



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

RAÍSA CAVALCANTE DOURADO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE
FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER EM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

Salvador

2016

RAÍSA CAVALCANTE DOURADO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE
FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER EM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - graduação em Odontologia e Saúde da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia e Saúde com área de concentração em Diagnóstico Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier.

Salvador
2016

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

D739 Dourado, Raísa Cavalcante.

Caracterização Imunoistoquímica de fibroblastos associados ao câncer em carcinoma epidermoide de boca / Raísa Cavalcante Dourado. - Salvador, 2016.

63 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, 2016.

1. Fibroblastos. 2. Marcadores biológicos de tumor. 3. Neoplasias bucais. 4. Carcinoma de células escamosas. 5. Imunofenotipagem. 6. Imuno-Histoquímica. 7. Histologia. I. Xavier, Flávia Caló de Aquino. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde. III. Título.

CDU: 616.31-006.6



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

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. RAÍSA CAVALCANTE DOURADO

“DETERMINAÇÃO DO IMUNOFENÓTIPO DE FIBROBLASTOS
ASSOCIADOS AO CÂNCER EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
BOCA”

BANCA EXAMINADORA:

Flávia Caló de Aquino Xavier

Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier (Orientadora)

Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Luciana Maria Pedreira Ramalho

Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho (Examinador Interno)

Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Deise Souza Vilas Bôas

Profa. Dra. Deise Souza Vilas Bôas (Examinador Externo)

Professora da Universidade Federal da Bahia - ICS

Dedico esse trabalho a Vinícios, pelo incentivo à realização desse sonho e apoio em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** e **guias espirituais** por nortearem minha vida.

Ao **Programa de Pós-graduação** em Odontologia e Saúde da UFBA, pela confiança e acolhimento,

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo imprescindível amparo financeiro.

Agradeço de maneira especial à minha orientadora **Professora Flávia Caló**, por ter me acolhido nesta instituição e guiado minha trajetória de forma tão cuidadosa. Sempre generosa, enriqueceu minha vida com ensinamentos científicos, e, sobretudo, éticos.

À Professora **Dra. Katiúcia Paiva** e **equipe do Laboratório da matriz extracelular – ICB/USP** pela oportunidade de aprendizado.

Aos **Professores Jean Nunes, Luciana Ramalho** e **Águida Henriques** pela dedicação à Pesquisa, ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFBA, e pela efetiva colaboração nesse trabalho,

Aos demais **Professores da Pós-graduação** pelos valiosos ensinamentos, em especial a **Professora Mariângela Matos**, pelo seu empenho em formar docentes mais humanizados e conscientes do seu papel transformador.

Aos meus pais **Aparecida Cavalcante** e **Daniel Dourado** pelo incentivo e amor,

Aos **meus irmãos** mais velhos **Brisa, Ícaro, Pérola** pelo exemplo, e aos mais novos **Lúri, Tagore, Ághata, Branda, Cáritas, Daniel** e **Serena** pela amizade e compreensão quando precisei estar ausente,

Aos colegas de mestrado **Anne Lessa, Daniele Veiga, Gabriel Queiroz, Livia Ribeiro, Luciana Loyola, Mônica Barreto, Osvaldo Schitini, Roberta Hoisel, Simone Tosta** e **Susana Soares**, por compartilhar com vocês momentos únicos de aprendizagem e amizade dos quais sempre vou lembrar,

Aos amigos que sempre me acompanham e aos grandes amigos que fiz nesse período: **Diego Garcia, Simone Tosta, Táyla Pereira** e **Virgínia Uzêda** pelo convívio, atenção e apoio nos momentos bons e ruins.

Por fim, agradeço ao meu namorado **Vinícios Bedeschi** pela cumplicidade e amor.

“Uma vez que aceitamos nossos limites, vamos além deles.”

Albert Einstein

DOURADO, Raísa Cavalcante. Caracterização Imunoistoquímica de fibroblastos associados ao câncer em carcinoma epidermoide de boca. 63f. 2016. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

Os miofibroblastos são células diferenciadas contráteis com capacidade para secretar componentes da matriz extracelular, citocinas, proteases e fatores pró-angiogênicos. Em processos neoplásicos como o Carcinoma Epidermoide de Boca (CEB), os miofibroblastos são reconhecidos como Fibroblastos Associados ao Câncer (FAC) e têm participação ativa no processo de progressão tumoral. Visto que a presença de FAC no estroma tumoral pode representar um parâmetro importante de invasão e proliferação, o presente trabalho visou avaliar a presença de FAC em CEB através de imunofenotipagem e sua associação com a classificação histológica de FAC e parâmetros clinicopatológicos. Foram utilizados 34 casos de CEB parafinados e fixados em formalina para determinação do imunofenótipo FAC, sendo considerado positivo pela co-expressão proteica à α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35 e Vimentina através de imunoistoquímica. Em 19 casos (56%) o imunofenótipo foi positivo para FAC e em 15 casos (44%) o imunofenótipo foi variável. De acordo com a classificação histológica de FAC, 16 casos (47%) foram considerados com o fenótipo de FAC maduro, e 18 casos (53%) como fenótipo FAC imaturo. O imunofenótipo FAC foi associado ao tipo histológico FAC imaturo ($p < 0,05$, Teste Exato de Fisher). Sendo assim, caracterização de FAC pelo imunofenótipo pode indicar em CEB, tumores com perfil biológico distinto, Estudos que ampliem a abordagem de FAC em CEB são necessários para estabelecer o real papel desse grupo celular como possível marcador prognóstico.

Palavras-chave: Fibroblastos associados ao câncer, Câncer de Boca.

DOURADO, Raísa Cavalcante. Immunohistochemical Characterization of Cancer-Associated Fibroblasts Immunophenotype To Oral Squamous Cell Carcinoma. 63f. 2016. Master Dissertation – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Myofibroblasts are differentiated contractile cells with ability to secrete extracellular matrix components, cytokines, proteases and pro-angiogenic factors. In neoplastic processes as oral squamous cell carcinoma (OSCC), myofibroblasts are recognized as cancer-associated fibroblasts (CAF), and actively participate in the process of tumor progression. The presence of CAF in tumor stroma may represent an important parameter invasion and proliferation. This study evaluated the presence of CAF in OSCC through immunophenotyping and its association with histological classification of CAF and clinical histological parameters. 34 cases were used OSCC paraffin and fixed in formalin for determination of the immunophenotype CAF is considered positive for the protein co-expressing the α -SMA, Fibronectin, FSP1, HHF35 and vimentin immunohistochemistry. In 19 cases (56%) the immunophenotype was positive for CAF and in 15 cases (44%) the immunophenotype was variable. According to the histological classification of CAF, 16 cases (47%) were considered mature CAF phenotype, and 18 cases (53%) as FAC immature phenotype. The immunophenotype CAF was associated with histological type immature CAF ($p < 0.05$, Fisher's exact test). Thus, characterization of the CAF immunophenotype may indicate in OSCC, tumors with distinct biological profile, studies that expand the CAF approach in CEB are needed to determine the actual role of this cell group as a possible prognostic marker.

