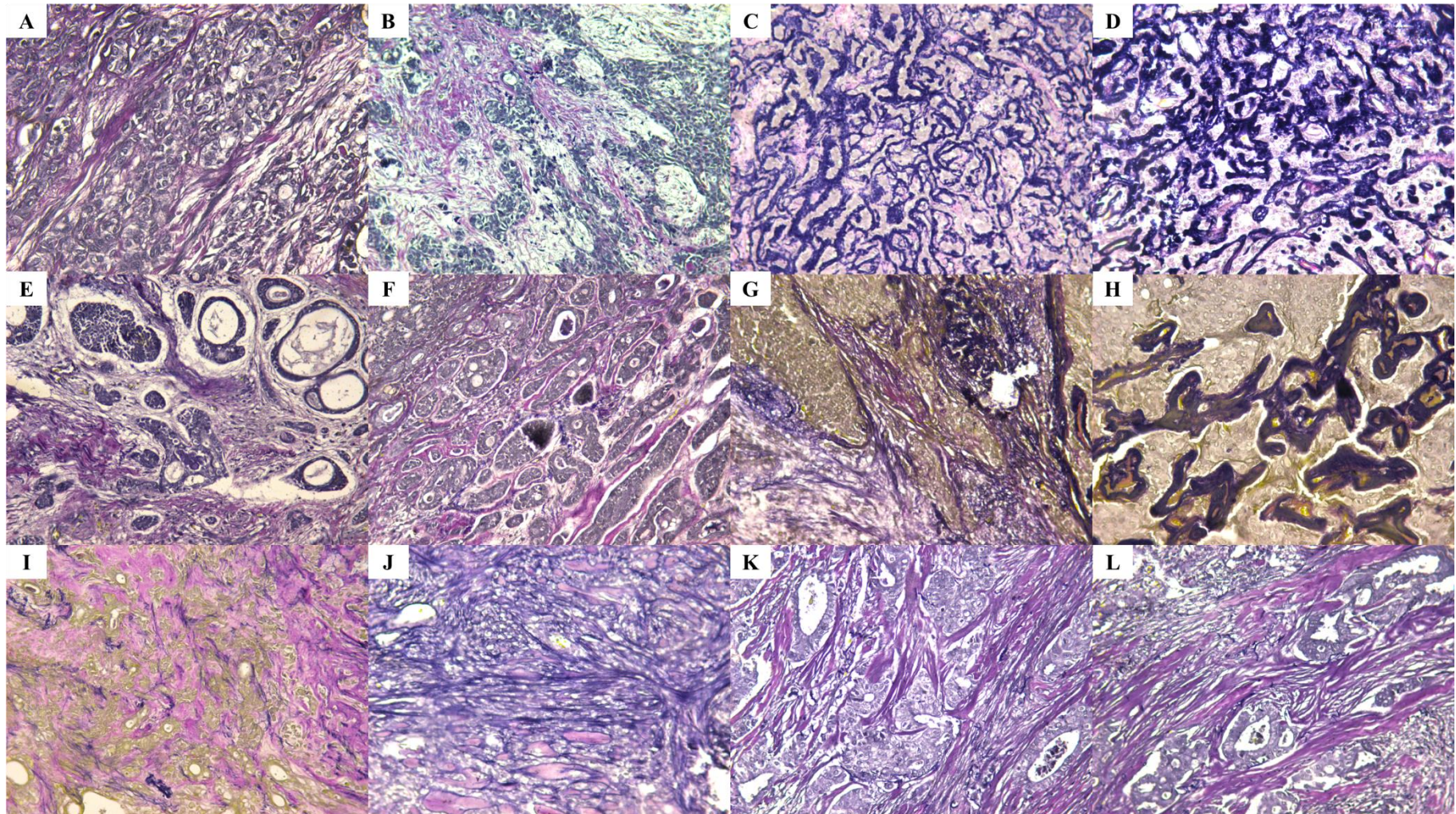
Grupos: Carcinoma mioepitelial (CM) n=5, Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM) n=5; Carcinoma do ducto salivar (CDS) n=5. Colorações: Verhoeff (VHF); Weigert-Van Gieson (WVG); Tricromio Masson (TMA); Picrosirius Red (PCR); Azul de Toluidina (ATO); Alcian Blue (ALB). + <10%, ++ 11 – 50%, +++ >50%.

Figura 10 – Coloração de VHF para observar colágeno em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.



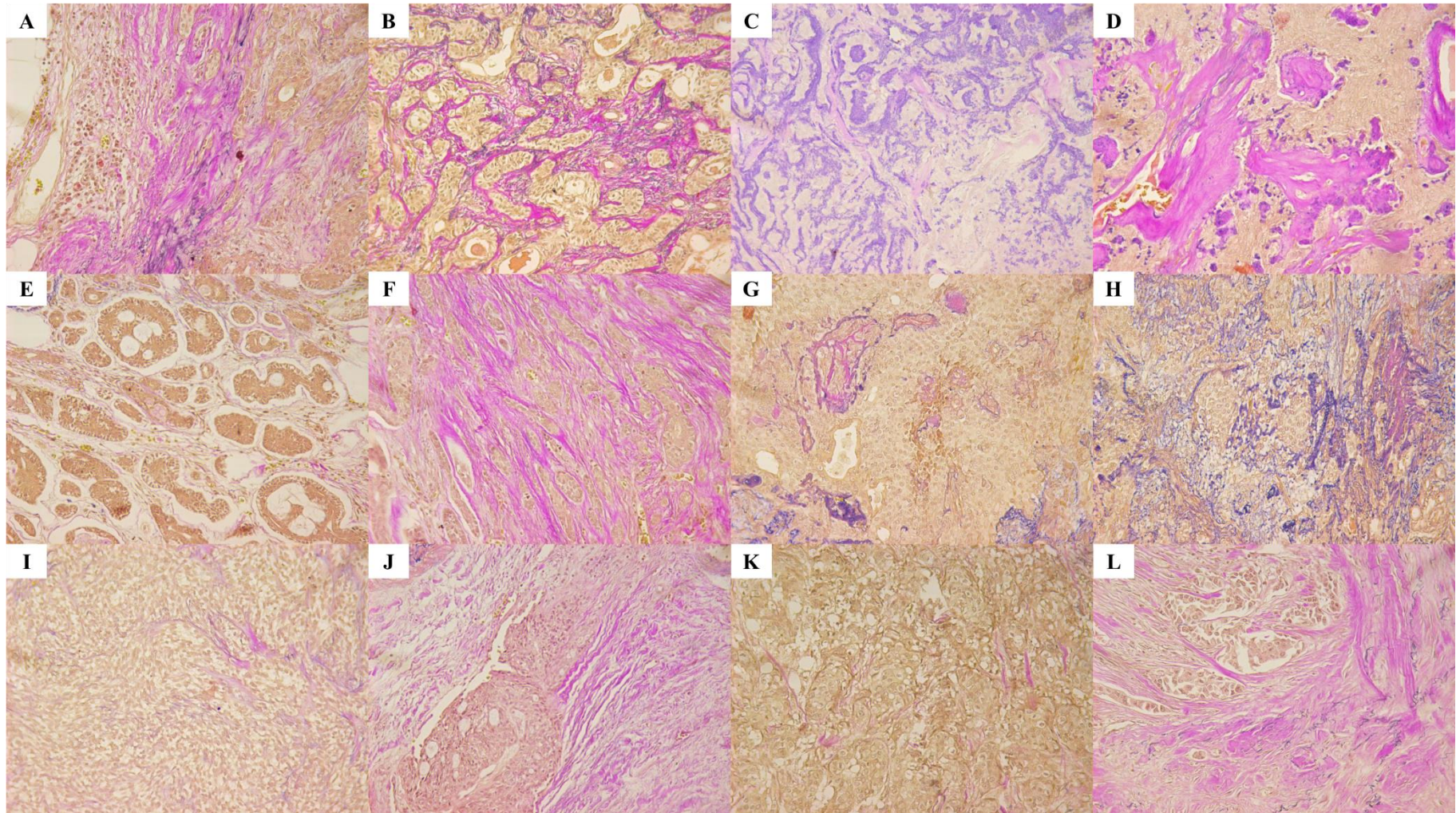
Colágeno: marcação roxo avermelhado. A: Adenoma pleomórfico ++; B: Adenoma pleomórfico +++; C: Mioepitelioma ++; D: Mioepitelioma +++; E: Carcinoma adenoide cístico +; F: Carcinoma adenoide cístico +++; G – H: Carcinoma mioepitelial +; I: Carcinoma epitelial-mioepitelial +; J: Carcinoma epitelial-mioepitelial +++; K: Carcinoma do ducto salivar +; L: Carcinoma do ducto salivar ++. [200x].

Figura 11– Coloração de VHF para observar elastina em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.



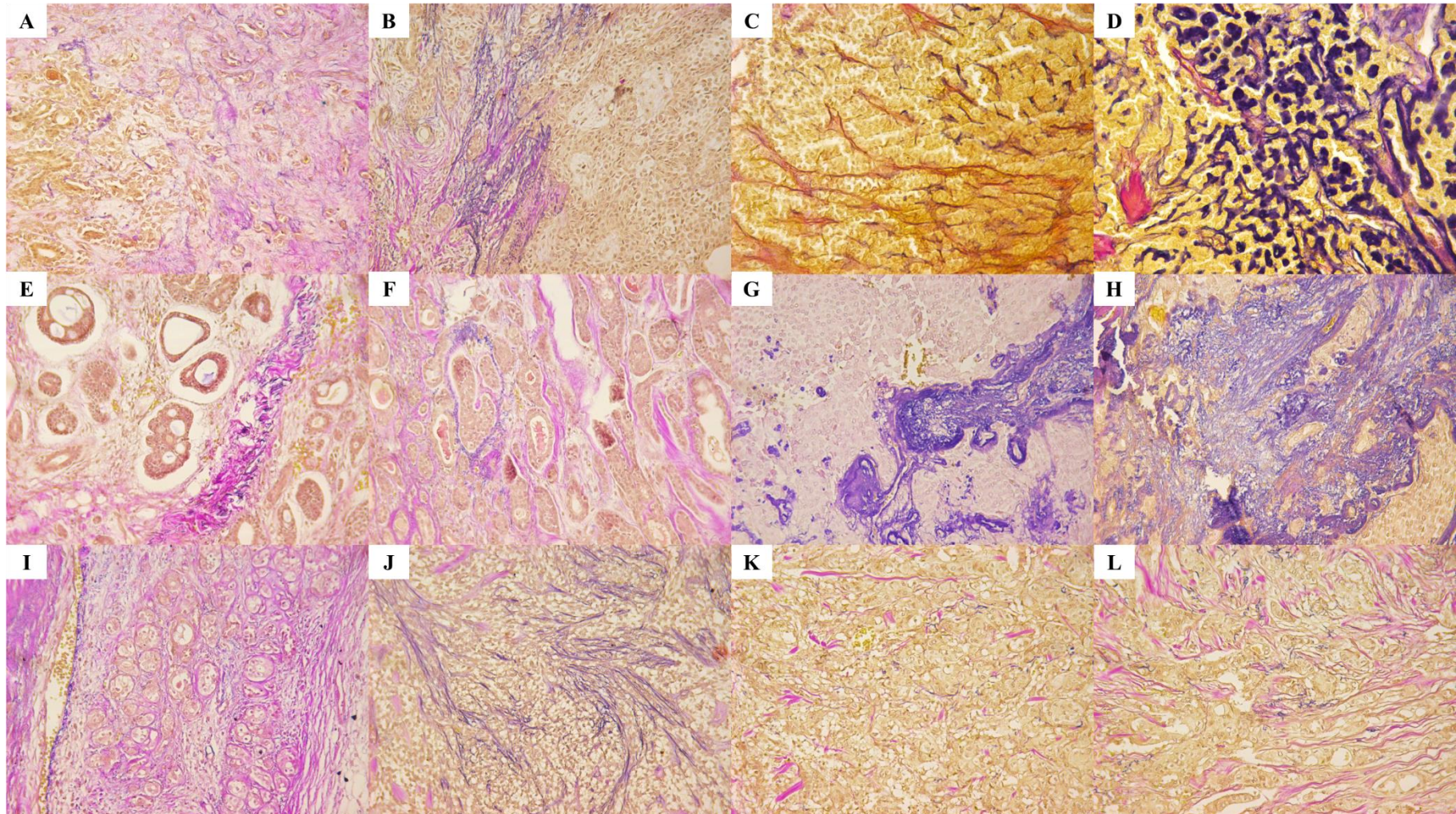
Elastina: coloração preto azulado A – B: Adenoma pleomórfico +; C: Mioepitelioma ++; D: Mioepitelioma +++; E – F: Carcinoma adenoide cístico +; G – H: Carcinoma mioepitelial +++; I: Carcinoma epitelial-mioepitelial ++; J: Carcinoma epitelial-mioepitelial +++; K – L: Carcinoma do ducto salivar +. [200x].

Figura 12 – Coloração de WVG para observar colágeno em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.



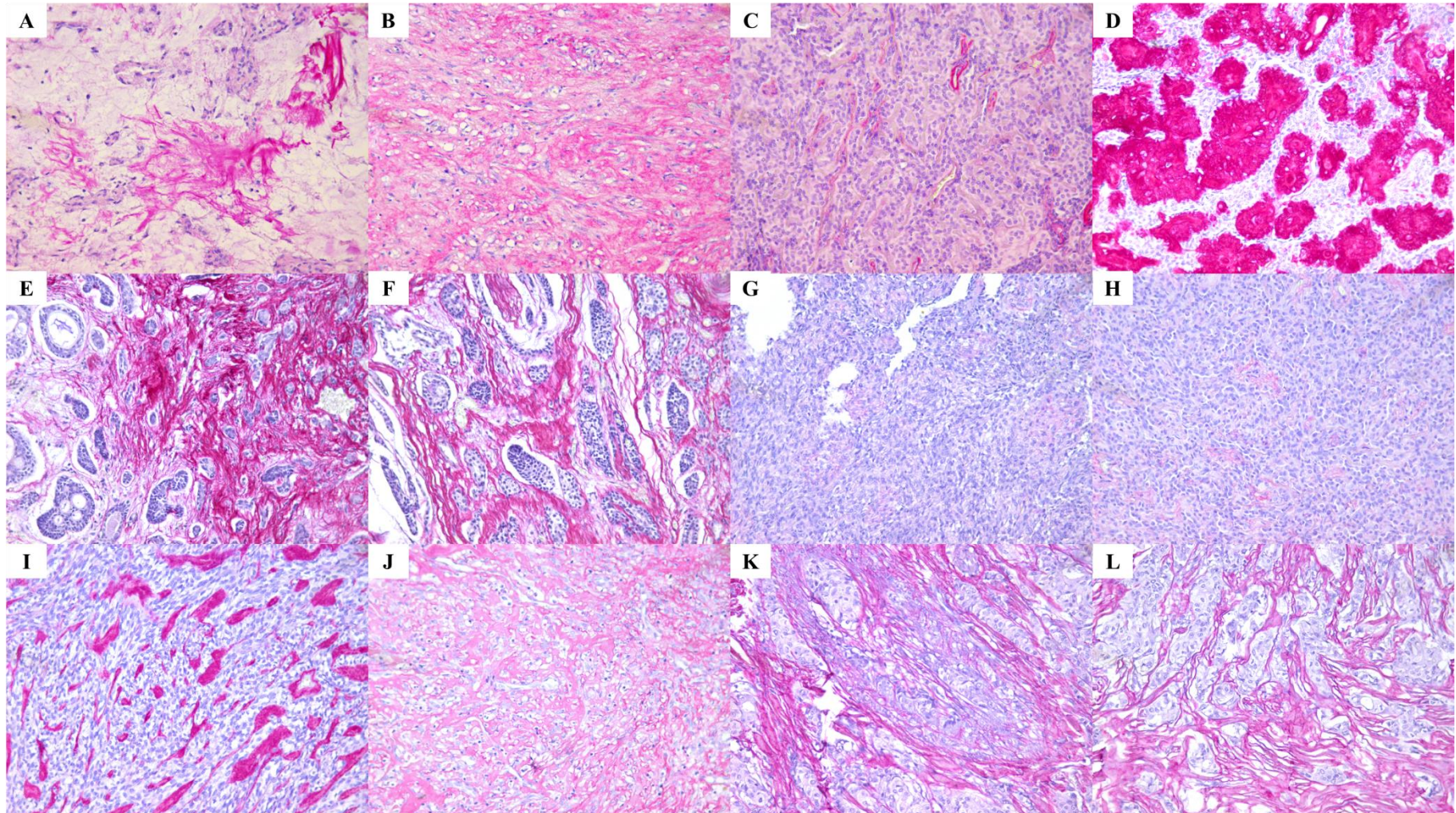
Colágeno: coloração roxo avermelhado. A: Adenoma pleomórfico ++; B: Adenoma pleomórfico +++; C: Mioepitelioma ++; D: Mioepitelioma +++; E – F: Carcinoma adenoide cístico +++; G – H: Carcinoma mioepitelial +; I: Carcinoma epitelial-mioepitelial +; J: Carcinoma epitelial-mioepitelial +++; K: Carcinoma do ducto salivar +; L: Carcinoma do ducto salivar +++. [200x].

Figura 13 – Coloração de WVG para observar elastina em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.



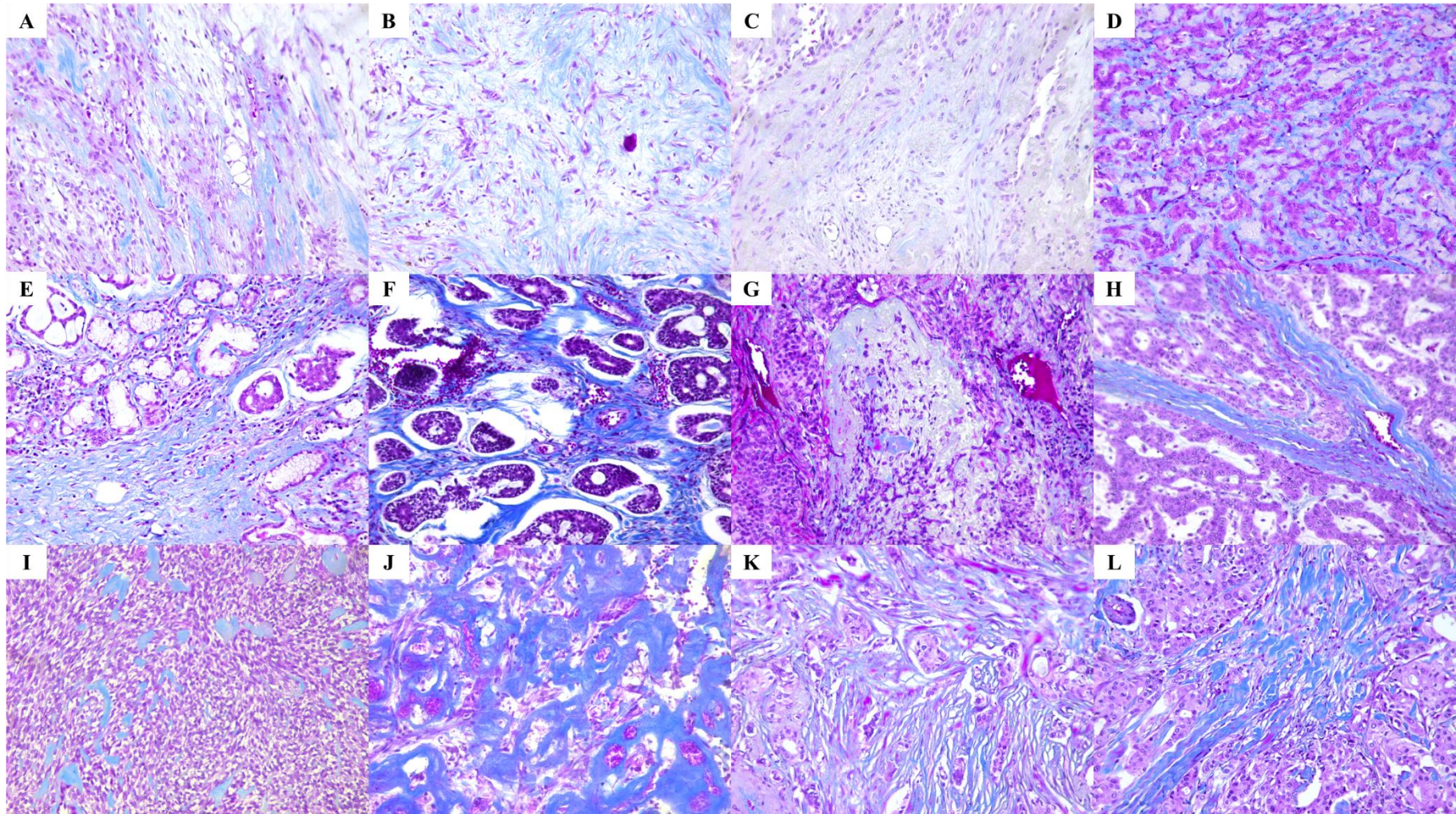
Elastina: coloração preto azulado. A: Adenoma pleomórfico +; B: Adenoma pleomórfico ++; C: Mioepitelioma +; D: Mioepitelioma +++; E – F: Carcinoma adenoide cístico +; G – H: Carcinoma mioepitelial +; I: Carcinoma epitelial-mioepitelial +; J: Carcinoma epitelial-mioepitelial +++; K – L: Carcinoma do ducto salivar +. [200x].

Figura 14– Coloração de PCR para observar colágeno em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.



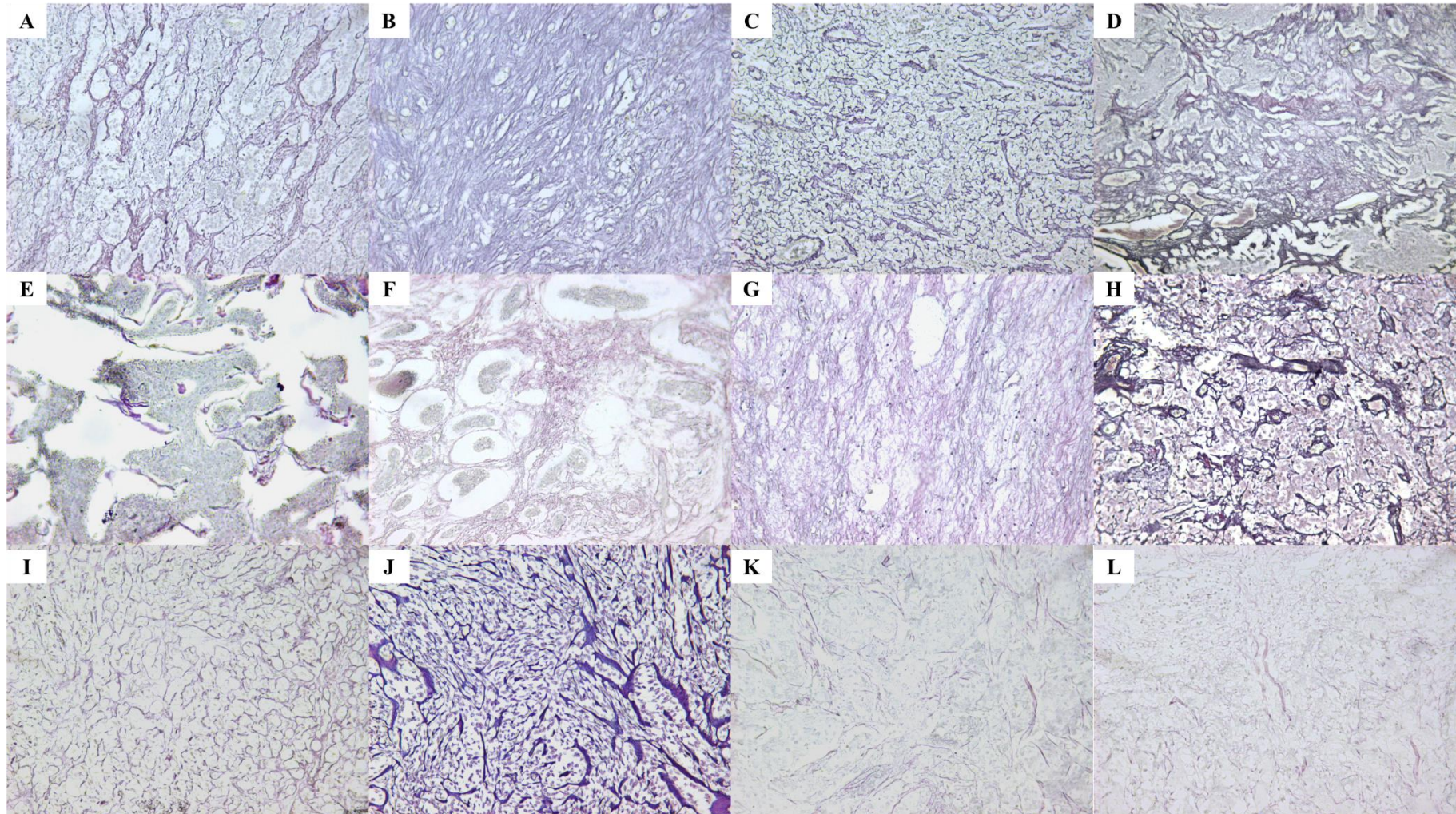
Colágeno: rosa avermelhado. A: Adenoma pleomórfico ++; B: Adenoma pleomórfico +++; C: Mioepitelioma +; D: Mioepitelioma +++; E – F: Carcinoma adenoide cístico +++; G – H: Carcinoma mioepitelial +; I – J: Carcinoma epitelial-mioepitelial +++; K – L: Carcinoma do ducto salivar +++. [200x].

Figura 15– Coloração de TMA para observar colágeno em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.



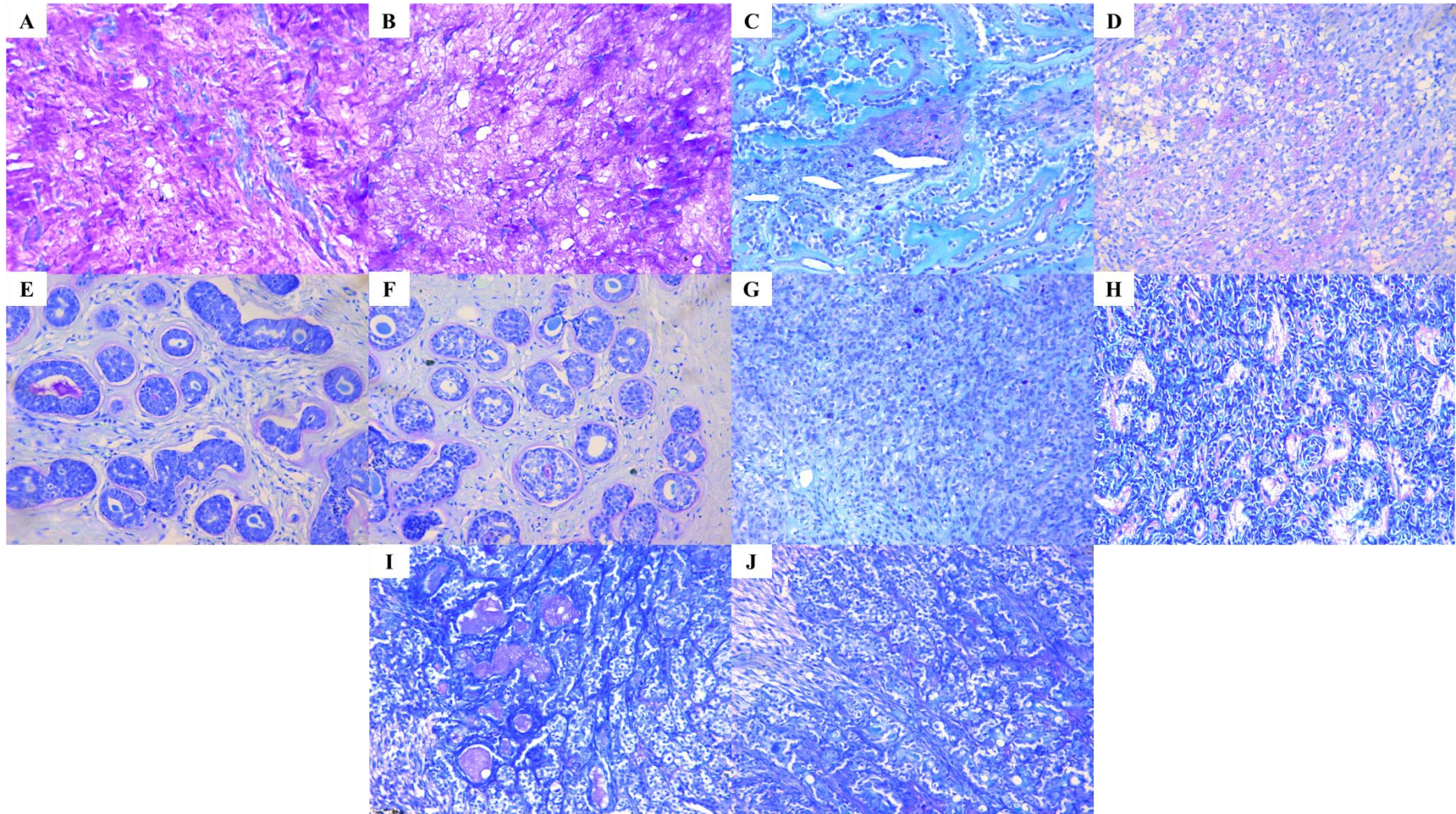
Colágeno: coloração azul. A: Adenoma pleomórfico ++; B: Adenoma pleomórfico +++; C: Mioepitelioma +; D: Mioepitelioma +++; E – F: Carcinoma adenoide cístico +++; G: Carcinoma mioepitelial +; H: Carcinoma mioepitelial +++; I: Carcinoma epitelial-mioepitelial +; J: Carcinoma epitelial-mioepitelial +++; K: Carcinoma do ducto salivar ++; L: Carcinoma do ducto salivar +++. [200x].

Figura 16– Coloração de RET para observar FR em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.