Keywords: cancer-associated fibroblasts, Oral squamous cell carcinoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Aspectos morfológicos dos subtipos histológicos de Fibroblastos Associados ao Câncer em Carcinoma Epidermoide de Boca.	41
Figura 2	Imunoexpressão de marcadores de Fibroblastos Associados ao câncer em carcinoma epidermoide de boca	43

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Descrição dos anticorpos primários utilizados, diluição do anticorpo primário, bloqueio de interações inespecíficas, método de detecção e tecido controle utilizados nas reações de imunoistoquímica.	38
Tabela 1	Associação dos subtipos histológicos de FAC com as características clinicopatológicas de CEB.	42
Tabela 2	Associação entre expressão de α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35, Vimentina e classificação histológica de FAC.	44
Tabela 3	Associação do Imunofenótipo FAC por coexpressão de α -SMA, Fibronectina, HHF35, Vimentina e FSP-1 com achados clinicopatológicos e classificação histológica de FAC.	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CEB	Carcinoma epidermoide de boca
CEE	Carcinoma espinocelular esofágico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
et al.	E colaboradores
FAC	Fibroblastos Associados ao Câncer
FSP1	Proteína 1 específica de fibroblasto
HE	Hematoxilina-eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HHF35	Anticorpo monoclonal actina muscular específica
IL	Interleucina
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Enzimas metaloproteinases da matriz
NF-Kb	Complexo proteico fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
SDF-1	Fator derivado de estroma-1
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TGF β	Fator de transformação do crescimento β
TGF- β	Fator de transformação do crescimento- β
TIMPs	Inibidores de metaloproteinases de matriz
TME	Transição mesenquimal-epitelial
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>
α -SMA	α -actina de músculo liso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Carcinoma Epidermoide de Boca.....	14
2.2 Estroma Tumoral.....	15
2.3 Fibroblastos Associados ao Câncer.....	17
2.4 FAC em Carcinoma Epidermoide de Boca.....	26
2.5 Imunofenótipo de FAC em CEB.....	29
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Amostras Biológicas.....	35
4.2 Classificação Histológica de FAC.....	35
4.3 Técnica Imunoistoquímica.....	36
4.3.1 Reação Imunoistoquímica.....	36
4.3.2 Análise Imunoistoquímica.....	39
4.4 Análise Estatística.....	39
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	65

1. INTRODUÇÃO

O estroma tumoral, que inclui a matriz extracelular (MEC) e diferentes tipos de células, atua como um microambiente essencial às células neoplásicas (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Fibroblastos associados ao câncer (FAC) são miofibroblastos encontrados em processos neoplásicos e, nos últimos anos, verificou-se que FAC representam os principais constituintes celulares do estroma de muitos carcinomas (CARNEIRO LÚCIO et al., 2013). Atualmente, acredita-se que FAC desempenham importantes papéis na sinalização entre epitélio e estroma, durante a transformação maligna, atuando no crescimento e progressão de tumores epiteliais (FONSECA et al., 2014).

Os miofibroblastos são conhecidos principalmente por seu papel na cicatrização de feridas. Uma característica central da diferenciação dessas células envolve a neo-formação de fibras de estresse e expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA), caracterizando o aparato contrátil dos miofibroblastos (EYDEN et al., 2009; SERINI; GABBIANI, 1999). Em condições normais, as interações entre epitélio e tecido conjuntivo circundante desempenham um papel na homeostase dos tecidos, havendo oportuna ativação de miofibroblastos quando a camada epitelial é violada (OTRANTO et al., 2012). Assim como miofibroblastos em condições fibroproliferativas, FAC tornam-se extremamente abundantes no estroma de diversos tumores, especialmente carcinomas (EYDEN et al., 2009; SERINI; GABBIANI, 1999). A partir de interações com as células neoplásicas os miofibroblastos do estroma tumoral tornam-se ativados para proliferar e contribuem para a remodelação e enrijecimento da MEC, oferecendo assim um microambiente tumoral favorável para o crescimento e invasão das células do tumor (FIDLER, 2003; LIOTA; KOHN, 2001; OTRANTO et al., 2012).

Adicionalmente, pesquisas *in vitro* sugerem uma importante participação dos FAC na modulação da proliferação de células malignas. Fibroblastos estromais interagem com células neoplásicas adjacentes através da secreção de uma variedade de fatores de crescimento e citocinas, atuam na remodelação do microambiente tumoral por meio de deposição de MEC e no recrutamento de células inflamatórias e endoteliais. Citocinas e quimiocinas secretadas pelos FAC conduzem à infiltração de células imunes, que por sua vez promovem a

angiogênese e ajudam na disseminação metastática (GERBER et al., 2009). FAC também são capazes de secretar vários membros da família de metaloproteinases da matriz (MMPs), enzimas úteis à degradação direta da MEC, angiogênese e clivagem de moléculas de adesão celular, facilitando a motilidade celular (DE-ASSIS et al., 2012; FONSECA et al., 2014; SOBRAL et al., 2011a).

Os fibroblastos são amplamente distribuídos e facilmente reconhecidos devido à sua morfologia fusiforme, porém FAC têm uma identidade distinta que continua mal definida em termos moleculares e não há um marcador específico conhecido. Em virtude de derivarem de vários precursores, partilham marcadores com muitos outros tipos de células. Assim, FAC são considerados como um fenótipo e não como um tipo específico de célula (LI et al., 2015).

Embora seja cada vez mais evidente que FAC tenham participação ativa no processo de progressão tumoral de carcinomas e representem alvo potencial na terapia anti-câncer, não existe um imunofenótipo que seja um indicador sensível para caracterizar FAC em carcinoma epidermoide de boca (CEB) (LI et al., 2015). FAC são frequentemente caracterizados por expressão de α -SMA, marcador mais importante para identificar miofibroblastos diferenciados (BELLO et al., 2011; DE WEVER et al., 2008; HINZ et al., 2007), no entanto a co-expressão com outros imunomarcadores é fundamental para uma boa especificidade (MAO et al., 2013). Dessa forma, a validação de outros anticorpos para caracterização do imunofenótipo FAC em CEB se faz necessária.

Embora a presença de FAC no estroma tumoral possa representar um parâmetro importante de invasão e proliferação tumoral, FAC são pobremente compreendidos em termos da sua diferenciação celular e caracterização. Estudos em CEB que determinem a caracterização de FAC, bem como que envolvam a sua diferenciação e função são pré-requisitos para estabelecer o papel desta população celular como possível alvo biológico anti-câncer e marcador de prognóstico. A classificação histológica de FAC em fenótipo maduro (morfologia semelhante a fibroblastos) e fenótipo imaturo (células largas, com nucléolos proeminentes) já foi demonstrada ser um fator de prognóstico confiável em carcinoma esofágico (HA et al., 2014), não tendo sido ainda determinada em CEB. A positividade isolada de α -SMA em células fusiformes é ampla e

insuficiente para caracterizar os FAC, portanto a coexpressão com outros marcadores para imunofenotipagem é fundamental.

Visto que aspectos clínicos e histopatológicos não representam parâmetros suficientes para estimar o potencial de agressividade tumoral, a detecção de FAC em estroma de CEB pode ser útil em estimar precocemente pacientes portadores da doença com potencial agressivo, o que ainda não está estabelecido para o câncer de boca. Assim, a fim de descrever os FAC associados ao CEB, o presente trabalho visa avaliar a presença de FAC no estroma tumoral desta lesão através da expressão de cinco marcadores imunoistoquímicos, além de associar esse imunofenótipo com a classificação histológica de FAC e parâmetros clinicopatológicos de pacientes portadores de CEB.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMOIDE DE BOCA

O câncer de boca é a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço, sendo considerado um problema de saúde pública em todo o mundo (CARDESA et al., 2005). A última estimativa mundial apontou para 2012 cerca de 300.373 casos novos, com uma taxa de prevalência de 13,5 por 100.000 indivíduos até 2017 (GLOBOCAN, 2012). As mais altas taxas de incidência são observadas em populações da Melanésia, centro-sul Asiático, Europa, África e América Central (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

No Brasil, a incidência é considerada uma das mais altas do mundo, e a estimativa do Instituto Nacional do Câncer para o biênio 2014/2015, estabeleceu este câncer como o 5º tipo mais frequente entre os homens (com 11.280 casos estimados) e o 11º entre as mulheres (com 4.010 casos estimados). Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. A estimativa no estado da Bahia foi de 860 novos casos, sendo 220 em Salvador (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O carcinoma epidermoide de boca (CEB), também conhecido como carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, é uma neoplasia maligna derivada da camada espinhosa do epitélio pavimentoso estratificado e representa mais de 95% do tipo histológico das neoplasias bucais malignas (BRANDIZZI et al., 2008; HUANG et al., 2007). Afeta principalmente homens numa faixa etária acima de 40 anos expostos aos principais fatores de risco, como tabaco e álcool (BSOUL et al., 2005). Existem fortes evidências para uma relação entre dose e tempo de exposição aos carcinógenos encontrados no cigarro e aos metabólitos mutagênicos do álcool para o desenvolvimento do CEB (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000). A radiação ultravioleta é a principal causa de carcinomas de pele, sendo também responsável pela etiologia do CEBs de lábio, principalmente inferior (BUSICK et al., 2005). Outros fatores de risco como infecções por HPV-16 são relatados (SYRJÄNEN, 2005).