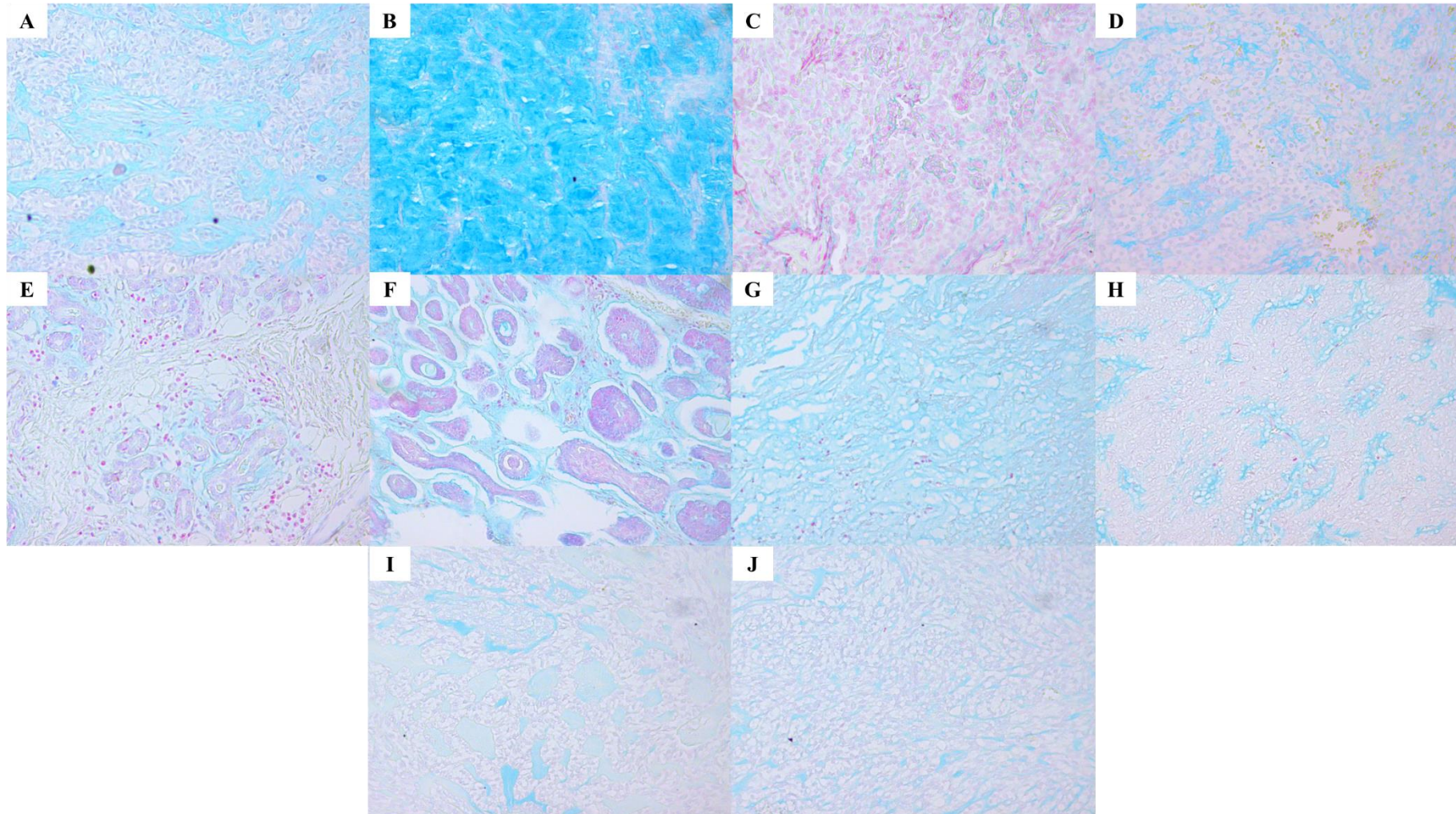
Fibras reticulínicas (FR): coloração preto acastanhado. A – B: Adenoma pleomórfico ++; C: Mioepitelioma +; D: Mioepitelioma +++; E: Carcinoma adenoide cístico +; F: Carcinoma adenoide cístico ++; G: Carcinoma mioepitelial ++; H: Carcinoma mioepitelial +++; I: Carcinoma epitelial-mioepitelial ++; J: Carcinoma epitelial-mioepitelial +++; K – L: Carcinoma do ducto salivar +. [200x].

Figura 17– Coloração de ATO para observar PG e GAG em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.



Proteoglicanos (PG) e glicosaminoglicanos (GAG): coloração metacromática – roxo. A – B: Adenoma pleomórfico +++; C: Mioepitelioma +; D: Mioepitelioma +++; E – F: Carcinoma adenoide cístico +; G – H: Carcinoma mioepitelial +; I – J: Carcinoma epitelial-mioepitelial +. [200x].

Figura 18– Coloração de ALB para observar PG e GAG em cada grupo de TGS, exemplo de menor e maior quantidade encontrada.



Proteoglicanos (PG) e glicosaminoglicanos (GAG): azul claro. A: Adenoma pleomórfico ++; B: Adenoma polimórfico +++; C: Mioepitelioma ++; D: Mioepitelioma +++; E: Carcinoma adenoide cístico +; F: Carcinoma adenoide cístico +++; G: Carcinoma mioepitelial +; H: Carcinoma mioepitelial ++; I – J: Carcinoma epitelial-mioepitelial +. [200x].

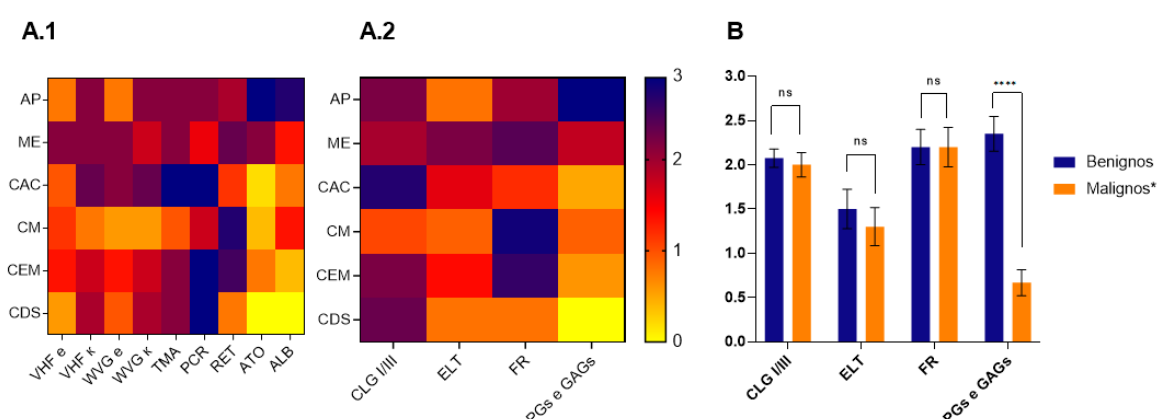
Foi observado que AP e ME apresentam globalmente valores maiores e uma distribuição mais uniforme dos componentes da MEC. O CAC apresentou a maior concentração de colágeno I/III quando comparado ao ME ($p=0,0100$) e CM ($p=<0,0001$). O CM demonstrou a menor concentração de colágeno I/III quando comparado a todos os tumores ($p=0,0036$ vs. ME e $p=<0,0001$ com os demais tumores).

Quanto as FR, o CM obteve a maior expressão por histoquímica, quando comparado com CAC ($p=0,0147$), enquanto CDS apresentou a menor concentração quando comparado com CM ($p=0,0008$), CEM ($p=0,0036$) e ME ($p=0,0147$).

A respeito da elastina, o ME apresentou a maior média de expressão quando comparado ao CDS ($p=0,0417$), CM ($p=0,0306$) e AP ($p=0,0366$).

Por fim, o AP foi o tumor que apresentou maior expressão de PG e GAG quando comparado com todos os tumores ($p=0,0795$ vs. ME e $p=<0,0001$ com os demais tumores). O ME foi o segundo com maior marcação, quando comparado ao CAC ($p=0,0027$), CDS ($p=<0,0001$) e CEM ($p=0,0076$). (Figura 19A.2). De uma forma geral, os tumores malignos com diferenciação mioepitelial demonstraram menor expressão de PG e GAG que os tumores benignos ($p<0,0001$) (Figura 19B). Além disso, esses componentes são menos expressos dentro dos próprios tumores, em comparação com a elastina, FR e colágeno.

Figura 19 – Distribuição dos componentes da MEC pelas colorações especiais



Adenoma pleomórfico (AP); Mioepitelioma (ME); Carcinoma adenoide cístico (CAC); Carcinoma mioepitelial (CM); Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM); Carcinoma do ducto salivar (CDS). Heatmap representando a distribuição do colágeno (CLG), elastina (ELT), fibras reticulínicas (FR), Proteoglicanos e glicosaminoglicanos (PG e GAG) de acordo com as respectivas colorações evidenciadoras. Verhoeff (VHF); Weigert-Van Gieson (WVG); Tricromio Masson (TMA); Picrosirius Red (PCR); Azul de Toluidina (ATO); Alcian Blue (ALB). e = elastina; κ = colágeno. A1: Quantificação de cada coloração em relação a cada tumor. A2: Quantificação dos componentes visualizados nas colorações especiais em relação a cada tumor. B: Comparação entre tumores

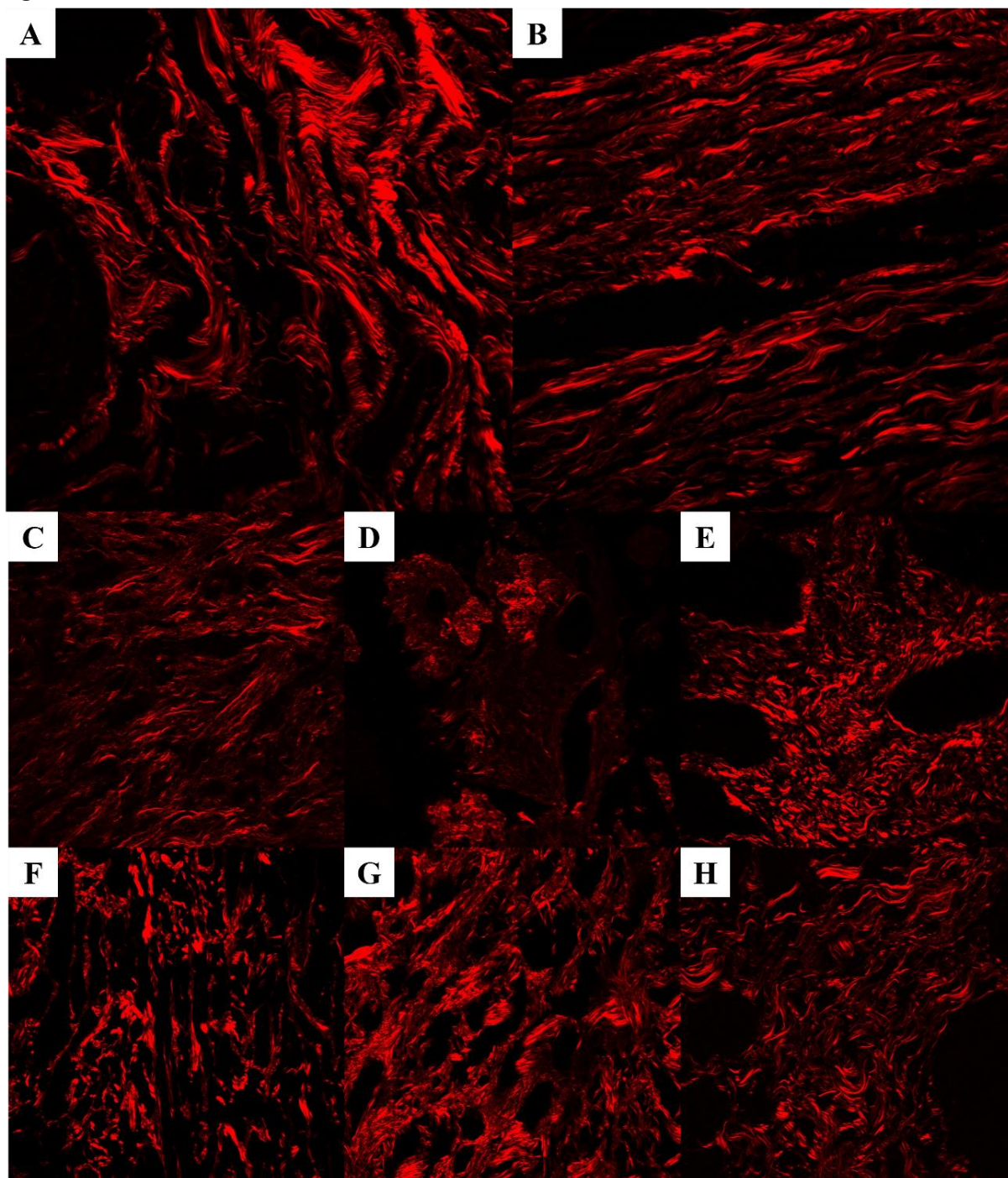
benignos e malignos com diferenciação mioepitelial em relação aos componentes da MEC observados pelas colorações especiais.

Os casos de AP e ME foram classificados como hiper ou hipocelularizados. Do AP, 3 (60%) casos eram hipocelularizados e 2 (40%) hipercelularizados. Todos os 5 (100%) casos de ME se apresentaram hipercelularizados. Essa classificação permitiu a observação de que nos casos em que os tumores eram hipocelularizados havia maior quantidade de componentes da MEC positivos para marcação quando comparados aos tumores ou às regiões com hipercelularidade.

5.3. GSH

Todos os casos tiveram pelo menos uma área de colágeno capturadas através da GSH (Figura 20). Foram avaliadas as variáveis fração de área e nível de cinza como variáveis de primeira ordem, e contraste e entropia como variáveis de segunda ordem. Quanto a fração de área, a região extratumoral apresentou valores maiores do que a região intratumoral (Tabela 5 e Figura 21)($p = <0,0001$). Isso se estendeu para os níveis de cinza, em que comparando a região extratumoral, houve significância quando a comparação foi feita com AP ($p = <0,0001$), ME ($p = <0,0001$), CAC ($p = 0,0254$), CDS ($p = <0,0001$) e CEM ($p = <0,0001$), enquanto no CM não houve diferença estatística.

Figura 20 – GSH dos TGS



A: Região extratumoral; B: Cápsula; C: Adenoma pleomórfico; D: Mioepitelioma; E: Carcinoma adenoide cístico; F: Carcinoma mioepitelial; G Carcinoma epitelial-mioepitelial; H: Carcinoma do ducto salivar. [400x]. Colágeno em vermelho, cor aleatória.

Quanto aos descritores de segunda ordem (Tabela 6; Figura 20), a região extratumoral apresentou valores estatisticamente significativos maiores do que a região intratumoral quando comparados ao AP ($p = <0,0001$), ME ($p = 0,0003$), CDS ($p = <0,0001$) e CM ($p = 0,0106$). A entropia foi maior no grupo extratumoral quando comparada ao AP ($p = <0,0001$) CDS ($p =$

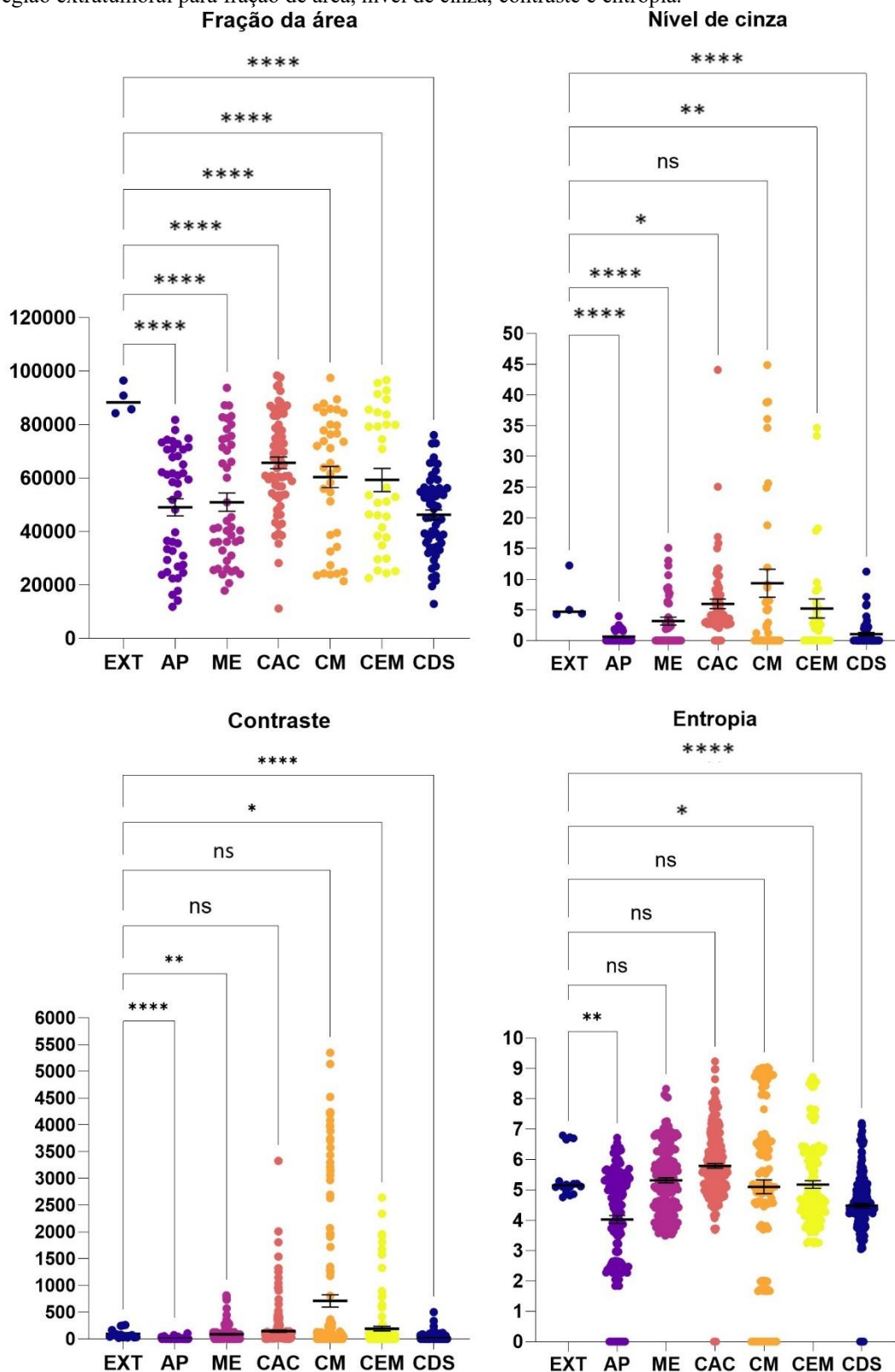
<0,0001) e CEM (p = 0,027). Os demais tumores (ME, CAC e CM) não apresentaram diferença estatística quando feita a comparação.

Tabela 5 – Variáveis avaliadas utilizando a GSH para observação de fibras colágenas entre a região intratumoral e extratumoral.

Tumor	Variáveis	Intratumor	Extratumor	Valor de P
AP	Fração de área	49072 ±21356	89342 ±5526	<0,0001*
	Níveis de cinza	0,62 ±1,02	6,481 ±3,84	<0,0001*
	Contraste	6,03 ±12,09	95,46 ±86,342	<0,0001*
	Entropia	4,02 ±5,80	5,46 ±0,76	<0,0001*
ME	Fração de área	50969 ±22857	89342 ±5526	<0,0001*
	Níveis de cinza	3,17 ±4,16	6,481 ±3,84	<0,0001*
	Contraste	87 ±163	95,46 ±86,342	0,003*
	Entropia	5,311 ±1,112	5,46 ±0,76	0,5331
CAC	Fração de área	65722 ±18110	89342 ±5526	<0,0001*
	Níveis de cinza	5,98 ±6,43	6,481 ±3,84	0,0254*
	Contraste	148 ±338	95,46 ±86,342	0,0886
	Entropia	5,78 ±1,24	5,46 ±0,76	0,1085
CM	Fração de área	60370 ±23916	89342 ±5526	<0,0001*
	Níveis de cinza	9,35 ±13,67	6,481 ±3,84	0,1699
	Contraste	711 ±1362	95,46 ±86,342	0,2222
	Entropia	5,09 ±2,72	5,46 ±0,76	0,0369
CEM	Fração de área	59258 ±24693	89342 ±5526	<0,0001*
	Níveis de cinza	5,23 ±8,92	6,481 ±3,84	0,0001*
	Contraste	192 ±484	95,46 ±86,342	0,0106*
	Entropia	5,178 ±5,17	5,46 ±0,76	0,027*
CDS	Fração de área	46216 ±14508	89342 ±5526	<0,0001*
	Níveis de cinza	1,04 ±2,12	6,481 ±3,84	<0,0001*
	Contraste	13,42 ±45,82	95,46 ±86,342	<0,0001*
	Entropia	4,47 ±1,16	5,46 ±0,76	<0,0001*

Grupos: Intratumor – Adenoma pleomórfico (AP) n=176; Mioepitelioma (ME) n= 176; Carcinoma adenoide cístico (CAC) n= 272; Carcinoma mioepitelial (CM) n=144; Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM) n=128; Carcinoma do ducto salivar (CDS) n=240 e Extratumor n=16. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste Mann Whitney - *p<0,05, Intratumor vs. Extratumor. Teste de Mann-Whitney

Figura 21 – Gráficos de distribuição dos valores obtidos através da GSH nos TGS comparado aos valores da região extratumoral para fração de área, nível de cinza, contraste e entropia.



Grupos: Intratumor – Adenoma pleomórfico (AP) n=176; Mioepitelioma (ME) n= 176; Carcinoma adenoide cístico (CAC) n= 272; Carcinoma mioepitelial (CM) n=144; Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM) n=128; Carcinoma do ducto salivar (CDS) n=240 e Extratumor n=16. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste Mann-Whitney - * $p < 0,05$, Intratumor vs. Extratumor. Teste de Mann-Whitney

As comparações realizadas entre o grupo intratumor e cápsula só ocorreram em tumores cuja presença de capsula fazia parte de suas características morfológicas (AP, ME e CM). Foi possível observar que a fração de área foi maior no grupo cápsula quando comparado com cada um dos tumores ($p = <0,0001$). Os níveis de cinza acompanharam essa observação AP ($p = <0,0001$), ME ($p = <0,0001$) e CM ($p = 0,0049$). O contraste foi maior no grupo cápsula em comparação ao grupo intratumor em cada um dos casos AP ($p = <0,0001$), ME ($p = <0,0001$) e CM ($p = 0,104$). Quanto à entropia os valores foram superiores no AP ($p = 0,0042$) e ME ($p = <0,0001$) e em CM não houve diferença estatística (Tabela 6).

Tabela 6 – Variáveis avaliadas utilizando a GSH para observação de fibras colágenas entre a região intratumoral e cápsula.

Tumor	Variável	Intratumor	Cápsula	Valor de P
AP	Fração de área	49072 $\pm$ 21356	76937 $\pm$ 16992	<0,0001*
	Níveis de cinza	0,62 $\pm$ 1,02	5,9 $\pm$ 3,07	<0,0001*
	Contraste	6,03 $\pm$ 12,09	116,26 $\pm$ 131,2	<0,0001*
	Entropia	4,02 $\pm$ 5,80	5,8 $\pm$ 0,71	0,0042*
ME	Fração de área	50969 $\pm$ 22857	76937 $\pm$ 16992	<0,0001*
	Níveis de cinza	3,17 $\pm$ 4,16	5,9 $\pm$ 3,07	<0,0001*
	Contraste	87 $\pm$ 163	116,26 $\pm$ 131,2	<0,0001*
	Entropia	5,311 $\pm$ 1,112	5,8 $\pm$ 0,71	<0,0001*
CM	Fração de área	60370 $\pm$ 23916	76937 $\pm$ 16992	<0,0001*
	Níveis de cinza	9,35 $\pm$ 13,67	5,9 $\pm$ 3,07	0,0049*
	Contraste	711 $\pm$ 1362	116,26 $\pm$ 131,2	0,0104*
	Entropia	5,09 $\pm$ 2,72	5,8 $\pm$ 0,71	0,6328

Intratumor vs. Cápsula. Grupos: Intratumor – Adenoma pleomórfico (AP) n=176; Mioepitelioma (ME) n= 176; Carcinoma mioepitelial (CM) e Cápsula (n=96);. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste Mann Whitney - * $p < 0,05$.

Quando os tumores foram comparados entre si (Tabela 7), observou-se para fração de área que CAC foi obtiver a maior média, significativamente maior do que o AP ($p = 0,0017$), ME ($p = 0,008$), e CDS ($p = <0,0001$).

Para o nível de cinza, o CM apresentou a maior média, sendo significativo entre AP ($p = 0,0008$) e CDS ($p = 0,0032$). O CAC foi segundo a maior média, sendo significativamente maior do que o AP, ME e CDS ($p = <0,0001$). O AP foi a menor média contra todos os tumores, exceto o CDS e ME.

Sobre o contraste, o CM obteve a maior média em comparação com AP ($p = <0,0001$), CAC ($p = <0,0001$), e CDS ($p = <0,0001$). O AP obteve a menor média dentre os tumores ($p = <0,0001$), com exceção do CDS.

Quanto à entropia, o CAC apresentou a maior média em comparação com todos os tumores (AP, CDS e CM $p = <0,0001$; ME $p = 0,0002$; CM $p = 0,0003$). O AP exibiu a menor média em comparação a todos os tumores, com exceção ao CDS (ME, CAC e CM $p = <0,0001$; CEM $p = 0,0020$).

Tabela 7 – Comparação dos TGS entre si

Tumor / Variável	Fração de área	Nível de cinza	Contraste	Entropia
AP	49072 ± 21356	0,62 ± 1,02	6,03 ± 12	4,02 ± 1,71
ME	50969 ± 22857	3,17 ± 4,16	87 ± 163 ^A	5,31 ± 1,11 ^A
CAC	65722 ± 18110 ^{AB}	5,98 ± 6,43 ^{AB}	148 ± 338 ^{AB}	5,78 ± 1,24 ^{AB}
CM	60370 ± 23916 ^D	9,35 ± 13,6 ^{AD}	711 ± 1362 ^{ACD}	5,09 ± 2,72 ^{ACD}
CEM	59258 ± 24693	5,23 ± 8,92 ^{AD}	192 ± 484 ^{ACD}	5,17 ± 1,39 ^{ACD}
CDS	46216 ± 14508 ^C	1,04 ± 2,12 ^C	13,4 ± 45,8 ^{BC}	4,47 ± 1,16 ^{BC}

Adenoma pleomórfico (AP) n=176; Mioepitelioma (ME) n= 176; Carcinoma adenoide cístico (CAC) n= 272; Carcinoma mioepitelial (CM) n=144; Carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM) n=128; Carcinoma do ducto salivar (CDS) n=240; ^A vs. AP; ^B vs. ME; ^C vs. CAC; ^D vs. CDS. Presença das letras indica que houve significância na comparação. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn - * $p = <0,05$.

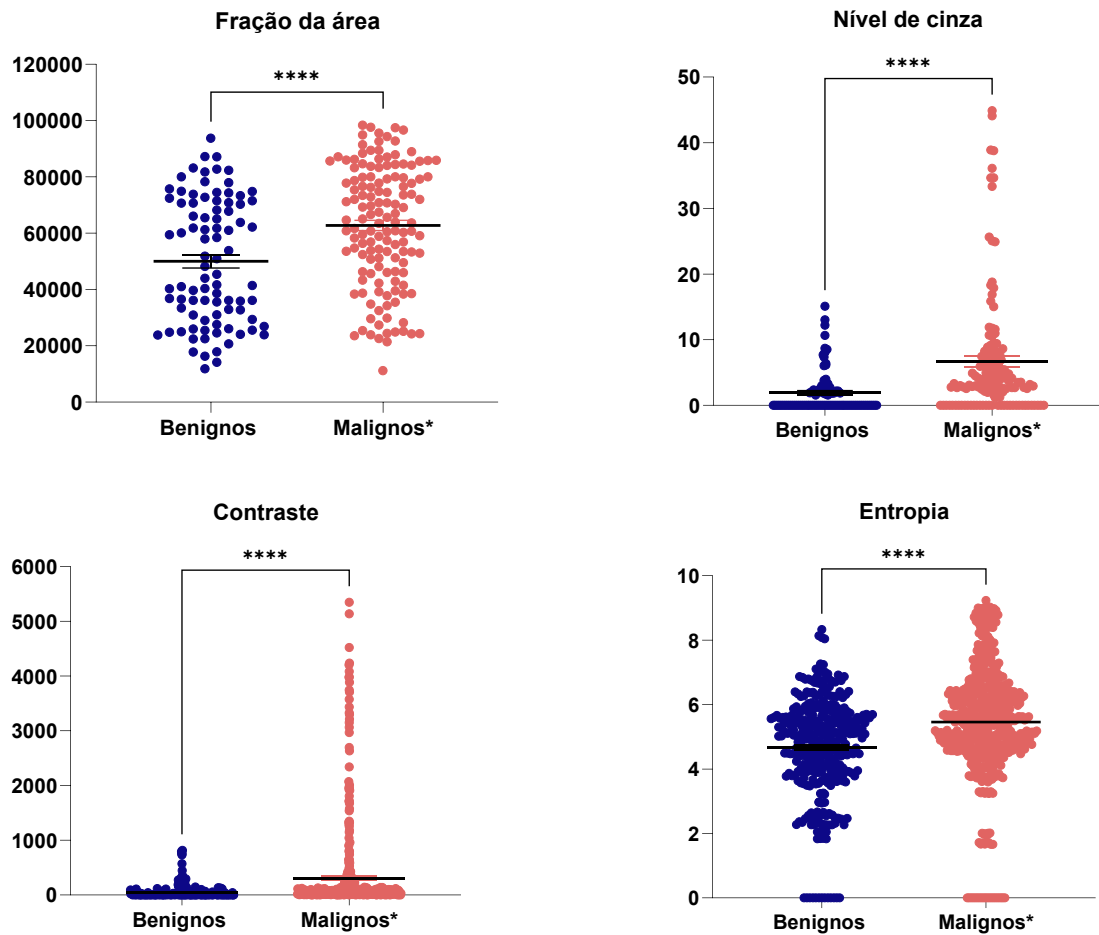
Estes mesmos parâmetros foram comparados na região intratumoral entre os tumores com diferenciação mioepitelial para grupos benignos e malignos, e os tumores malignos apresentaram resultados mais elevados do que os benignos. Houve diferença estatística significativa ($p = <0,0001$) em todas as avaliações (fração de área, níveis de cinza, contraste e entropia) (Tabela 8; Figura 22).

Tabela 8 – Comparação entre tumores benignos e malignos com diferenciação mioepitelial.

Tumor / Variável	Benignos	Malignos	Valor de P
Fração de área	50020 ± 22012	62785 ± 21446	<0,0001*
Níveis de cinza	1,89 ± 3,27	6,7 ± 9,48	<0,0001*
Contraste	46,51 ± 122,96	307 ± 812	<0,0001*
Entropia	4,66 ± 1,58	5,46 ± 1,81	<0,0001*

Grupos: Benignos (adenoma pleomórfico e mioepitelioma) n= 352; Malignos (carcinoma adenoide cístico, carcinoma mioepitelial, carcinoma epitelial-mioepitelial) n= 544. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste Mann Whitney - * $p < 0,05$

Figura 22 – Comparação entre tumores benignos e malignos com diferenciação mioepitelial



Grupos: Benignos (adenoma pleomórfico e mioepitelioma) n= 352; Malignos (carcinoma adenoide cístico, carcinoma mioepitelial, carcinoma epitelial-mioepitelial) n= 544. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste Mann Whitney - * $p < 0,05$

6. DISCUSSÃO

Os TGS fazem parte do grupo mais heterogêneo de neoplasias. Parte disso, é resultado da participação de células mioepiteliais e sua grande variedade morfológica em muitos tumores. Apesar de diferentes em aspectos morfológicos, moleculares e de origem, afetam as glândulas salivares como passo inicial para a progressão do tumor. Isso indica que é possível que compartilhem mecanismos de ataque e resposta adaptativa entre si. Os TGS com diferenciação mioepitelial têm origem similar, e apesar de seu papel enquanto célula hígida ter indícios de supressão tumoral, quando alterada, a célula mioepitelial pode participar da produção da MEC tumoral auxiliando na progressão do tumor (Chitturi, 2015; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). A MEC é uma rede de macromoléculas que influencia o microambiente tumoral, a sinalização celular, a angiogênese, a invasão e a metástase, além de afetar a resposta imunológica (Atiakshin et al., 2020). Aqui, caracterizamos o perfil de componentes de TGS benignos e malignos através de colorações histoquímicas e GSH.

Apesar de ser uma amostra selecionada, o perfil clínico-patológico dos tumores estudados foi em sua maioria correspondente ao que a literatura descreve. AP e ME que são tumores benignos (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023), com a maior parte dos tumores ocorrendo na glândula parótida e em pacientes do sexo feminino. As células mioepiteliais nestes tumores se apresentam de forma variada, nos casos aqui descritos, foi possível observar a presença de células epitelioides, fusiformes, claras e plasmocitoides. A presença dessas células pode estar relacionada também ao tipo de estroma ao seu redor, o que por sua vez pode retratar os componentes da MEC que compõe toda essa região. Quanto ao estroma, foram observadas áreas com os três tipos descritos: mixoide, hialino e condroide, sendo o último como característica exclusiva do AP (Ito FA, Jorge J, Vargas PA, 2009; Triantafyllou et al., 2015).