O CEB pode se apresentar clinicamente como uma massa exofítica com ou sem ulceração, podendo surgir em qualquer local da cavidade oral, principalmente no lábio inferior, língua, assoalho de boca, palato mole, e gengiva/rebordo alveolar (KROLLS; HOFFMAN, 1976). Se caracteriza por invasividade local, sendo que as metástases cervicais são mais comuns. Metástases à distância quando ocorrem são encontradas principalmente nos pulmões, ossos, fígado e mediastino (KELLERMANN, 2007). Durante a disseminação, sintomas como dor, disfagia e sangramentos podem ser encontrados nos estágios mais avançados da doença (SCHWENDER et al., 2002). O tratamento do CEB depende da localização, estadiamento clínico e condições físicas do paciente, consistindo principalmente de cirurgia e/ou radioterapia. A quimioterapia é frequentemente administrada concomitante com a radioterapia, de forma adjuvante após a cirurgia ou neoadjuvante para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia (MIRABILE et al., 2015).

Apesar dos esforços realizados em pesquisas envolvendo o CEB, de campanhas públicas antitabagistas e do progresso nas estratégias de detecção e terapia, esta neoplasia está associada a grave morbidade, prognóstico incerto e taxa de sobrevida global em cinco anos baixa variando de 40 a 50% (MONTORO et al., 2008; STANKO et al., 2007). Embora o estadiamento e outras variáveis clinicopatológicas forneçam algumas informações sobre o prognóstico, ainda não estão estabelecidos marcadores biológicos confiáveis na predição da progressão maligna em câncer de boca (FONSECA-SILVA et al., 2015).

Assim, diversos marcadores biológicos envolvidos nos diferentes eventos de sinalização e que resultem em proliferação, apoptose, diferenciação, adesão, invasão e metástases têm sido investigados por pesquisadores na tentativa de correlacioná-los à progressão do câncer, sendo recurso importante no diagnóstico precoce, avaliação do comportamento biológico tumoral e para encontrar alternativas terapêuticas que proporcionem maior sobrevida aos pacientes (HAFFTY, 2005).

2.2 ESTROMA TUMORAL

Tradicionalmente, o estroma de vários órgãos é descrito como o suporte estrutural rico em matriz extracelular (MEC) e uma baixa densidade de células incorporadas. Inclui diferentes tipos de colágenos, elastina, fibronectina, ácido hialurônico e glicoproteínas (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Além de desempenhar importantes papéis durante desenvolvimento e na manutenção da arquitetura dos tecidos, componentes da MEC podem modificar, por exemplo, a atividade de fatores de crescimento e citocinas (MOTT; WERB, 2004; SCHULTZ; WYSOCKI, 2009).

O câncer é uma estrutura constituída de vários tecidos que interagem entre si, produzindo as mudanças necessárias ao processo de progressão tumoral (TARIN, 1972). O câncer de origem epitelial contém além das células neoplásicas, outros componentes celulares e não celulares. As células não neoplásicas incluem fibroblastos, células endoteliais, células imunes, células inflamatórias, pericitos e células mesenquimais indiferenciadas. Os componentes não celulares incluem a MEC, fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras. Estes componentes do estroma tumoral que circundam as células do câncer criam o chamado “microambiente tumoral” (JUNTTILA; DE SAUVAGE, 2013; KLEMM; JOYCE, 2014; QUAIL; JOYCE, 2013).

Durante a progressão em carcinoma invasivo, as células neoplásicas ativam as células do tecido conjuntivo adjacente, gerando um estroma alterado que pode influenciar as células tumorais (BAGLOLE et al., 2006). Numerosos estudos têm mostrado que o estroma regula a transformação neoplásica de células epiteliais, bem como a sobrevivência, o crescimento e a metástases de carcinomas (JOYCE; POLLARD, 2009).

A progressão tumoral envolve uma conhecida sequência de eventos caracterizados por crescimento tumoral e angiogênese, dissociação das células do tumor, invasão da MEC e metástases. Esse processo depende de muitas interações entre células tumorais e seu microambiente; durante a invasão nos tecidos adjacentes, as células neoplásicas se aderem aos componentes estromais, promovem degradação da MEC por ação de enzimas metaloproteinases e atravessam essa matriz degradada. Esse processo de remodelação dinâmica dos componentes da MEC, chamado *stromagenesis*, é

permitido pelos miofibroblastos do estroma tumoral alterado, que criam um ambiente favorável para a invasão celular e metástases (FIDLER, 2003).

O papel do estroma na iniciação e progressão do câncer foi confirmado por muitos experimentos *in vitro* e *in vivo*, como revisou Shtilbans (2013). É provável que alterações genéticas embora indispensáveis para a transformação maligna, não sejam suficientes para o crescimento do tumor, dependendo também de alterações epigenéticas mediadas pelo microambiente para produzir um fenotipo maligno. Assim, as células estromais ativadas atuam como indutores de transformação maligna no carcinoma (BOUMBER; ISSA; DE, 2011; TRUJILLO et al., 2011).

Os fibroblastos são o principal tipo de célula hospedeira do estroma tumoral. A presença de um subtipo específico de fibroblasto, chamado de miofibroblastos, está bem estabelecida no estroma de carcinomas, e muitos dados sugerem que são participantes ativos na iniciação e progressão tumoral do CEB (OTRANTO et al., 2012). Assim, vários estudos em modelos *in vivo* ou pesquisas pré-clínicas (GONDA et al., 2010; KAWASHIRI et al., 2009; ÖZDEMIR et al., 2014; RHIM et al., 2014; TOGO et al., 2013; YAMAGUCHI et al., 2014) corroboram com o potencial terapêutico de agentes anticâncer dirigidos a miofibroblastos do estroma tumoral. Mais estudos são necessários para ampliar a compreensão das interações desses fibroblastos com as células neoplásicas, com intuito de desenvolver estratégias mais apropriadas (YAMAGUCHI; SAKAI, 2015).

2.3 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER

Fibroblastos associados ao câncer (FAC) são um grupo especializado de fibroblastos que partilham uma morfologia semelhante aos miofibroblastos observados na cicatrização de feridas, sendo frequentemente encontrado em regiões de câncer, onde supostamente possibilita e determina o crescimento neoplásico (KALLURI; ZEISBERG, 2006).

Com emprego da microscopia eletrônica, o termo miofibroblasto foi introduzido por volta de 1970 para reconhecer variantes dos fibroblastos presentes em tecidos de granulação na cicatrização de feridas que tinham

atividade contrátil similar às células do músculo liso (MAJNO et al., 1971). Morfologicamente, os miofibroblastos se apresentam como células fusiformes ou estreladas, abundante matriz pericelular, de citoplasma palidamente eosinofílico, núcleo regular e central, com discretas indentações e pequenos nucléolos (DESMOULIÈRE; GUYOT; GABBIANI, 2004; EYDEN, 2008). Essa caracterização funcional e morfológica ainda é válida, mas requer detalhamento adicional (HINZ, 2010).

Atualmente, como revisou Lúcio et al. (2013), os miofibroblastos são considerados como células que exibem um fenótipo híbrido entre fibroblastos e células do músculo liso, capazes de expressar a isoforma α da actina de músculo liso (α -SMA). Analogamente aos fibroblastos, os miofibroblastos possuem retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos, resultado da intensa síntese e secreção de citocinas, hormônios, mediadores inflamatórios, proteínas de adesão, componentes da MEC como o colágeno, fatores de crescimento e proteases. Ultraestruturalmente, os miofibroblastos estão caracterizados pela presença de um aparato contrátil. Está organizado sob a forma de feixes periféricos de miofilamentos de α -SMA conectados aos complexos de adesão especializados que se localizam na superfície celular, denominados fibronexos, caracteristicamente observadas em miofibroblastos (EYDEN, 2008; EYDEN et al., 2009; MCANULTY, 2007).