Quanto aos tumores malignos, O CAC apresentou diferença na população, sendo mais comum em homens neste trabalho e acometendo em especial o palato, diferente do que usualmente a literatura aponta (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). O estroma hialino esteve presente em todos os casos e o mixoide em 40% deles. Os componentes ductais podem se organizar em três tipos de arranjo: tubular, cribriforme e sólido, podendo haver mais de um padrão em um mesmo tumor. A forma mais comum é o padrão cribriforme, que esteve presente em todos os casos deste trabalho. O padrão tubular foi encontrado em 80% dos casos e o sólido em apenas 20%, sendo este último relacionado com tumores mais agressivos (Bradley, 2004; Rodriguez-Russo et al., 2021; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023; Young and Okuyemi, 2022; ZUPANCIC et al., 2024). O CAC um tumor que usualmente apresenta

relato de invasão às estruturas adjacentes, neste trabalho houve invasão angiolinfática e neural, características relacionadas a maior agressividade do tumor (ZUPANCIC et al., 2024).

As informações clínicas sobre o CM nos casos deste trabalho, estiveram presentes em apenas duas ocasiões, dificultando a correlação dos achados com os registros da literatura. As células tumorais se organizam em padrões arquitetônicos sólidos, trabeculares e reticulares (Kong et al., 2015; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023; Xu and Katabi, 2021) podendo apresentar subtipos fenotípicos como células claras, epitelioides, plasmocitoide e fusiformes (Ali et al., 2020; Kong et al., 2015; Wang et al., 2015; Xu and Katabi, 2021). Neste trabalho foi possível observar a presença de áreas de padrão sólido, cordonal, reticular e trabecular, além de uma grande diversidade de fenótipos celulares (Kong et al., 2015; B. Xu & Katabi, 2021). Já o CEM, apresentou achados correspondentes à literatura que indica uma leve predileção pelo sexo feminino e pela sexta e sétima década de vida (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Histopatologicamente, o CEM exibe um padrão multinodular com arranjo bifásico ou em dupla camada, com uma camada periférica de células mioepiteliais de citoplasma claro envolvendo uma camada epitelial que se assemelha a ductos intercalados (Nakaguro & Nagao, 2021), similar a nossos resultados. (Nakaguro and Nagao, 2021; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023).

Diferentemente dos demais casos deste trabalho, o CDS é um tumor que não apresenta diferenciação em células mioepiteliais. O CDS é uma neoplasia maligna agressiva que pode se apresentar *de novo* ou pela transformação maligna de um AP (Giridhar et al., 2022; Kohsaka et al., 2022; Kusafuka et al., 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Nesse trabalho, a amostra foi composta apenas de tumores *de novo*. O CDS geralmente acomete homens entre as sexta e sétima décadas de vida, com uma predileção pela parótida (WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023), similar aos dados encontrados nesse trabalho. Histopatologicamente, são observadas áreas com presença de grandes ductos com comedonecrose e características de pontes romanas (Alsanie et al., 2022; Delaine et al., 2023; Kusafuka et al., 2022; Wakely, 2022; WHO Classification of Tumors Editorial Board, 2023). Neste trabalho, essas características também foram observadas, além da presença de invasão neural e angiolinfática em todos os casos, o que demonstra a característica agressiva do tumor. Em nossos resultados, a maior parte dos pacientes com esse tumor evoluiu com metástase e óbito. É importante ressaltar que o CDS é um tumor agressivo, com alta taxa de mortalidade e metástases, (Giridhar et al., 2022; Kohsaka et al., 2022).

A MEC tem sido alvo de estudos em câncer devido sua função de suporte estrutural e regulação de funções celulares (Chitturi, 2015; Girigoswami et al., 2021). A MEC tem sido vista como

um interessante alvo terapêutico, já que ao atingir suas macromoléculas, as células neoplásicas perderiam suporte, sinalização intercelular e nutrição e consequentemente, levaria a morte celular. Nesse trabalho, com a técnica histoquímica de colorações especiais foi possível caracterizar a distribuição de alguns grupos de componentes da MEC em TGS.

As colorações de VHF e WVG foram usadas como equivalentes, pois marcavam de forma semelhante colágenos fibrilares (I e III) e elastina. A elastina tem função estrutural e está presente em diversos tecidos do corpo. Estudos apontam que em neoplasias podem ser importantes marcadores patológicos de sinalização e podem estimular a resposta imune local (Kristensen and Karsdal, 2016; Spaw et al., 2017). De acordo com a literatura, a presença de elastina em tumores de glândulas salivares é bem documentada (Triantafyllou et al., 2015), nosso trabalho apontou presença de elastina em todos os tipos de tumores estudados. Geralmente, a elastina é encontrada em maiores quantidades nas neoplasias densamente celulares e com menos diferenciação mixocondroide (Frantz et al., 2010; Grosso, 1996; Halper, 2021; Kristensen and Karsdal, 2016). Neste sentido, este trabalho demonstrou que os tumores classificados como hiper celulares, como o ME, apresentaram uma marcação mais alta de elastina em comparação com o AP, cuja classificação foi dividida entre hiper e hipocelular. De fato, o AP foi o tumor que demonstrou menor marcação para elastina, o que poderia ser explicado pela maior quantidade de estroma mixoide e condroide nos casos de AP em comparação com os casos de ME. Tumores de maiores extensões geralmente contêm áreas altamente fibrosas que se assemelham a cicatrizes densas, ricas em colágeno e elastina (Spaw et al., 2017). A deposição de colágeno também foi observada nas colorações de VHF e WVG, permitindo comparar a localização e distribuição de ambos os componentes em cada tumor. A técnica de WVG apresentou melhor resultado na visualização clara das fibras colágenas e elásticas, além de ser mais simples em comparação à técnica VHF.

Nesse trabalho, os tumores benignos apresentaram uma maior marcação para PG e GAG, quando comparados com os tumores malignos com diferenciação mioepitelial. O AP é um tumor cuja MEC foi documentada na literatura e apresenta conhecida presença de GAG em seu estroma (Triantafyllou et al., 2015), assim como foi observado no presente estudo. O estroma mixoide de vários tumores sólidos contém grandes quantidades de GAG, PG, fibronectina e tenascina-C, macromoléculas que podem, por si só, estimular a proliferação de células neoplásicas (Willems et al., 2010). Essas áreas podem ser resultado da degeneração mixoide dos colágenos. Nosso trabalho permitiu observar a presença de estroma mixoide em alguns casos e, através das colorações especiais, distinguiu os componentes dessa área como positivos para ATO e ALB, e negativos para as demais colorações.

Em contrapartida, a secreção de PG e GAG por mastócitos pode influenciar o colágeno, promovendo sua fibrilogênese, o que favorece o crescimento e a organização das fibrilas e favorece a sua organização. Os fibroblastos, localizados no estroma ou recrutados de tecidos vizinhos, são responsáveis por transcrever e secretar a maior parte do colágeno intersticial e organizar suas fibrilas ao aplicar tensão sobre a MEC (Frantz et al., 2010). Dessa forma é possível observar o papel duplo PG e GAG e sua relação com a organização, produção e degradação do colágeno (Sanegre et al., 2021). Quando a MEC se torna alterada por ocasião de uma neoplasia, as funções de seus componentes podem ser alteradas, se transformando assim, em substâncias que favorecem o tumor. Nesse caso, a diminuição de PG e GAG nos tumores malignos de glândulas salivares poderiam apontar a MEC alterada, principalmente para uma maior síntese de colágeno e promoção de invasão e metástase. GAG como a heparina, influenciam a morfologia das fibrilas e promovem sua agregação em fibrilas maiores, auxiliam na organização das fibrilas de colágeno e podem estimular a proliferação de fibroblastos dérmicos, influenciando também a síntese de colágeno (Atiakshin et al., 2020). O hialuronano, altamente expresso no câncer de mama, interage com células cancerígenas por meio dos receptores CD44 e RHAMM. O CD44, um marcador de células-tronco cancerosas, regula várias vias de sinalização, mediando a motilidade das células cancerígenas e aumentando a agressividade das células iniciadoras do câncer (Vahala and Choi, 2022).

A alta deposição de colágeno está associada ao desenvolvimento do tumor, disseminação, metástase, comportamento agressivo e quimiorresistência (Vahala and Choi, 2022). As colorações especiais utilizadas neste trabalho (VHF, WVG, TMA e PCR) foram capazes de destacar nos tecidos os colágenos tipo I e III. Foi observada a presença de colágeno em quase todos os tumores, o que é esperado, considerando que é o componente mais abundante da MEC. A quantidade de colágeno estava intimamente relacionada ao tipo de estroma presente e à organização celular. Em tumores hipocelularizados ou com estroma mais frouxo, observou-se uma maior quantidade de colágeno compondo a MEC, enquanto tumores com arranjo mais sólido ou hipercelular apresentaram menor quantidade desse componente. Sanegre e colaboradores (2021) destacam a distribuição aumentada dos colágenos tipos I, mais maduro e organizado, e III, imaturo e menos organizado, em diversos tumores como carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço, mama, pâncreas e câncer colorretal.

Além da observação da distribuição do colágeno nos tumores, VHF, WVG, TMA e PCR foram importantes direcionadores para seleção das áreas positivas para colágeno para a captura de sinal de GSH. Neste trabalho, as lâminas histológicas utilizadas para a captura do sinal de GSH foram coradas em HE. A emissão do sinal de GSH ocorre tanto de forma refletida quanto

transmitida em tecidos biológicos. Na pele humana, onde as fibras colágenas normais têm entre 0,5 e 3 μm , o sinal refletido é especialmente intenso. Amostras finas (com menos de 1 mm) permitem captar ambos os sinais com alta qualidade, enquanto amostras mais espessas só permitem a captação do sinal refletido devido ao forte espalhamento da luz incidente, o que diminui a intensidade do sinal transmitido. Estudos de textura que utilizam sinais de GSH de fibras colágenas produzem resultados mais precisos com grandes aumentos de imagem, pois isso proporciona maior resolução (Cicchi et al., 2013). Assim, neste estudo, foram utilizadas amostras finas (cortes histológicos de 4 μm).

A avaliação através do GSH é um método simples e objetivo, que permite realizar análises comparativas entre diferentes áreas e, assim, observar as diferenças entre as regiões de interesse. Os descritores de primeira ordem fornecem dados sobre a intensidade dos pixels, sem considerar a relação espacial entre eles. Em contraste, os descritores de segunda ordem oferecem informações adicionais sobre a estrutura e a textura (Zeitoune et al., 2017). Este estudo comparou o colágeno na região intratumoral com a cápsula e a região extratumoral de seis TGS diferentes. Os resultados revelaram que o colágeno na região intratumoral exibiu menor intensidade de sinal e densidade em comparação com as outras áreas, indicando uma organização menos densa e menos organizada do colágeno nos tumores em comparação com as regiões extratumorais. Diversos estudos apontam características distintas entre tumores em regiões variadas do corpo, como mama, ovário, pulmão, trato gastrointestinal, cérebro e pele (de Andrade Natal et al., 2021; Keikhosravi et al., 2014), porém, a comparação das áreas intratumoral e extratumoral em outros tipos de tumores confirma os achados deste estudo (Chen et al., 2014; Laurito, 2019; Liu et al., 2014; Wu et al., 2018). Em contrapartida, foram encontrados em tumores de pulmão (Xu et al., 2013) e gástricos (Zhou et al., 2017) intensidade de sinal maiores nas regiões intratumorais. É importante destacar que os valores obtidos na região extratumoral altos diferenciam o colágeno tumoral do fisiológico, realçando os diferentes papéis desse componente de acordo com sua integridade (Devendra et al., 2018). O colágeno maduro e bem-organizado é uma estrutura que contribui para conter o tumor, como exemplificado pela cápsula associada a uma matriz extracelular mais rígida, que está relacionada a uma progressão tumoral mais lenta. A ideia de que o colágeno desempenha um papel nos processos de migração celular e invasão se aplica principalmente ao colágeno degenerado (Devendra et al., 2018). Essa degradação do colágeno pode ser realizada através da ação das MMPs, já tendo sido observado em estudos anteriores sua ação no CAC (Jaeger et al., 2008). Como o sinal do GSH depende da integridade desses colágenos, a degradação do colágeno pelas MMPs poderia comprometer a captura do sinal (Kim et al., 2000).

A literatura aponta para a rica composição da MEC tumoral para o colágeno tipo I e III, como é bioquimicamente distinta em sua composição e é mais rígida do que a MEC normal (Sanegre et al., 2021). O colágeno tipo III, por ser mais jovem e permeável às células tumorais, contrasta com o colágeno tipo I, que, por ser mais maduro e rígido, proporciona resistência estrutural (Sivridis et al., 2004). As fibras reticulares são compostas por colágeno tipo III envolvido por um material interfibrilar rico em carboidratos. Neste trabalho as fibras reticulínicas estiveram presentes em quase todos os tumores em alguma quantidade, sendo o CM com a maior média de marcação. Pode-se imaginar que sua função de sustentação do tecido a torne um importante componente da MEC tumoral, já que com as alterações nas fibras elásticas e colágenas sua propriedade de resistência à tração é valiosa (Bancroft and Layton, 2013; Puchtler and Waldrop, 1978). Interessantemente, o CM apresentou uma baixa marcação global para colágeno I/III na marcação por outras colorações como VHF, WVG e TMA, podendo sinalizar que nesse tumor o colágeno tipo III tenha uma maior participação na composição tumoral. É importante ressaltar que há um aumento no colágeno tipo III em tecidos durante a cicatrização, ficando semelhante ao estroma de tumores sólidos, o que torna esses achados esperados na MEC (Laurito, 2019). Isso justifica os resultados de nosso estudo, onde a coloração RET foi intensa na maioria dos tumores, especialmente nos malignos. Além disso, explica a diferença de sinal no GSH entre a região extratumoral, onde foi significativamente maior do que na região intratumoral, devido à menor capacidade do colágeno tipo III em fornecer um bom sinal de GSH.

A literatura aponta para a possibilidade de que as fibras colágenas associadas a tumores podem favorecer a progressão tumoral através de efeitos bioquímicos e biomecânicos sobre as células neoplásicas (Adur et al., 2014b; de Andrade Natal et al., 2021). O aumento da deposição de colágeno tipo III na interface entre o estroma normal e tumoral e a diminuição do colágeno tipo I configura um estroma modificado que induz a angiogênese. Apesar disso, os novos vasos não são hígidos e permitem o transporte das células tumorais à outras regiões, caracterizando o processo de metástase (Sivridis et al., 2004). Devendra e colaboradores (2018) avaliaram através da coloração de PCR uma série de CEC orais e identificaram um padrão de birrefringência do colágeno tipo I nos tumores de bordas contínuas, em uma tentativa de evitar a invasão tumoral. Em contrapartida, em tumores de bordas descoesas as fibras que envolviam o tumor se tratavam de finas, frouxas e desorganizadas fibras de colágeno tipo III. Nossos resultados de GSH apontam uma maior deposição de colágeno de forma anormal em tumores malignos, contribuindo com os achados de alterações no colágeno durante a progressão tumoral (Adur et al., 2014b; Zeitoune et al., 2017).

Juengsomjit e colaboradores (2022), demonstraram através de TMA e PCR que tumores malignos apresentavam maior quantidade de expressão de colágeno do que tumores benignos. Em nossos resultados, observamos que o colágeno apresentou quantidades semelhantes em ambos os grupos de tumores. No entanto, ao analisarmos um recorte pelo método de GSH, notamos que, embora houvesse uma maior quantidade de colágeno nos tumores benignos, ele ocupava uma área menor. Isso sugere um colágeno menos compacto, com fibras menos espessas, o que pode explicar a maior expressão global nos tumores benignos em comparação aos malignos, apesar de ocuparem menos área no GSH. Além disso, observou-se uma variação menor na espessura das fibras nos tumores benignos, indicando um colágeno mais uniforme em comparação aos malignos. Essa falta de homogeneidade no colágeno pode formar espaços que caracterizam uma textura variada, favorecendo o processo de migração celular e invasão nos tumores malignos. (Sivridis et al., 2004).