Os miofibroblastos podem estar presentes em pequenas quantidades em diversos órgãos, em especial naqueles locais cuja força mecânica é necessária: cavidade oral, pele, trato gastrointestinal, útero, testículo, coração (EYDEN, 2008). Nestas estruturas, os miofilamentos ligam-se às integrinas, as quais se conectam à fibronectina existente na MEC, resultando num aparato contrátil que provê um sistema mecanotransdutor capaz de transmitir a força gerada pelas fibras de estresse à MEC (GABBIANI, 2003; TOMASEK et al., 2002).

Inicialmente, acreditava-se que os miofibroblastos eram originados somente a partir de fibroblastos estromais e de populações celulares residentes nos tecidos, como células estreladas hepáticas e pancreáticas (HINZ et al., 2007; XING; SAIDOU; WATABE, 2010). Entretanto, uma variedade de células progenitoras foram identificadas a sofrer transdiferenciação, como as células musculares lisas, os pericitos (HINZ, 2010), as células endoteliais (RONNOV-

JESSEN et al., 1995), os adipócitos e as células mioepiteliais (DE WEVER et al., 2008). Outras fontes potenciais para os miofibroblastos incluem as células-tronco mesenquimais recrutadas nos tecidos, os fibrócitos circulantes, derivados da medula óssea e ainda, células epiteliais submetidas à transição epitélio-mesenquimal (TEM) (EYDEN et al., 2009).

A TEM é o fenômeno durante a qual as células epiteliais perdem a aderência célula-célula e o contato com a matriz extracelular, perdendo seus marcadores específicos (E-caderina, desmoplakin, proteína zonula-occludens-1, citoqueratina-18) e adquirem marcadores característicos de células mesenquimais (vimentina, proteína específica de fibroblastos-1, fibronectina, colágenos I e III, desmina e α -SMA), conferindo uma morfologia fusiforme com potencial migratório, o que permite as células migrarem para tecidos normais adjacentes (NAWSHAD et al., 2005). Essa capacidade de invasão das células de câncer é um pré-requisito para metástases à distância e representa a principal característica do câncer, sendo esse evento dependente da TEM (THIERY, 2002).

A transição epitélio-mesenquimal pode ser subdividida em três subtipos gerais com base no contexto em que ocorrem. A TEM tipo 1 ocorre durante a organogênese e envolve células epiteliais primitivas modificando-se para células mesenquimais com motilidade como parte da gastrulação, e de células neuroepiteliais primitivas gerando células migratórias da crista neural (THIERY; SLEEMAN, 2006). A TEM tipo 2 é vista durante a cicatrização de feridas e envolve células epiteliais secundárias ou células endoteliais em transição para fibroblastos de tecido residentes. Em tecidos maduros, estes fibroblastos são induzidos em resposta à inflamação persistente. A TEM tipo 3 envolve células de carcinoma em nódulos primários em transição para células tumorais metastáticas a fim de migrar através da corrente sanguínea e, em alguns casos, formar nódulos secundários em metástases distantes pelo processo inverso, transição mesenquimal-epitelial ou TME (ZEISBERG; NEILSON, 2009).

A perda do fenótipo epitelial polarizado e aquisição de características mesenquimais faz com que as células tumorais assumam um fenótipo de invasão e metástase (ZHAO et al., 2012). Portanto, além da remodelação do tecido, desenvolvimento de órgãos e cicatrização de feridas, a TEM exerce um papel essencial na progressão do câncer (CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006;

FAN et al., 2012; HUBER; KRAUT; BEUG, 2005; NAWSHAD et al., 2005; NGUYE et al., 2011; WANG et al., 2012; YANG et al., 2004).

O mecanismo mais aceito na literatura acerca da origem dos miofibroblastos é a transdiferenciação de fibroblastos pré-existentes, postulado por Gabbiani et al (1971). No entanto, há cada vez mais evidências que miofibroblastos estromais são frequentemente originados de células epiteliais que sofreram o fenômeno da TEM. Muitos autores observaram no epitélio transformado de diferentes carcinomas a possível ocorrência de TEM simultaneamente ao aumento da expressão de marcadores de FAC (EYDEN, 2008; GUARINO, 2007; JENSEN et al., 2015; KALLURI; ZEISBERG, 2006; ORR et al., 2012; PETERSEN et al., 2003; SPAETH et al., 2009; TRUJILLO et al., 2011; ZEISBERG et al., 2007).

A transformação de células precursoras em miofibroblastos compreende duas fases, caracterizadas por alterações específicas no citoesqueleto; primeiramente há aquisição de feixes contráteis pela célula, o que garante força suficiente para promover sua migração e remodelar a MEC. Essas células tem recursos contráteis mais baixos e são chamadas “proto-miofibroblastos”. Na presença de estresse mecânico e fatores de crescimento como o fator de transformação do crescimento- β (TGF- β), proto-miofibroblastos podem diferenciar-se em miofibroblastos através da incorporação de α -SMA, o que confere atividade altamente contrátil típica de miofibroblastos (HINZ et al., 2001a, 2001b).

Durante a reparação tecidual, os miofibroblastos são componentes importantes e aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais. O processo de cicatrização envolve uma sequência altamente regulada de eventos coordenados entre si. A fase proliferativa do reparo se inicia por volta do terceiro dia após a injúria tecidual, sendo caracterizada pela formação do tecido de granulação, que é constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico (MAJNO et al., 1971).

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm como principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da MEC e reepitelização. Após a fase inflamatória, o processo de reparo envolve ativação de fibroblastos quiescentes em

miofibroblastos. Essas células ganham fibras contráteis através da expressão de α -SMA e formam contatos célula-célula através de junções *gap*, o que conduz à contração da ferida e remodelação da MEC. Esta fase perdura por 2 a 3 semanas e é o marco inicial da formação da cicatriz (LIU et al., 2010).

Num processo normal de cicatrização, os fibroblastos ativados submetem-se à apoptose e são removidos pelo tecido de granulação (DESMOULIÈRE et al., 1995; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010). A formação de cicatrizes hipertóxicas ou fibroses é caracterizada pela desregulação desse processo e persistência dos fibroblastos ativados no tecido, com o conseqüente acúmulo da MEC circundante e enrijecimento tecidual, levando à deformação e alteração das suas funções normais (DARBY et al., 2002). Além disso, diferentes estudos já demonstraram o valor prognóstico da fibrose estromal e impacto da desmoplasia no desenvolvimento de carcinomas (MAESHIMA et al., 2002; UENO et al., 2004). Como tumores têm sido descritos como "feridas que não curam" (DVORAK, 1986), é razoável que os FAC compartilhem algumas semelhanças com os miofibroblastos de fibroses, incluindo a expressão de α -SMA e presença persistente no estroma tumoral, não sendo removidos por apoptose. Além disso, sua ativação não é reversível e, como na fibrose, isto leva a desmoplasias do tumor através da deposição excessiva de MEC (KALLURI; ZEISBERG, 2006; PIETRAS; ÖSTMAN, 2010).

Em geral, FAC têm sido conhecidos por terem morfologia de células grandes e largas, distintos de fibroblastos, que são finos, ondulados e pequenos (LIU et al., 2011). No entanto, HA et al. (2014) descobriram que em carcinoma espinocelular esofágico (CEE), os FAC estromais se apresentam histologicamente diferentes, alguns se assemelhando a fibroblastos normais, e outros tem morfologia distinta de FAC. Esses autores classificaram como fenótipo FAC "maduro" quando os fibroblastos se mostravam finos, ondulados, com morfologia de pequenas células fusiformes, e o tipo considerado "imaturo" quando fibroblastos mostravam morfologia fusiforme larga, arredondada. Fibroblastos imaturos são conhecidos por mostrar tipicamente um amplo núcleo eucromático, com um ou dois nucléolos, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi proeminentes em achados ultraestruturais. No referido estudo, que utilizou uma grande coorte de pacientes, foi demonstrado que a classificação histológica de

FAC está correlacionada com prognóstico em CEE; o subtipo histológico de FAC imaturo se correlacionou com imunofenótipo positivo para FAC e evolução clínica adversa.

Outros estudos anteriores mostraram correlação entre a categorização histológica de componentes da fibrose estromal com resultado clínico em câncer de cólon (UENO et al., 2004), câncer de mama (CARDONE et al., 1997) e câncer de pulmão (MAESHIMA et al., 2002). A classificação de FAC por morfologia histológica e sua correlação clinicopatológica não foram estudadas em CEB, e tem potencial para representar um marcador confiável de prognóstico nessa neoplasia.

A regulação da transição de miofibroblastos para o estado associado ao câncer continua pobremente compreendida. Sabe-se que independente da identidade dos seus precursores, a ativação dos miofibroblastos é promovida por dois principais fatores - estresse mecânico que surge através do enrijecimento da matriz extracelular, e principalmente ativação por fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) (HINZ, 2010). Em um estudo recente, a indução do fator de transcrição YAP foi necessário para a remodelação da MEC por FAC, apoiando a tumorigênese. A proteína YAP, por sua vez regula múltiplos fatores que modulam o citoesqueleto e rigidez da MEC (CALVO et al., 2013). Uma vez que se acumulam no microambiente tumoral, FAC são ativados por fatores de crescimento e citocinas que estão presentes no meio circundante. TGF- β , a proteína quimiotática de monócitos (MCP1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e proteases têm sido implicados na ativação de FAC (SAMBASIVARAO, 2013).

Nos estágios iniciais do crescimento, as células neoplásicas se incorporam no estroma circundante, e ativam fibroblastos residentes através de sinais parácrinos, sendo o TGF- β o principal mediador envolvido nesta transição (AOYAGI et al., 2004). Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II) e interleucina-4 (IL-4) também parecem estar envolvidos (DESMOULIÈRE; GUYOT; GABBIANI, 2004). Sob essas condições, o TGF- β induz muitos dos fibroblastos estromais quiescentes a sintetizarem fibronectina, a qual estimula a síntese de α -SMA. Em seguida, são produzidas adesões moleculares entre os miofilamentos de α -SMA, a membrana

citoplasmática e fibronectina, caracterizando o fenótipo de miofibroblastos completamente diferenciados (EYDEN, 2008; KELLERMANN et al., 2008).

No câncer as células neoplásicas aumentam a sua produção de TGF- β de forma descontrolada, e essa molécula desempenha importante papel no desenvolvimento tumoral através de múltiplas funções; indução de proliferação celular e ativação de miofibroblastos, produção excessiva da MEC, e indução à TEM devido rompimento das junções intercelulares (IKUSHIMA; MIYAZONO, 2010; PARDALI; MOUSTAKAS, 2007). Além das células epiteliais transformadas serem fonte de TGF- β , os FAC também contribuem fortemente para produção e ativação desse fator no estroma ativado, gerando um mecanismo de sinalização autócrino que permite a persistência dos miofibroblastos semelhante ao processo de fibrose (KOJIMA et al., 2010).

A ativação das células estromais em FAC tem muitas consequências para o desenvolvimento do tumor. Os mecanismos moleculares pelos quais os miofibroblastos influenciam no comportamento biológico do CEB ainda não são completamente compreendidos (CIRRI; CHIARUGI, 2012). Os FAC têm sido relacionados à produção de uma variedade de fatores de crescimento e citocinas que podem estimular as células neoplásicas e promover a progressão tumoral (JOYCE; POLLARD, 2009; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010). Fatores secretados no estroma incluem TGF- β , fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator derivado de estroma-1 (SDF-1), citocinas pró-inflamatórias CXCL14, interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 e proporcionam uma fonte importante de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que induz a permeabilidade vascular e angiogênese (CIRRI; CHIARUGI, 2012; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010). Adicionalmente, produz fatores pró-inflamatórios que ativam a sinalização do complexo proteico fator nuclear kappa B (NF- κ B) que por sua vez regula a expressão de genes envolvidos em proliferação, migração e apoptose (EREZ et al., 2010).

Os FAC também são os principais produtores dos componentes da MEC e de enzimas que atuam na sua remodelação, tais como metaloproteinases MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 e MMP-14 e seus inibidores (TIMPs). As MMPs são ativadas na porção invasiva do tumor e clivam componentes da MEC

no estroma tumoral para gerar caminhos para a invasão de células neoplásicas (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; OTRANTO et al., 2012).

Além de alterar a composição química do estroma, os FAC contribuem para remodelação e enrijecimento do tecido conjuntivo circundante através da secreção de componentes na MEC e pela contração mecânica (KARAGIANNIS et al., 2012). A rigidez da matriz aumenta a ativação de miofibroblastos e parece ter implicações importantes na invasão de células do câncer (CALVO et al., 2013; DUFORT; PASZEK; WEAVER, 2011; GOETZ et al., 2011). A consequência do estresse mecânico, devido ao enrijecimento da matriz pode levar as células epiteliais a perderem suas junções aderentes e adquirirem um fenótipo mesenquimal invasivo (DUFORT; PASZEK; WEAVER, 2011).

Um dos mecanismos pelos quais os FAC criam um microambiente favorável para progressão de carcinomas é através da indução da TEM, pré-requisito para invasão celular e formação de metástases à distância, características principais do câncer (HUBER; KRAUT; BEUG, 2005). Na TEM, os FAC estão presentes em números anormalmente elevados e são distintos dos fibroblastos normais (OLUMI et al., 1999). FAC secreta fatores solúveis incluindo TGF- β e HGF, que promovem TEM das células neoplásicas vizinhas via sinalização parácrina (CIRRI; CHIARUGI, 2012). Além de fatores solúveis, exossomos mediam a transferência de moléculas funcionais de FAC para células de câncer, estimulando seu potencial invasivo e metastático (LUGA et al., 2012; SHIMODA et al., 2014). No câncer de mama, FAC confere um fenótipo *mesenchymal-like* e melhora a metástase de células mamárias malignas, enquanto que os fibroblastos normais promovem um fenótipo *epithelial-like* e suprimem metástases (DUMONT et al., 2013).

FAC secretam fatores incluindo TGF- β e HGF, que promovem TEM de células neoplásicas adjacentes por via de sinalização parácrina (CIRRI; CHIARUGI, 2012). Além desses fatores solúveis, exossomos medeiam a transferência de moléculas funcionais de FAC para células do câncer, estimulam o potencial invasivo e metastático das células de câncer (LUGA et al., 2012; SHIMODA et al., 2014). Importantes estudos em sistemas de co-culturas relatam que há interação direta entre FAC e células de carcinoma, e que este contato é necessário para invasão (OTOMO et al., 2014). Após interação indireta via

sinalização parácrina e exossomos, essas células se atraem e passam por alterações fenotípicas que funcionam como gatilho para invasão (KLEMM; JOYCE, 2014; SEMBA et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2014).

Além das contribuições de tipos específicos de células para o câncer, o microambiente tumoral tem uma capacidade para limitar a iniciação do câncer em estágios iniciais e conduzir a progressão da doença para malignidade em fases posteriores. Deste modo, a composição da MEC é um importante preditor de prognóstico clínico. Os tumores com alta expressão de inibidores de protease (por exemplo, membros da família serpina) em sua MEC estão associados a bom prognóstico, enquanto os tumores com alta expressão de integrinas e metaloproteinases da matriz (MMP) correlacionam com pior prognóstico e maior risco de recorrência (LEVER; SHEER, 2010). Curiosamente, os tumores primários de diferentes potenciais metastáticos diferem na sua composição estromal e nos componentes da MEC, fornecendo um nível adicional de intervenção terapêutica (NABA et al., 2012).

Os mecanismos moleculares pelos quais a interação direta entre FAC e células neoplásicas estimula a invasão permanecem pouco compreendidos. Parece estar relacionado com a capacidade que essas interações têm de remodelar mecanicamente a MEC para a invasão (YAMAGUCHI; SAKAI, 2015). Em câncer de mama, o contato direto entre os dois tipos de células pode provocar ainda mudanças específicas na expressão gênica que induzem à TEM (CAMP et al., 2011).