O estudo de Allon e colaboradores (2006) comparou CAC, carcinoma mucoepidermoide e AP, explorando a distinção entre tumores benignos e malignos através da avaliação do colágeno utilizando birrefringência. Eles observaram que os tumores malignos também exibiram estroma menos compactado e fibras colágenas com espessura mais variável em comparação aos benignos. A discrepância entre as características do colágeno observadas nas colorações especiais e no GSH pode ser explicada pela presença de estroma mixoide. Estudos na literatura sugerem que a diminuição do sinal de GSH nestes casos pode ser atribuída à dissociação do colágeno fibrilar, causada por edema ou degeneração mixoide (Laurito, 2019). A relação entre a espessura das fibras de colágeno e sua função efetiva nos tumores precisa ser mais estudada para melhor compreender sua influência nos desfechos tumorais. É importante destacar que a literatura sugere que o colágeno tipo I diminui à medida que a displasia aumenta. (Devendra et al., 2018) .

Em uma análise individual dos tumores malignos, o CAC e o CDS demonstraram expressão de PG e GAG baixa e altos níveis de colágeno. Já no recorte do GSH o CDS e o CAC apresentaram característica opostas: o CAC foi o tumor que apresentou maior fração de área e mais heterogeneidade de textura, enquanto o CDS foi o que apresentou menor fração de área e com expressão mais homogênea de suas fibras colágenas. Já o CM apresentou maiores valores de nível de cinza e contraste, apontando para fibras espessas, mas com maior variação em seu diâmetro. A literatura aponta que tumores que não apresentaram metástase, as fibras colágenas se organizaram de forma mais compacta (Devendra et al., 2018). Curiosamente, em nossa amostra, quatro pacientes com CDS apresentaram metástase, em contraste com dois pacientes com CAC. Além disso, o CDS é o único tumor de nossa amostra que não possui a célula

mioepitelial em sua composição. A célula mioepitelial, além de participar na produção da MEC, pode expressar um fenótipo supressor de tumor com a produção de proteinases e fatores antiangiogênicos (Shah et al., 2016).

A imagem GSH é eficaz para visualizar o colágeno, porém não é prática para uso rotineiro comparada às técnicas de histologia como colorações especiais. Estudos indicam que o PCR pode correlacionar-se bem com os achados do GSH, especialmente na avaliação do alinhamento das fibras de colágeno. Drifka e colaboradores (2016) investigaram essa relação e encontraram uma marcação mais intensa no PCR. Este estudo também utilizou duas técnicas de avaliação de colágeno, destacando diferenças que podem ser atribuídas aos tipos específicos de colágeno observados em cada método: as colorações especiais evidenciam colágenos tipos I e III, enquanto o GSH detecta principalmente os tipos I e II. Apesar dessas diferenças, o colágeno tipo I é observado em ambas as técnicas e é o principal componente da MEC. O uso combinado de PCR e TMA surge como uma alternativa promissora, oferecendo uma maneira mais prática e econômica de visualizar o colágeno, ampliando a importância da avaliação do colágeno como estrutura com potencial prognóstico. No entanto, é fundamental ressaltar que as técnicas utilizadas não permitem uma análise específica do padrão de distribuição das substâncias, mas sim uma avaliação geral dos grupos aos quais elas pertencem. Apesar das marcações positivas para colágenos, elastina, PG e GAG, não é aconselhável fazer inferências detalhadas sobre os elementos individuais sem o uso de técnicas mais específicas, como a imuno-histoquímica, para uma diferenciação mais precisa.

Uma compreensão mais profunda das interações moleculares presentes entre as moléculas da matriz, bem como as interações célula-matriz modificadas e seus efeitos na sinalização celular são fundamentais para avanços no desenvolvimento de meios de tratamento de MEC como alvo terapêutico. A importância da MEC na progressão de doenças malignas está bem documentada, portanto, o direcionamento da MEC para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas surge como uma perspectiva atraente. Diversas pequenas moléculas e anticorpos foram desenvolvidos e testados para a inibição de enzimas que degradam a MEC e consequentemente modificam a progressão das alterações geradas a partir da condição anormal da MEC em cada situação. E embora a documentação da importância da MEC esteja solidificada, muitos tumores não possuem uma caracterização da MEC registrada na literatura. A compreensão do papel da célula mioepitelial na MEC pode torná-la não apenas um alvo terapêutico, mas também auxiliar no avanço de pesquisas que melhorem o entendimento da etiologia e do processo de desenvolvimento de tumores benignos e malignos nas glândulas salivares.

7. CONCLUSÃO

Foi possível confirmar a correspondência dos perfis clínico-patológicos dos TGS com a literatura existente. As técnicas histoquímicas de colorações especiais permitiram caracterizar a MEC dos tumores, destacando a presença de elastina, colágeno e outros componentes em diferentes proporções. Os tumores benignos mostraram maior expressão de PG e GAG quando comparado com os malignos.

A análise do GSH é uma ampliação do que foi destacado na histoquímica e demonstrou possíveis mecanismos de invasão e metástase quanto à organização estrutural e tipo de colágeno. Os resultados revelaram que o colágeno intratumoral apresentava menor intensidade e densidade de sinal em comparação com a região extratumoral. Em tumores malignos, o colágeno foi depositado em maior quantidade, porém com alterações no diâmetro e homogeneidade. O CAC apresentou maior marcação para colágeno, porém, com fibras com maior variação de diâmetro, assim como o CM. O CDS apresentou menor quantidade de marcação para colágeno, além de fibras mais homogêneas. Dentre os tumores benignos, o AP apresentou fibras menores, mais variáveis e heterogêneas.

A caracterização histoquímica e a análise do colágeno nos TGS fornecem informações sobre a heterogeneidade e os mecanismos de progressão desses tumores, destacando a importância da MEC na biologia tumoral. Estudos futuros devem focar na compreensão das funções específicas dos componentes da MEC para desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes.

REFERÊNCIAS

- Abu-Ghanem Y, Mizrachi A, Popovtzer A, Abu-Ghanem N, Feinmesser R. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland: Institutional experience and review of the literature. *J Surg Oncol* 2016;114:714–8. <https://doi.org/10.1002/jso.24392>.
- Adur J, Carvalho HF, Cesar CL, Casco VH. Nonlinear Microscopy Techniques: Principles and Biomedical Applications. *Microsc. Anal., InTech*; 2016. <https://doi.org/10.5772/63451>.
- Adur J, Carvalho HF, Cesar CL, Casco VH. Nonlinear Optical Microscopy Signal Processing Strategies in Cancer. *Cancer Inform* 2014a;13:CIN.S12419. <https://doi.org/10.4137/CIN.S12419>.
- Adur J, Pelegati VB, de Thomaz AA, Baratti MO, Andrade LALA, Carvalho HF, et al. Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer. *J Biophotonics* 2014b;7:37–48. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200108>.
- Aleman JD, Young CD, Karam SD, Wang X. Revisiting laminin and extracellular matrix remodeling in metastatic squamous cell carcinoma: What have we learned after more than four decades of research? *Mol Carcinog* 2023;62:5–23. <https://doi.org/10.1002/mc.23417>.
- Ali J, Munawar S, Haider R, Ahmad AN, Hashmi AA. Myoepithelial Carcinoma of the Floor of the Mouth: A Rare Salivary Gland Tumor in an Unusual Location. *Cureus* 2020;12. <https://doi.org/10.7759/cureus.12321>.
- Allon I, Vered M, Buchner A, Dayan D. Stromal differences in salivary gland tumors of a common histopathogenesis but with different biological behavior: A study with picrosirius red and polarizing microscopy. *Acta Histochem* 2006;108:259–64. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2006.05.007>.
- Alsanie I, Rajab S, Cottom H, Adegun O, Agarwal R, Jay A. Distribution and Frequency of Salivary Gland Tumours : An International Multicenter Study. *Head Neck Pathol* 2022;41–5. <https://doi.org/10.1007/s12105-022-01459-0>.
- Alves VLA, Pérez-de-Oliveira ME, de Castro JFL, Vieira CL, Leão JC, Perez DE da C. Intraoral Pleomorphic Adenoma in Young Patients. *J Craniofac Surg* 2018;29:e209–11. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000004259>.
- de Andrade Natal R, Adur J, Cesar CL, Vassallo J. Tumor extracellular matrix: lessons from the second-harmonic generation microscopy. *Surg Exp Pathol* 2021;4:7.

<https://doi.org/10.1186/s42047-021-00089-0>.

de Angelis CM, de Lima-Souza RA, Scarini JF, Egal ESA, do Amaral-Silva GK, de Oliveira Gondak R, et al. Immunohistochemical Expression of Fatty Acid Synthase (FASN) is Correlated to Tumor Aggressiveness and Cellular Differentiation in Salivary Gland Carcinomas. *Head Neck Pathol* 2021;15:1119–26. <https://doi.org/10.1007/s12105-021-01319-3>.

Araújo VC, Demasi APD, Furuse C, Altemani A, Alves VA, Freitas LL, et al. Collagen Type I may Influence the Expression of E-Cadherin and Beta-catenin in Carcinoma Ex-pleomorphic Adenoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17:312–8. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3181946ea6>.

Arora SK, Sharma N, Bhardwaj M. Epithelial Myoepithelial Carcinoma of Head and Neck Region. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;65:163–6. <https://doi.org/10.1007/s12070-011-0414-4>.

Atallah S, Marc M, Schernberg A, Huguet F, Wagner I, Mäkitie A, et al. Beyond Surgical Treatment in Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck: A Literature Review 2022:1879–90.

Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cells and collagen fibrillogenesis. *Histochem Cell Biol* 2020;154:21–40. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01875-9>.

Bancroft JD, Layton C. Connective and mesenchymal tissues with their stains. *Bancroft's Theory Pract. Histol. Tech.*, Elsevier; 2013, p. 187–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4226-3.00011-1>.

Bento PM, Freitas R de A, Pinto LP, de Souza LB. Tenascin and fibronectin in pleomorphic adenoma of the salivary gland. *J Appl Oral Sci* 2006;14:198–202. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572006000300010>.

Bradley PJ. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12:127–32. <https://doi.org/10.1097/00020840-200404000-00013>.

Campagnola P. Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics. *Anal Chem* 2011;83:3224–31. <https://doi.org/10.1021/ac1032325>.

Campagnola PJ, Millard AC, Terasaki M, Hoppe PE, Malone CJ, Mohler WA. Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous

Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophys J* 2002;82:493–508. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75414-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75414-3).

Cannone S, Greco MR, Carvalho TMA, Guizouarn H, Soriani O, Di Molfetta D, et al. Cancer Associated Fibroblast (CAF) Regulation of PDAC Parenchymal (CPC) and CSC Phenotypes Is Modulated by ECM Composition. *Cancers (Basel)* 2022;14:3737. <https://doi.org/10.3390/cancers14153737>.

Chen WS, Wang Y, Liu NR, Zhang JX, Chen R. Multiphoton microscopic imaging of human normal and cancerous oesophagus tissue. *J Microsc* 2014;253:79–82. <https://doi.org/10.1111/jmi.12102>.

Chitturi RT. Myoepithelial Cells (MEC) of the Salivary Glands in Health and Tumours. *J Clin DIAGNOSTIC Res* 2015. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11372.5707>.

Cicchi R, Vogler N, Kapsokalyvas D, Dietzek B, Popp J, Pavone FS. From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy. *J Biophotonics* 2013;6:129–42. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200092>.

Clause KC, Barker TH. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:830–3. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.011>.

Delaine E, Avagnina A, Yerly S, Fontanella S, Hedjoudje A, Hallak B, et al. Intraductal Carcinoma of the Parotid Gland as a Rare Neoplasm: A Case Report and Literature Review. *Ethiop J Health Sci* 2023;33:173–6. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v33i1.21>.

Devendra A, Niranjana KC, Swetha A, Kaveri H. Histochemical analysis of collagen reorganization at the invasive front of oral squamous cell carcinoma tumors. *J Investig Clin Dent* 2018;9. <https://doi.org/10.1111/jicd.12283>.

Dombrowski ND, Wolter NE, Irace AL, Cunningham MJ, Vargas SO, Perez-Atayde AR, et al. Pleomorphic adenoma of the head and neck in children: presentation and management. *Laryngoscope* 2019;129:2603–9. <https://doi.org/10.1002/lary.27590>.

Félix A, Costa Rosa J, Fonseca I, Cidadão A, Soares J. Laminin and collagen IV in pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: An immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1999;30:964–9. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(99\)90251-4](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(99)90251-4).

Fonseca FP, de Vasconcelos Carvalho M, de Almeida OP, Rangel ALCA, Takizawa MCH, Bueno AG, et al. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern

Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114:230–9. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.04.008>.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010;123:4195–200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.

G. K. Rasmussen D, Karsdal MA. Laminins. *Biochem. Collagens, Laminins Elastin*, Elsevier; 2016, p. 163–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00029-5>.

Giridhar P, Gupta P, Mallick S, Upadhyay AD, Rath GK. Impact of adjuvant therapy on survival in patients with myoepithelial carcinoma: A systematic review and individual patient data analysis of 691 patients. *Radiother Oncol* 2019;140:125–30. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.06.017>.

Giridhar P, Venkatesulu BP, Yoo R, V P, Rath GK, Mallick S, et al. Demography, patterns of care, and survival outcomes in patients with salivary duct carcinoma: an individual patient data analysis of 857 patients. *Futur Sci OA* 2022;8:FSO791. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2021-0052>.

Girigoswami K, Saini D, Girigoswami A. Extracellular Matrix Remodeling and Development of Cancer. *Stem Cell Rev Reports* 2021;17:739–47. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10070-1>.

Glabman RA, Choyke PL, Sato N. Cancer-Associated Fibroblasts: Tumorigenicity and Targeting for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 2022;14:3906. <https://doi.org/10.3390/cancers14163906>.

Gore MR. Epithelial-myoepithelial carcinoma: A population-based survival analysis. *BMC Ear, Nose Throat Disord* 2018;18:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12901-018-0063-2>.

Grosso LE. Synthesis of elastin by pleomorphic adenomas. *J Oral Pathol Med* 1996;25:5–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1996.tb01215.x>.

Halper J. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Elastin, Fibrillins, Fibulins, Matrilins, Tenascins and Thrombospondins, 2021, p. 105–26. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80614-9_4.

Horobin RW. How histological stains work. *Bancroft's Theory Pract. Histol. Tech.*, Elsevier; 2013, p. 157–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4226-3.00009-3>.

Huang J, Zhang L, Wan D, Zhou L, Zheng S, Lin S, et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6:153. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00544-0>.

Ito FA, Jorge J, Vargas PA LM. Histopathological findings of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009.

Jaeger RG, Scarabotto-Neto N, Azambuja N, Freitas VM. Secretion of collagen I and tenascin is modulated by laminin-111 in 3D culture of human adenoid cystic carcinoma cells. *Int J Exp Pathol* 2008;89:98–105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00571.x>.

Juengsomjit, Rachai et al. Polarized Microscopic Analysis of Picrosirius Red Stained Salivary Gland Pathologies: An Observational Study. *European Journal of Dentistry*, v. 16, n. 04, p. 930-937, 2022.

Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J* 2021;288:6850–912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>.

Karsdal M. Biochemistry of collagens, laminins and elastin: structure, function and biomarkers. Second. Elsevier; 2023.

Keikhosravi A, Bredfeldt JS, Sagar AK, Eliceiri KW. Second-harmonic generation imaging of cancer, 2014, p. 531–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00028-8>.

Kim BM, Eichler J, Reiser KM, Rubenchik AM, Da Silva LB. Collagen structure and nonlinear susceptibility: Effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers Surg Med* 2000;27:329–35. [https://doi.org/10.1002/1096-9101\(2000\)27:4<329::AID-LSM5>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1096-9101(2000)27:4<329::AID-LSM5>3.0.CO;2-C).

Kinoshita I, Jin D, Higashino M, Terada T, Kurisu Y, Takai S, et al. Increase in Chymase-Positive Mast Cells in Recurrent Pleomorphic Adenoma and Carcinoma Ex Pleomorphic Adenoma of the Parotid Gland. *Int J Mol Sci* 2021;22:12613. <https://doi.org/10.3390/ijms222312613>.

Kohsaka S, Tada Y, Ando M, Nakaguro M, Shirai Y, Ueno T, et al. Identification of novel prognostic and predictive biomarkers in salivary duct carcinoma via comprehensive molecular profiling. *NPJ Precis Oncol* 2022;6:82. <https://doi.org/10.1038/s41698-022-00324-1>.

Kong M, Drill EN, Morris L, West L, Klimstra D, Gonen M, et al. Prognostic Factors in

Myoepithelial Carcinoma of Salivary Glands. *Am J Surg Pathol* 2015;39:931–8. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000452>.

Kristensen JH, Karsdal MA. Elastin. *Biochem. Collagens, Laminins Elastin*, Elsevier; 2016, p. 197–201. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00030-1>.

Kusafuka K, Sato Y, Nakatani E, Baba S, Maeda M, Yamanegi K, et al. The implicated clinical factors for outcomes in 304 patients with salivary duct carcinoma: Multi-institutional retrospective analysis in Japan. *Head Neck* 2022;44:1430–41. <https://doi.org/10.1002/hed.27034>.

Kuwabara H, Nishikado A, Hayasaki H, Isogai Z, Yoneda M, Kawata R, et al. Characteristic Formation of Hyaluronan-Cartilage Link Protein-Proteoglycan Complex in Salivary Gland Tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2016;24:373–81. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000198>.

Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, et al. Picrosirius Red Staining. *J Histochem Cytochem* 2014;62:751–8. <https://doi.org/10.1369/0022155414545787>.

Laurito TL. Carcinoma de células de merkel: estudo morfométrico das fibras de colágeno do ambiente tumoral através de microscopia óptica não linear por geração de segundo harmônico. Universidade Estadual de Campinas, 2019.

Liu NR, Chen GN, Wu SS, Chen R. Distinguishing human normal or cancerous esophagus tissue ex vivo using multiphoton microscopy. *J Opt* 2014;16:025301. <https://doi.org/10.1088/2040-8978/16/2/025301>.

Lourenço S V, Kapas S, Williams DM, Leite K, Araújo VC. Expression patterns of integrins on pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma: study on specimens and in vitro investigation of the effects of extracellular matrix on the expression of these adhesion molecules. *J Oral Pathol Med* 2004;33:574–80. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2004.00239.x>.

Luo Y. Myoepithelial carcinoma of major salivary glands: Analysis of population-based clinicopathologic and prognostic features. *Transl Oncol* 2022;20:101410. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101410>.

Malik R, Lelkes PI, Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol* 2015;33:230–6.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.01.004>.

Mariz BALA, Socorro Queiroz Feio P, Roza ALOC, Andrade BAB, Agostini M, Romañach MJ, et al. Clinical predictors of malignancy in palatal salivary gland tumors. *Oral Dis* 2019;25:1919–24. <https://doi.org/10.1111/odi.13181>.

Mazumder N, Balla NK, Zhuo G-Y, Kistenev Y V., Kumar R, Kao F-J, et al. Label-Free Non-linear Multimodal Optical Microscopy—Basics, Development, and Applications. *Front Phys* 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fphy.2019.00170>.

Mckenzie J, Lockyer J, Singh T, Nguyen E. Salivary gland tumours: an epidemiological review of non-neoplastic and neoplastic pathology. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2023;61:12–8. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2022.11.281>.

Mireles MG, Julián A, Salgado-Chavarría F, González GM. Benign myoepithelioma of the soft palate: an unusual clinical entity. *BMJ Case Rep* 2021;14:3–7. <https://doi.org/10.1136/bcr-2020-240384>.

Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J Cell Biochem* 2019;120:2782–90. <https://doi.org/10.1002/jcb.27681>.

Nakaguro M, Nagao T. Epithelial–Myoepithelial Carcinoma. *Surg Pathol Clin* 2021;14:97–109. <https://doi.org/10.1016/j.path.2020.10.002>.

Okuyama K, Michi Y, Kashima Y, Tomioka H, Hirai H, Yokokawa M, et al. Epithelial-myoeplithelial carcinoma of the minor salivary glands: Case series with comprehensive review. *Diagnostics* 2021;11:1–11. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11112124>.

Olivier N, Luengo-Oroz MA, Duloquin L, Faure E, Savy T, Veilleux I, et al. Cell Lineage Reconstruction of Early Zebrafish Embryos Using Label-Free Nonlinear Microscopy. *Science* (80-) 2010;329:967–71. <https://doi.org/10.1126/science.1189428>.

Pérez-de-Oliveira ME, Leonel ACL da S, de Castro JFL, Carvalho EJ de A, Vargas PA, Perez DE da C. Histopathological Findings of Intraoral Pleomorphic Adenomas: A Retrospective Study of a Case Series. *Int J Surg Pathol* 2019;27:729–35. <https://doi.org/10.1177/1066896919854181>.

Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 2014;15:1243–53. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>.

- Prentø P. Staining of macromolecules: possible mechanisms and examples. *Biotech Histochem* 2009;84:139–58. <https://doi.org/10.1080/10520290902908810>.
- Puchtler H, Waldrop FS. Silver impregnation methods for reticulum fibers and reticulin: A re-investigation of their origins and specificity. *Histochemistry* 1978;57:177–87. <https://doi.org/10.1007/BF00492078>.
- Raitz R, Martins MD, Araújo VC. A study of the extracellular matrix in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 2003;32:290–6. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2003.00019.x>.
- Rodriguez-Russo CA, Junn JC, Yom SS, Bakst RL. Radiation Therapy for Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck. *Cancers (Basel)* 2021;13:6335. <https://doi.org/10.3390/cancers13246335>.
- Rout SK, Lath MK. Pleomorphic Adenoma of the Whole Parotid Gland. *J Craniofac Surg* 2013;24:2197–8. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3182a2b787>.
- Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev Biol* 2010;341:126–40. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>.
- Sanegre S, Eritja N, de Andrea C, Diaz-Martin J, Diaz-Lagares Á, Jácome MA, et al. Characterizing the Invasive Tumor Front of Aggressive Uterine Adenocarcinoma and Leiomyosarcoma. *Front Cell Dev Biol* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.670185>.
- Schüler SC, Liu Y, Dumontier S, Grandbois M, Le Moal E, Cornelison D, et al. Extracellular matrix: Brick and mortar in the skeletal muscle stem cell niche. *Front Cell Dev Biol* 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1056523>.
- Schumacher U, Adam E. Standardization of Staining in Glycosaminoglycan Histochemistry: Alcian Blue, its Analogues, and Diamine Methods. *Biotech Histochem* 1994;69:18–24. <https://doi.org/10.3109/10520299409106256>.
- Scott JE. Histochemistry of Alcian blue. *Histochemie* 1972;32:191–212. <https://doi.org/10.1007/BF00306028>.
- Shah AK, Mulla A, Mayank M. Pathophysiology of myoepithelial cells in salivary glands. *J Oral Maxillofac Pathol* 2016;20:480. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.190952>.
- Shi H, Wang J, Dong F, Wang X, Li H, Hou Y. The effect of proteoglycans inhibited by RNA interference on metastatic characters of human salivary adenoid cystic carcinoma. *BMC Cancer*

2009;9:456. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-456>.

Shintani S, Alcalde RE, Matsumura T, Terakado N. Extracellular matrices expression in invasion area of adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Cancer Lett* 1997;116:9–14. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)04730-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)04730-7).

Shrestha P, Sumitomo S, Ogata K, Yamada K, Takai Y, Yang L, et al. Immunoreactive tenascin in tumours of salivary glands: Evidence for enhanced expression in tumour stroma and production by tumour cells. *Eur J Cancer Part B Oral Oncol* 1994;30:393–9. [https://doi.org/10.1016/0964-1955\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0964-1955(94)90018-3).

Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. “Stromatogenesis” and Tumor Progression. *Int J Surg Pathol* 2004;12:1–9. <https://doi.org/10.1177/106689690401200101>.

Spaw M, Anant S, Thomas SM. Stromal contributions to the carcinogenic process. *Mol Carcinog* 2017;56:1199–213. <https://doi.org/10.1002/mc.22583>.

Strupler M, Pena A-M, Hernest M, Tharaux P-L, Martin J-L, Beaurepaire E, et al. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Opt Express* 2007;15:4054. <https://doi.org/10.1364/OE.15.004054>.

Sunardhi-Widyaputra S, Van Damme B. Distribution of the VLA Family of Integrins in Normal Salivary Gland and in Pleomorphic Adenoma. *Pathol - Res Pract* 1994;190:600–8. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(11\)80398-5](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(11)80398-5).

Tan BF, Chang W, Tan C, Wang FQ, Lechner M, Scharfetter VH, et al. PSMA PET Imaging and Therapy in Adenoid Cystic Carcinoma and Other Salivary Gland Cancers : A Systematic Review 2022:1–19.

Tas J. The Alcian Blue and combined Alcian Blue-Safranin O staining of glycosaminoglycans studied in a model system and in mast cells. *Histochem J* 1977;9:205–30. <https://doi.org/10.1007/BF01003632>.

Tchekmedyan V. Salivary Gland Cancers. *Hematol Clin NA* 2021;35:973–90. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.05.011>.

Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J* 2019;286:2830–69. <https://doi.org/10.1111/febs.14818>.

Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv*

Drug Deliv Rev 2016;97:4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.

Triantafyllou A, Thompson LDR, Devaney KO, Bell D, Hunt JL, Rinaldo A, et al. Functional Histology of Salivary Gland Pleomorphic Adenoma: An Appraisal. *Head Neck Pathol* 2015;9:387–404. <https://doi.org/10.1007/s12105-014-0581-1>.

Vahala D, Choi YS. Modelling the Tumor Microenvironment: Recapitulating Nano- and Micro-Scale Properties that Regulate Tumor Progression. *Front Cell Dev Biol* 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.908799>.

Vázquez A, Patel TD, Daguillo CM, Abdou RY, Farver W, Baredes S, et al. Epithelial-Myoepithelial Carcinoma of the Salivary Glands. *Otolaryngol - Head Neck Surg (United States)* 2015;153:569–74. <https://doi.org/10.1177/0194599815594788>.

Vidal B de C, Mello MLS. Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications. *Acta Histochem* 2019;121:101–12. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.11.005>.

Wagner VP, Martins MD, Genari B, do Amaral FB, Maciel AC, Martins MAT, et al. Diagnostic Challenge of a Deep Minor Salivary Gland Neoplasm. *Case Rep Otolaryngol* 2014;2014:1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/608267>.

Wakely PE. Salivary duct carcinoma: A report of 70 FNA cases and review of the literature. *Cancer Cytopathol* 2022;130:595–608. <https://doi.org/10.1002/cncy.22568>.

Wang C, Zhang Z, Ge Y, Liu Z, Sun J, Gao Z, et al. Myoepithelial carcinoma of the salivary glands: A clinicopathologic study of 29 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2015;73:1938–45. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2015.03.054>.

Wang F, Li B, Wang Y, Shen Y, Yang H. Clinical and pathological analysis of 10 cases of salivary gland epithelial-myoepithelial carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 2020;99:e22671. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022671>.

WHO Classification of Tumors Editorial Board. Head and neck tumors. 5th ed. Lion (France): Internacional Agency for Research on Cancer; 2023.

Wick MR. Histochemistry as a tool in morphological analysis: a historical review. *Ann Diagn Pathol* 2012;16:71–8. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2011.10.010>.

Willems SM, Wiweger M, van Roggen JFG, Hogendoorn PCW. Running GAGs: myxoid matrix in tumor pathology revisited. *Virchows Arch* 2010;456:181–92.

<https://doi.org/10.1007/s00428-009-0822-y>.

Wu C, Gu J, Gu H, Zhang XiaoXin, Zhang Xu, Ji R. The recent advances of cancer associated fibroblasts in cancer progression and therapy. *Front Oncol* 2022;12:1008843. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1008843>.

Wu S, Huang Y, Li Z, Wu H, Li H. Collagen Features of Dermatofibrosarcoma Protuberans Skin Base on Multiphoton Microscopy. *Technol Cancer Res Treat* 2018;17:153303381879677. <https://doi.org/10.1177/1533033818796775>.

Xiao CC, Baker AB, White-Gilbertson SJ, Day TA. Prognostic factors in myoepithelial carcinoma of the major salivary glands. *Otolaryngol - Head Neck Surg (United States)* 2016;154:1047–53. <https://doi.org/10.1177/0194599816637605>.

Xu B, Katabi N. Myoepithelial Carcinoma. *Surg Pathol Clin* 2021;14:67–73. <https://doi.org/10.1016/j.path.2020.09.008>.

Xu X, Cheng J, Thrall MJ, Liu Z, Wang X, Wong STC. Multimodal non-linear optical imaging for label-free differentiation of lung cancerous lesions from normal and desmoplastic tissues. *Biomed Opt Express* 2013;4:2855. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.002855>.

Young A, Okuyemi OT. Benign Salivary Gland Tumors 2022;1:1–15.

Zeitoune AA, Luna JS, Sanchez Salas K, Erbes L, Cesar CL, Andrade LA, et al. Epithelial Ovarian Cancer Diagnosis of Second-Harmonic Generation Images: A Semiautomatic Collagen Fibers Quantification Protocol. *Cancer Inform* 2017;16:117693511769016. <https://doi.org/10.1177/1176935117690162>.

Zhou Z-H, Ji C-D, Xiao H-L, Zhao H-B, Cui Y-H, Bian X-W. Reorganized Collagen in the Tumor Microenvironment of Gastric Cancer and Its Association with Prognosis. *J Cancer* 2017;8:1466–76. <https://doi.org/10.7150/jca.18466>.

Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 2003;21:1369–77. <https://doi.org/10.1038/nbt899>.

Zupancic M, Näsman A, Friesland S, Dalianis T. Adenoid Cystic Carcinoma, Clinical Presentation, Current Treatment and Approaches Towards Novel Therapies. *Anticancer Res* 2024;44:1325–34. <https://doi.org/10.21873/anticancer.16929>.

APÊNDICE 1 PROTOCOLOS DE COLORAÇÕES ESPECIAIS

Hematoxilina e Eosina

Desparafinizar e reidratar;

Corar em hematoxilina de Harris por 3 minutos;

Lavar em água corrente;

Diferenciar as lâminas em solução amoniacal 0,1 %, somente passagem;

Lavar em água corrente;

Contra corar em eosina por 2 minutos;

Lavar em água corrente;

Desidratar, diafanizar e montar.

Resultado: Roxo – Núcleo | Rosa – Citoplasma e tecidos conjuntivo

Protocolo de reagentes:

HEMATOXILINA DE HARRIS (q.s.p 2000 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	2000 ml
Ácido acético glacial	8 ml
Álcool etílico absoluto	100 ml
Hematoxilina	10 g
Óxido de mercúrio amarelado	5 g
Sulfato de alumínio e potássio	200 g

- Dissolver 200 g de sulfato alumínio em água destilada e aquecer até levantar fervura;
- Dissolver 10 g de hematoxilina em álcool etílico e adicionar cuidadosamente na solução de sulfato de alumínio em ebulição;
- Deixar ferver por 5 minutos, agitando a solução esporadicamente;
- Retirar do aquecimento e acrescentar em porções pequenas 5 g de óxido de mercúrio amarelado;
- Deixar ferver por mais 5 minutos e deixar resfriar até a temperatura ambiente;
- Adicionar 8 ml de ácido acético e agitar;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

SOLUÇÃO AMONIACAL (q.s.p 2000 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	1998 ml
Hidróxido de amônio	2 ml

- a) Diluir 2 ml de hidróxido de amônio em água destilada e agitar;
- b) Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

EOSINA (q.s.p 2000 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	420 ml
Ácido acético glacial	8 ml
Álcool etílico absoluto	1580 ml
Eosina	5 g

- a) Dissolver 5 g de eosina em 100 ml de água destilada;
- b) Adicionar 1580 ml de álcool etílico absoluto e agitar;
- c) Acrescentar 320 ml de água destilada;
- d) Adicionar 8 ml de ácido acético glacial e agitar;
- e) Etiqueta e armazenar em temperatura ambiente (validade 3 meses).