A capacidade de resposta mecânica dos FAC e os diversos mecanismos moleculares estudados sugerem um importante papel para suportar a progressão maligna de tumores através da promoção do crescimento, sobrevivência, angiogênese, inflamação, resistência às drogas, invasão e metástases (YAMAGUCHI; SAKAI, 2015). Em pesquisas clinicopatológicas com diversos tumores sólidos malignos foi descrita associação entre a abundância de miofibroblastos no estroma tumoral com prognósticos desfavoráveis, como em câncer de mama (SUROWIAK et al., 2007), coloretal (TSUJINO et al., 2007), hepatocelular (DE WEVER et al., 2008) e melanomas (MICKE; OSTMAN, 2004). No entanto, esclarecer os mecanismos moleculares envolvendo as interações

entre FAC e células neoplásicas, representa um desafio na busca por novos alvos moleculares para prevenir a invasão tumoral.

2.4 FAC EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

Apesar da importância de componentes do estroma tumoral na progressão do câncer, pesquisas que discutem o papel dos FAC em CEB são escassas e foram publicadas em grande parte apenas ao longo dos últimos anos (ROUTRAY; SUNKAVALI; BARI, 2013). Estudos clínicopatológicos demonstraram que níveis de FAC no estroma do CEB particularmente em frente invasivo do tumor têm uma correlação significativa com parâmetros clínicos: maior tamanho do tumor, presença de metástase cervical oculta, recidiva regional e metástases à distância. Houve também uma associação entre a presença de miofibroblastos e menores taxas de sobrevivência (BELLO et al., 2011; ETEMAD-MOGHADAM et al., 2009; KAWASHIRI et al., 2009; KELLERMANN et al., 2008; LI et al., 2015; LUKSIC et al., 2015; MARSH et al., 2011; NIELSEN et al., 2008; SEIFI et al., 2010; SOBRAL et al., 2011a; TRUONG et al., 2013; VERED et al., 2010a).

Além disso, outros autores mostraram que FAC também modulam a sensibilidade do tumor a droga (PIETRAS; ÖSTMAN, 2010), e que citocinas secretadas pelos FAC em CEB conduzem à infiltração de células imunes e consequente promoção da angiogênese, colaborando na disseminação metastática (GERBER et al., 2009).

Tem sido sugerido que a presença de FAC no estroma cria um ambiente permissivo para o processo de invasão pelo tumor e metástases, levando a um comportamento mais agressivo do CEB (DE-ASSIS et al., 2012). Recentemente, foi demonstrado o fenótipo FAC como um fator prognóstico independente para pacientes com CEB em língua (LI et al., 2015) e em estudo prévio, Kellermann et al. (2007) descreveram que a análise da quantidade de FAC nos CEB de língua poderia ser útil na determinação do prognóstico para os pacientes portadores destes tumores. Por outro lado, alguns estudos imunoistoquímicos revelam percentuais importantes de CEB que mostram escassez de FAC (DE-ASSIS et al., 2012; KELLERMANN et al., 2008), e alguns autores não encontraram

significativa associação entre presença de FAC e prognóstico (KELLERMANN et al., 2008).

Pesquisas experimentais mostraram que as células neoplásicas de CEB são capazes de induzir a diferenciação de fibroblastos primários em miofibroblastos através da secreção de TGF- β 1, e os miofibroblastos secretam maiores quantidades de citocinas em comparação com os fibroblastos primários. Tais achados sugeriram pela primeira vez a existência de um mecanismo parácrino duplo entre células do CEB e miofibroblastos (LEWIS et al., 2004).

Kellermann et al. (2008) corroboraram a atuação importante das células neoplásicas na transdiferenciação de fibroblastos normais em miofibroblastos e além disso observaram aumento significativo na proliferação celular de linhagem de CEB cultivadas em meio condicionado com miofibroblastos. Esse efeito indutor de crescimento tumoral foi decorrente à secreção de ativina-A, uma proteína membro da família dos TGF- β .

Sobral et al. (2011) encontraram resultados semelhantes e mostrou ainda que os FAC foram capazes de aumentar a produção de MMPs -1, -2,-9 e -13 pelas células neoplásicas e induzir a invasão das células de CEB através de ensaio de invasão com matrigel. Outros estudos *in vitro* em CEB revelaram que os FAC podem favorecer a migração de células neoplásicas pela secreção de proteases capazes de degradar os componentes da MEC, como as MMPs -2, -3 e -9 (DE WEVER et al., 2008). Secreção de quimiocinas (DALY; MCILREAVEY; IRWIN, 2008) e lamininas (FRANZ et al., 2010) também foram capazes de estimular o processo de invasão tumoral em CEB. Um importante estudo *in vitro* realizado por Gaggioli et al. mostrou que a proximidade e provavelmente o contato de células neoplásicas invasoras de CEB com FAC são necessários para invasão através da MEC (GAGGIOLI et al., 2007).

Em um recente estudo foi descoberto que a interleucina-1 α (IL-1 α) secretada a partir de células de CEB tinha duplo efeito sobre FAC: promoção da proliferação de FAC e indução da secreção de outras citocinas em FAC como CCL7, CXCL1, e IL-8 relacionadas à progressão tumoral. Esse *crosstalk* entre células neoplásicas e FAC vem ganhando reconhecimento como uma interação que desempenha um papel fundamental na carcinogênese e o bloqueio dessa

interação recíproca abre espaços para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (BAE et al., 2014).

Outras investigações confirmaram o importante papel indutor do epitélio neoplásico no surgimento dos FAC no estroma circunvizinho em CEB (DE-ASSIS et al., 2012; ETEMAD-MOGHADAM et al., 2009). Vered et al.(2007) em estudo de carcinogênese experimental em modelo animal observaram que, em áreas de epitélio normal, hiperkeratótico, hiperplásico e displásico, os miofibroblastos eram escassos ou completamente ausentes no tecido conjuntivo subjacente. Contudo, nas áreas de carcinoma superficial ou invasivo, foi constatado aumento significativo no número de miofibroblastos, por vezes com íntima proximidade entre estes tipos celulares e as células neoplásicas malignas. Em adição a esses achados, em estudos de imunohistoquímica, miofibroblastos não foram detectados em mucosa oral normal e tecidos displásicos independente do seu grau histológico, sendo confirmada a presença de FAC apenas no estroma do tumor, especialmente no fronte de invasão tumoral (DE-ASSIS et al., 2012; KELLERMANN et al., 2007; VERED et al., 2007).

São escassos os estudos que abordam os mecanismos moleculares dos FAC em CEB correlacionado ao fenótipo da TEM. A hipótese de que FAC estromais representam células malignas epiteliais que sofreram o fenômeno da TEM (GUARINO, 2007) foi suportada em estudos com CEB, com diminuição de expressão dos marcadores epiteliais (por exemplo, E-caderina), entre as células neoplásicas que estão em contato direto com os miofibroblastos do estroma adjacente (VERED et al., 2010a). Apesar da presença de FAC no fronte invasivo do tumor comprovar a diferenciação através de TEM, as explicações para essa estimulação permanecem vagas (ROUTRAY; SUNKAVALI; BARI, 2013).

Pesquisas mais atuais exploram o papel que FAC têm de induzir a TEM em células tumorais na progressão do câncer de boca (DING et al., 2014; JENSEN et al., 2015; LI et al., 2015), demonstrando que existe um mecanismo de sinalização parácrino entre FAC e células neoplásicas (CIRRI; CHIARUGI, 2012). A interação entre FAC e células de CEB leva à liberação de receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (BERNDT et al., 2014) e TGF- β (CIRRI; CHIARUGI, 2012), componentes envolvidos nas mudanças fenotípica requeridas pela TEM.