Verhoeff

Desparafinizar e reidratar;

Preparar a solução de Verhoeff e deixar agir por 15 minutos sobre os cortes;

Hematoxilina alcoólica 1 ml

Álcool etílico absoluto 1 ml

Cloreto férrico 10%) 1 ml

Iodo de Verhoeff 1 ml

Lavar em água corrente por 20 minutos;

Diferenciar em solução de cloreto férrico 2%) com controle microscópico. Fibras elásticas devem estar negras e o fundo cinza;

Submeter as lâminas a solução de tiosulfato de sódio 5%) por 1 minuto;

Salvar a solução e lavar as lâminas em água destilada;

Contra corar com solução de Van Gieson por 1 minuto;

Salvar a solução e lavar as lâminas em água destilada;

Desidratar, diafanizar e montar.

Resultado: Preto – Fibras elásticas e núcleo | Vermelho – Colágeno | Amarelo – Outras estruturas

Protocolo de reagentes:

HEMATOXILINA ALCOÓLICA (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Álcool etílico absoluto	100 ml
Hematoxilina	10 g

- Dissolver 10 g de hematoxilina em álcool etílico absoluto;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

CLORETO FÉRRICO 10% (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Cloreto férrico	10 g

- Dissolver 10 g de cloreto férrico em água destilada;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

IODO DE VERHOEFF (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Iodeto de potássio	4 g
Iodo	2 g

- Misturar 4 g de iodeto de potássio e 2 g de iodo;
- Acrescentar água destilada vagarosamente e agitar até dissolução;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

CLORETO FÉRRICO 2% (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Cloreto férrico	2 g

- Dissolver 2 g de cloreto férrico em água destilada;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

TIOSSULFATO DE SÓDIO (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Tiossulfato de sódio	5 g

- Dissolver 5 g de tiossulfato de sódio em água destilada;

b) Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses);

VAN GIESON (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Ácido pícrico	1,2 g
Fucsina ácida	0,05 g

a) Dissolver 1,2 g de ácido pícrico em água destilada;

b) Acrescentar 0,05 g de fucsina ácida e misturar bem;

c) Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

Weigert-Van Gieson

Desparafinizar e reidratar;

Preparar solução de Hematoxilina de Weigert e deixar por 10 minutos;

Hematoxilina alcoólica 1 ml

Solução cloreto férrico 1 ml

Lavar em água corrente;

Passar em álcool absoluto;

Corar com corante de Weigert por 30-60 minutos;

Salvar o corante e lavar as lâminas em água corrente;

Corar com corante de Van Gieson por 30 segundos;

Salvar o corante e lavar as lâminas em água corrente;

Desidratar, diafanizar e montar.

Resultado: Azul escuro – Fibras elásticas | Róseo a vermelho – Colágeno | Amarelo – Outros elementos

Protocolo de reagentes:

HEMATOXILINA DE WEIGERT (q.s.p 100 ml)

SOLUÇÃO A

Reagentes	Medidas
Álcool etílico absoluto	100 ml
Hematoxilina	1 g

a) Dissolver 1 g de hematoxilina em álcool etílico absoluto;

b) Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

SOLUÇÃO B

Reagentes	Medidas
Água destilada	99 ml
Ácido clorídrico	1 ml
Cloreto férrico	1,16 g

- Dissolver 1,16 g de cloreto férrico em água destilada;
- Acrescentar 1 ml de ácido clorídrico e agitar;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

WEIGERT (q.s.p 200 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	225 ml
Ácido clorídrico	4 ml
Álcool etílico absoluto	250 ml
Cloreto férrico	7,25 g
Fucsina básica	2 g
Resorcina	4 g

- Dissolver 2 g de fucsina básica em 100 ml de água destilada;
- Dissolver 4 g de resorcina em 100 ml água destilada;
- Misturar as duas soluções em cápsula de porcelana e deixar ebulir por 1 minuto;
- Dissolver 7,25 g de cloreto férrico em 25 ml de água destilada e acrescentar na solução já resfriada;
- Filtrar a solução, desprezando o líquido;
- Abrir o papel filtro na cápsula de porcelana e levar à estufa até secagem;
- Adicionar no precipitado seco, 200 ml de álcool etílico absoluto e aquecer até dissolução completa;
- Após esfriar, acrescentar 4 ml de ácido clorídrico e completar o volume de 200 ml com álcool etílico;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

VAN GIESON (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Ácido pícrico	1,2 g
Fucsina ácida	0,05 g

- a) Dissolver 1,2 g de ácido pícrico em água destilada;
- b) Acrescentar 0,05 g de fucsina acida e misturar bem;
- c) Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

Picrosirius Red

Desparafinizar e reidratar

Corar com solução de Picrosirius Red por 1 hora

Lavar em água corrente

Submeter a solução tampão por 3 minutos

Lavar em água corrente

Corar com hematoxilina de Weigert por 3 minutos

Lavar em água corrente

Desidratar, diafanizar e montar

Resultado: Vermelho – Colágeno | Roxo – citoplasma, núcleo e outros componentes

Tricromio Masson

Desparafinizar e reidratar;

Imergir por 30 minutos na solução de Bouin

Lavar em água corrente

Preparar a hematoxilina de Weigert e corar por 10 minutos;

Hematoxilina alcoólica 1 ml

Solução cloreto férrico 1 ml

Lavar em água corrente;

Corar pela solução de escarlata de Biebrich por 6 minutos;

Salvar o corante e lavar as lâminas em água corrente;

Diferenciar com a solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico por 5 minutos;

Salvar o corante e lavar as lâminas em água corrente;

Corar com solução de azul de anilina por 7 minutos;

Salvar o corante e lavar as lâminas em água corrente;

Desidratar, diafanizar e montar.

Protocolo de reagentes:

HEMATOXILINA DE WEIGERT (q.s.p 100 ml)SOLUÇÃO A

Reagentes	Medidas
Álcool etílico absoluto	100
Hematoxilina	1 g

- Dissolver 1 g de hematoxilina em álcool etílico absoluto;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

SOLUÇÃO B

Reagentes	Medidas
Água destilada	99 ml
Ácido clorídrico	1 ml
Cloreto férrico	1,16 g

- Dissolver 1,16 g de cloreto férrico em água destilada;
- Acrescentar 1 ml de ácido clorídrico e agitar;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

ESCARLATE DE BIEBRICH (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Ácido acético glacial	1 ml
Escarlate de Biebrich	0,9 g
Fucsina ácida	0,1 g

- Dissolver 0,9 g de escarlate de Biebrich em 90 ml de água destilada;
- Dissolver 0,1 g de fucsina ácida em 10 ml de água destilada;
- Misturar as duas soluções e adicionar 1 ml de ácido acético;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

ÁCIDO FOSFOTÚNGSTICO-FOSFOMOLIBDÍCO (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Ácido fosfotúngstico	2,5 g
Ácido fosfomolibdico	2,5 g

- Dissolver 2,5 g de ácido fosfomolibdico em água destilada;
- Acrescentar 2,5 g de ácido fosfotúngstico e agitar até dissolução;

c) Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

AZUL DE ANILINA (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Ácido acético glacial	2 ml
Azul de anilina	2,5 g

a) Dissolver 2,5 g de azul de anilina em água destilada;

b) Acrescentar 2 ml de ácido acético e agitar;

c) Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses).

Resultado: Preto – Núcleo | Vermelho – Citoplasma, | Azul – Colágeno

Reticulina

Desparafinizar e reidratar;

Oxidar em permanganato de potássio 0,5%) por 5 minutos;

Salvar a solução e lavar as lâminas em água corrente;

Realizar a diferenciação em solução de ácido oxálico 2%) por 5 minutos;

Salvar a solução e lavar as lâminas em água corrente;

Sensibilizar os tecidos em solução de sulfato de amônio férrico 2%) por 5 minutos;

Salvar a solução e lavar as lâminas em água corrente;

Passar em 3 banhos de água destilada;

Cobrir os cortes com solução de prata amoniacal, filtrando-a e deixando agir por 30 segundos;

Lavar em água destilada;

Submeter as lâminas a solução de formol 20%) por 5 minutos;

Salvar a solução e lavar as lâminas em água corrente

Submeter as lâminas a solução de cloreto de ouro 0,2%) por 5 minutos;

Salvar a solução e lavar as lâminas em água corrente;

Submeter as lâminas a solução de tiosulfato de sódio 2%) por 5 minutos;

Salvar a solução e lavar as lâminas em água corrente;

Desidratar, diafanizar e montar.

Resultado: Preto – Fibras reticulares

Protocolo de reagentes:

PERMANGANATO DE POTÁSSIO (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Permanganato de potássio	0,5 g

- Dissolver 0,5 g de permanganato de potássio em água destilada;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses);

ÁCIDO OXÁLICO (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Ácido oxálico	2 g

- Dissolver 2 g de ácido oxálico em água destilada;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses);

SULFATO DE AMÔNIO FÉRRICO (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Sulfato de amônio férrico	2 g

- Dissolver 2 g de sulfato de amônio férrico em água destilada;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses);

PRATA AMONIACAL (q.s.p 125 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	125 ml
Hidróxido de amônio	2 ml
Hidróxido de potássio	2,5 g
Nitrato de prata	10 g

- Dissolver 10 g de nitrato de prata em 100 ml de água destilada;
- Dissolver 2,5 g de hidróxido de potássio em 25 ml de água destilada;
- Misturar as duas soluções;
- Adicionar hidróxido de amônio gota a gota na mistura até que o precipitado formado se dilua;
- Etiquetar e armazenar em geladeira (validade de 2 semanas);

FORMOL (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	80 ml
Formol	20 ml

- Diluir 20 ml de formol em água destilada;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses);

CLORETO DE OURO (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Cloreto de ouro	0,2 g

- Dissolver 0,2 g de cloreto de ouro em água destilada;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses);

TIOSSULFATO DE SÓDIO (q.s.p 100 ml)

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Tiossulfato de sódio	2 g

- Dissolver 2 g de tiossulfato de sódio em água destilada;
- Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses);

Azul de toluidina

Desparafinizar e reidratar;

Corar pelo Azul de toluidina por 30 minutos;

Salvar o corante e lavar as lâminas em água destilada;

Cobrir os cortes com uma gota de água destilada e lamínula;

Passar base (esmalte) nas bordas da lamínula.

Resultado: Rósea - substância metacromática (mucopolissacarídeos, PG e ácido hialurônico).

Protocolo de reagentes:AZUL DE TOLUIDINA (q.s.p. 100 ml):

Reagentes	Medidas
Água destilada	100 ml
Azul de toluidina	0,1 g

- Dissolver 0,1 g de azul de toluidina na água destilada e agitar;

b) Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses);

Alcian Blue

Desparafinizar e reidratar;

Corar pelo Azul de Alcian por 1 hora (o corante deve ter sido mantido sob refrigeração;

Salvar o corante e lavar as lâminas em água corrente;

Contra corar pela Safranina por 5 minutos;

Lavar em água corrente;

Desidratar, diafanizar e montar.

Resultado: Azul – GAG e PG | Vermelho – núcleos | Rosa pálido – citoplasma

Protocolo de reagentes:

AZUL DE ALCIAN (q.s.p. 100 ml):

Reagentes	Medidas
Ácido acético glacial	3 ml
Água destilada	97 ml
Azul de alcian	1 g

a) Diluir 3 ml de ácido acético glacial em 97 ml de água destilada;

b) Dissolver 1 g de azul de alcian na solução de ácido acético 3%;

c) Etiquetar e armazenar em geladeira (validade de 3 meses);

SAFRANINA (q.s.p. 100 ml):

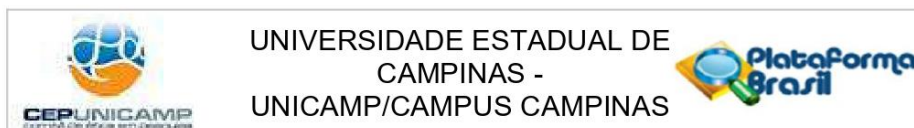
Reagentes	Medidas
Ácido acético glacial	3 ml
Água destilada	97 ml
Safranina	0,1 g

a) Diluir 3 ml de ácido acético glacial em 97 ml de água destilada;

b) Dissolver 0,1 g de Safranina na solução de ácido acético 3%;

c) Etiquetar e armazenar em temperatura ambiente (validade de 3 meses);

ANEXO 1 Aprovação no Comitê de Ética FCM–UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA MATRIZ EXTRACELULAR NOS TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES: UM ESTUDO MORFOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E

Pesquisador: Fernanda Viviane Mariano

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 76221523.7.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.687.359

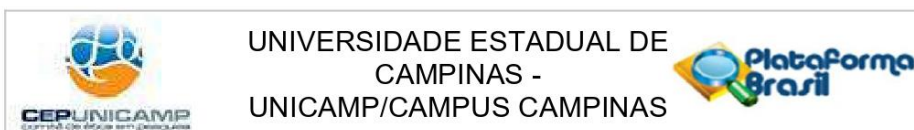
Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

Introdução:

Tumores de glândulas salivares Os tumores de glândulas salivares (TGS) compreendem um grupo de interesse na área da patologia oral e maxilofacial [1]. Esse grupo é constituído por tumores incomuns que representam cerca de 3-10% de todos os tumores de cabeça e pescoço [2] em uma incidência estimada entre 0,4 e 13,5 casos por 100.000 habitantes [3]. Apesar de incomuns, TGS são um grupo de neoplasias benignas e malignas com características clínicas e histopatológicas complexas. Um dos maiores desafios para o estabelecimento do diagnóstico dos TGS diz respeito a ampla variedade morfológica que as células das glândulas salivares podem apresentar [4], podendo levar a dificuldades no estabelecimento do diagnóstico histopatológico [5,6]. 1.1.1. Adenoma Pleomórfico O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia de glândula salivar mais comum, sendo definido como um tumor benigno com características arquiteturais e histopatológicas variáveis [7]. A maioria dos casos ocorre nas glândulas parótidas, enquanto o restante dos casos geralmente acometerem glândulas salivares menores e glândula submandibular [2]. O AP pode

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS -
UNICAMP/CAMPUS CAMPINAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA MATRIZ EXTRACELULAR NOS TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES: UM ESTUDO MORFOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E

Pesquisador: Fernanda Viviane Mariano

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 76221523.7.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.687.359

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

Introdução:

Tumores de glândulas salivares Os tumores de glândulas salivares (TGS) compreendem um grupo de interesse na área da patologia oral e maxilofacial [1]. Esse grupo é constituído por tumores incomuns que representam cerca de 3-10% de todos os tumores de cabeça e pescoço [2] em uma incidência estimada entre 0,4 e 13,5 casos por 100.000 habitantes [3]. Apesar de incomuns, TGS são um grupo de neoplasias benignas e malignas com características clínicas e histopatológicas complexas. Um dos maiores desafios para o estabelecimento do diagnóstico dos TGS diz respeito a ampla variedade morfológica que as células das glândulas salivares podem apresentar [4], podendo levar a dificuldades no estabelecimento do diagnóstico histopatológico [5,6]. 1.1.1. Adenoma Pleomórfico O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia de glândula salivar mais comum, sendo definido como um tumor benigno com características arquiteturais e histopatológicas variáveis [7]. A maioria dos casos ocorre nas glândulas parótidas, enquanto o restante dos casos geralmente acometerem glândulas salivares menores e glândula submandibular [2]. O AP pode

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br

ANEXO 2 Relatório de Similaridade

Tumores de glândulas salivares

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

13%	11%	5%	%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	www.repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	4%
2	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	3%
3	"Endokrine Chirurgie", Springer Science and Business Media LLC, 2023 Publicação	1%
4	teses.usp.br Fonte da Internet	<1%
5	ri.ufs.br Fonte da Internet	<1%
6	Stephanie Kenig Viveiros. "Levantamento epidemiológico das neoplasias de glândulas salivares menores do serviço de patologia oral e maxilofacial da Faculdade de Odontologia da USP", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2020 Publicação	<1%