2.5 IMUNOFENÓTIPO DE FAC EM CEB

O estroma tumoral é um ambiente muito complexo e dinâmico, envolvendo múltiplos agentes na interação das células tumorais com FAC. Ainda não foi possível isolar essas células do microambiente tumoral de CEB para melhor compreender sua individualidade (ROUTRAY; SUNKAVALI; BARI, 2013). Existem muitos tipos de células que dão origem aos miofibroblastos, e essa diversidade contribui para o aparecimento de subpopulações de FAC que apresentam propriedades biológicas específicas, que são importantes para compreender a fim de desenvolver novas estratégias terapêuticas (MICALLEF et al., 2012).

Uma definição mais precisa de miofibroblastos se deu três décadas após sua definição inicial com recursos da microscopia de luz, que incluiu uso de secções de HE e imunofenotipagem. Por volta de 1980 a imunistoquímica se desenvolveu significativamente e se popularizou (EYDEN, 2008). Desde então, o α -SMA tem sido descrita como o marcador mais importante para identificar miofibroblastos diferenciados (BELLO et al., 2011; DE WEVER et al., 2008; HINZ et al., 2007), mas não pode ser utilizado como um identificador único de miofibroblastos, além de não permitir a distinção entre células musculares lisas e uma variedade de células fusiformes que expressam α -SMA em tecidos normais ou patológicos. Em tecidos normais, há pouca dificuldade na identificação destas células por meio da morfologia celular e contexto histológico, mas em processos patológicos particularmente o câncer, as formas diferenciadas dos miofibroblastos tornam difícil sua identificação. Na patologia, a lista de células alongadas positivas para α -SMA é ainda maior (EYDEN et al., 2009; HINZ et al., 2007). É igualmente difícil distinguir miofibroblastos e pericitos, que podem expressar vimentina e desmina (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011).

As células musculares lisas contêm dois tipos de filamentos intermediários; vimentina e desmina. Usualmente, os miofibroblastos são negativos para antígenos presentes em células musculares lisas, como as cadeias pesadas de miosina de músculo liso, caldesmona e desmina. Porém, em estágios mais avançados de diferenciação, podem expressar esses antígenos, revelando que o padrão de expressão destas proteínas nestes tipos celulares pode variar dependendo da localização e da natureza do processo patológico. Até

o momento, não foi identificada uma proteína de citoesqueleto capaz de diferenciar miofibroblastos de células musculares lisas (CARNEIRO LÚCIO et al., 2013). Tipicamente, os miofibroblastos são negativos para citoqueratinas (marcadores de células epiteliais), CD68 (marcador de monócitos/macrófagos), CD31 (marcador de células endoteliais) e CD34 (SOBRAL et al., 2011b). Existem vários antígenos de FAC estabelecidos além da α -SMA, tais como vimentina, proteína específica de fibroblastos-1 (FSP1 ou S100A4), colágeno tipo I (ZHANG et al., 2013), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e seu receptor (PDGFR) (KALLURI; ZEISBERG, 2006).

Os miofibroblastos expressam tanto marcadores de células musculares lisas (como a α -SMA), quanto marcadores de fibroblastos, como proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1) e vimentina (ROUTRAY; SUNKAVALI; BARI, 2013). O marcador FSP1, referido também como S100A4 foi descoberto em 1995, pertence à superfamília das proteínas de ligação ao cálcio citoplasmático S100 e pode ser expressa por diferentes tipos de células de origem mesenquimal (ÖSTERREICHER et al., 2010). FSP1 é um marcador altamente específico para fibroblastos e entre todos os marcadores conhecidos, a proteína específica do fibroblasto 1 (FSP1) parece oferecer a melhor especificidade para a detecção *in vivo* de fibroblastos (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Fibroblastos no câncer detectados por expressão de FSP1 já foram associados a à indução da carcinogênese em pele (ZHANG et al., 2011) e promoção de crescimento tumoral e metástases através do aumento da motilidade celular (GRUM-SCHWENSEN; KLINGELHOFER, 2005). Há evidência que a expressão isolada de FSP1 pode identificar um grupo único de FAC que não expressam outros marcadores (MAO et al., 2013) e já foi demonstrado valor prognóstico significativo FAC caracterizados por FSP1 em câncer colorretal (HERRERA et al., 2013; OSAMU et al., 1997) e carcinoma esofágico (HA et al., 2014).

Vimentina tal como proteína da família dos filamentos intermediários, é normalmente expressa em células de origem mesenquimal e é um marcador conhecido de TEM. De Wever et al. (2008) sugeriram que um critério mínimo de caracterização de FAC incluiria positividade para α -SMA, vimentina e ainda negatividade para citoqueratina. Já Sugimoto et al. (2006) afirma que FAC são

uma população heterogénea e, portanto, a utilização de α -SMA ou vimentina como os únicos marcadores não irá identificar todos os FAC.

A caracterização de FAC por expressão isolada do principal marcador de miofibroblastos, α -SMA, já revelou um grupo significativo de pacientes com tumores agressivos e maior mortalidade em CEB, sugerido que α -SMA seja utilizada de forma independente ou como parte de um modelo prognóstico para essa neoplasia, a caracterização de FAC em CEB (BELLO et al., 2011; KAWASHIRI et al., 2009; MARSH et al., 2011; VERED et al., 2010b). No estudo de Ding et al. (2014), a expressão independente de α -SMA em CEB foi associada com angiogênese e com proteínas relacionadas a TEM; vimentina e N-caderina. Entretanto, devido à diversidade de origem celular de FAC e grande heterogeneidade de fenótipos FAC, marcadores adicionais são necessários para uma boa especificidade (MAO et al., 2013).

A actina é uma proteína altamente conservada do citoesqueleto compreendendo microfilamentos existentes em grandes quantidades nas células musculares bem como células não musculares. A presença de distintos isotipos de actina em células do músculo, no entanto, sugere que algumas variantes de actina são voltadas especificamente para contração celular. HHF35 é um anticorpo monoclonal específico que reconhece um epítipo comum a quatro isotipos de actina musculares e marca células musculares lisas, esqueléticas e cardíacas, células mioepiteliais, e muitos carcinomas. É um marcador útil para classificação de rabdomyosarcomas, leiomiomas e leiomiiossarcomas. Actinas músculo-específicas são também descritas em pericitos, miofibroblastos reacionais, e em músculo esquelético e cardíaco. A reatividade do HHF35 a miofibroblastos do estroma de certos tumores já foi descrita (TIPPENS et al., 1986, LEONG; COOPER; LEONG, 1999).

Um marcador muito característico de miofibroblastos é a fibronectina. Essa molécula se organiza na forma de fibrilas adjacentes à superfície celular, formando feixes projetados à matriz extracelular, consistindo o aparato denominado fibronexo, uma estrutura de transferência de força contrátil de miofibroblastos (EYDEN, 2008). Outros autores observaram que no microambiente tumoral, a sinalização de TGF- β induz a diferenciação miofibroblástica, mas este processo é dependente da expressão de proteínas da

MEC, como fibronectina (ROUTRAY; SUNKAVALI; BARI, 2013). Diante de muitos estudos que usaram α -SMA como único marcador para miofibroblastos, Eyden, Curry e Wang (2011) chamam atenção para a imprecisão dessa caracterização de FAC. Esses autores estudaram fibrose túbulo-intersticial e com recursos da microscopia eletrônica, identificaram que a maioria das células estromais α -SMA positivas não eram portadoras de fibronexos, e por isso não podiam ser caracterizadas como miofibroblastos.

Embora fibroblastos sejam amplamente distribuídos e facilmente reconhecidos devido à sua morfologia fusiforme, FAC têm uma identidade distinta que continua mal definida em termos moleculares e não há um marcador específico conhecido. Derivam de vários precursores, partilhando marcadores com muitos outros tipos de células e por isso, FAC são considerados como um fenótipo, e não como um tipo de célula (LI et al., 2015). Eyden (2008) descreveu uma definição ampliada de miofibroblastos encontrados em condições fibroproliferativas e estroma tumoral. Essa caracterização se baseou em aspectos morfológicos e ultra-estruturais e incluiu ainda um imunofenótipo para miofibroblastos até hoje aceito (EYDEN; CURRY; WANG, 2011), caracterizado por α -SMA, Vimentina, miosina não muscular e Fibronectina positivas, e expressão negativa de miosina de músculo liso e desmina. Em 2008, Kellerman et al. estudaram a presença de miofibroblastos utilizando a marcação imunoistoquímica de α -SMA em mucosa normal, displasia epitelial oral e CEB, e a presença de miofibroblastos foi significativamente maior no grupo de CEB em comparação com casos de mucosa normal e displasias. Etemad-Moghadam (2009) utilizou a expressão de α -SMA, desmina e vimentina com o mesmo propósito, e eles concluíram que a presença de FAC em CEB tem papel chave na carcinogênese desse tumor.

É cada vez mais evidente que os FAC do estroma tumoral compreendem populações bastante heterogêneas de células (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Tais como fibroblastos, atuam em uma variedade de tecidos que influenciam o seu comportamento, produzindo proteínas específicas que medeiam essas interações (BROUTY-BOYÉ et al., 1998). Dessa forma, os FAC em diferentes localizações anatômicas possuem fenótipos intrinsecamente diferentes, logo os resultados de

estudos de FAC no câncer de diferentes órgãos não podem ser aplicados diretamente para o CEB (CHANG et al., 2002; MAO et al., 2013).

A detecção de FAC no estroma tumoral pode ser um potencial marcador biológico para determinar a presença de microinvasão, e para melhorar a taxa de precisão do diagnóstico de carcinomas *in situ* (MICALLEF et al., 2012). Em CEB, diferentes marcadores já foram utilizados para detecção imunoistoquímica de FAC; snail (FRANZ et al., 2009), proteína ativadora de fibroblastos (FAP), FSP1, receptores α e β do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR α e PDGFR β) e glicoproteínas CD34 e CD68 (HA et al., 2014). Recentemente (LI et al., 2015) combinou os marcadores α -SMA e Ki-67 em células fusiformes adjacentes à interface do tumor para caracterizar FAC.

Nenhum desses marcadores citados é exclusivo de FAC e presente em todos FAC. Em vez disso, cada um deles é considerado para representar um distinto fenótipo de FAC. Muitos perfis de expressão foram descritos em diferentes sítios anatômicos, mas não existe um imunofenótipo que seja um indicador sensível para caracterizar FAC em CEB (LI et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar a presença de fibroblastos associados ao câncer (FAC) em carcinoma epidermoide de boca (CEB) através de imunofenotipagem e associar essa caracterização com a classificação histológica de FAC e parâmetros clinicopatológicos de pacientes portadores de CEB.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os FAC através do perfil de expressão proteica de α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35 e Vimentina por imunistoquímica em amostras de CEB;
- Caracterizar o FAC baseado na classificação histológica;
- Investigar associação entre o imunofenótipo e os subtipos histológicos de FAC;
- Associar o imunofenótipo FAC e subtipos histológicos de FAC com as características clinicopatológicas do CEB.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA, sob número 102.359 (ANEXO). A pesquisa foi estruturada em três etapas, sendo a primeira constituída de seleção dos casos com diagnóstico de CEB, seguido de caracterização histopatológica através da classificação de FAC. A segunda etapa consistiu na coleta dos dados clínicos a partir das fichas de biópsia dos pacientes. A terceira etapa correspondeu à caracterização do perfil de expressão proteica de FAC a partir da detecção imunohistoquímica das proteínas α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35 e Vimentina.

4.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram utilizados 34 casos de CEB incluídos em parafina e selecionados a partir dos laudos anátomo-patológicos dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da UFBA, referentes a biópsias incisoriais no período de 2004 a 2013. Todas as lâminas histológicas coradas por hematoxilina-eosina (HE) foram previamente revistas ao microscópio óptico por dois patologistas para confirmação diagnóstica e devidamente classificadas quanto à graduação patológica, seguindo os critérios da OMS (CARDESA et al., 2005), em bem diferenciados (BD), moderadamente (MD) e pobremente diferenciados (PD). As informações clínicas idade, sexo, localização e tamanho foram coletados das fichas de biópsia. Para descrever o tamanho do tumor primário utilizou-se o sistema TNM de estadiamento.

4.2 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DE FAC

FAC foram divididos em dois subtipos histológicos, de acordo com sua morfologia: maduro, quando os fibroblastos mostravam-se delgados, ondulados, com morfologia alongada de fibroblastos normais; e imaturo quando mostravam células fusiformes largas, arredondadas, com nucléolos proeminentes. Quando a proporção de fibroblastos imaturos fosse mais que 50%, o fenótipo considerado era imaturo (HA et al., 2014). Essa classificação foi realizada em lâminas coradas

por HE por dois experientes patologistas, e as discordâncias foram resolvidas por consenso.

4.3 TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

4.3.1 Reação Imunoistoquímica

Os procedimentos laboratoriais para a realização da técnica imunoistoquímica foram realizados no Laboratório de Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia da UFBA. Inicialmente, os blocos parafinados foram seccionados (4 μm) em micrótomo e os cortes colocados sobre lâminas de vidro previamente tratadas com organossilano (281778, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a 2% em acetona.

Os cortes foram desparafinizados por imersão em xilol e hidratados em porcentagens decrescentes de etanol, seguido de incubação em peróxido de hidrogênio 3% diluído em tampão fosfato-salino (PBS), por 45 minutos.

Quando utilizado o bloqueio de sítios inespecíficos, após exposição antigênica em solução de tampão citrato-fosfato 10 mM pH 6,0 em steamer a 95°C durante 20 minutos e resfriamento por 20 minutos, os cortes foram incubados conforme padronização por 10 minutos em Protein Block Serum-Free (Dako) para posterior incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 4°C por 18 horas. A incubação com o sistema de detecção EnVision™ Dual Link System HRP (Dako) ocorreu por 30 minutos, e do ADVANCE HRP (Dako) em duas fases com duração de 30 minutos cada.

A diluição do anticorpo primário, padronização do bloqueio de interação inespecífica e o método de detecção utilizados para cada proteína constam no Quadro 1. A revelação da reação foi feita com 3,3'-diaminobenzidina (Dako Liquid DAB Plus, Dako) e as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Entre essas passagens, os cortes foram lavados duas vezes com solução tampão PBS pH 7,4 acrescido de Triton 0,1%. Os cortes foram então desidratados em cadeia ascendente de álcool por 5 min cada, e diafinizados em dois banhos de xilol. As lâminas foram então montadas em resina Permount (Fisher Scientific)

para exame ao microscópio de luz.

Os procedimentos de controle envolveram a utilização de amostra com reatividade conhecida positiva para cada anticorpo, funcionando como controle externo positivo da reação (Quadro 1). Como controle interno negativo, foi utilizado o mesmo tecido, onde o anticorpo primário foi substituído por soro não reativo devendo a reação ser completamente negativa.

Quadro 1. Descrição dos anticorpos primários utilizados, diluição do anticorpo primário, bloqueio de interações inespecíficas, método de detecção e tecido controle utilizados nas reações de imunistoquímica.

Anticorpo	Tipo do Anticorpo	Animal Hospedeiro	Marca	Código	Clone	Bloqueio Interações Inespecíficas	Diluição Anticorpo Primário	Kit de Visualização	Tecido Controle Positivo
α -SMA	Monoclonal	Camundongo	Dako	M0851	1A4	Sem bloqueio	1:100	EnVision™ Systems	Rato (tec.mole)
Fibronectin	Monoclonal	Camundongo	Abcam	ab2375 1	IST-9	Protein Block Serum-Free	1:1000	ADVANCE™ HRP	CEB humano
S100A4 (FSP1)	Policlonal	Coelho	Abcam	ab4072 2	-	Protein Block Serum-Free	1:500	EnVision™ Systems	CEB humano
Muscle Actin	Monoclonal	Coelho	Dako	M0635	HHF3 5	Sem bloqueio	1:500	ADVANCE™ HRP	Rato (tec. mole)
Vimentin	Monoclonal	Camundongo	Dako	M0725	V9	Sem bloqueio	1:1000	ADVANCE™ HRP	CEB humano

4.3.2 Análise Imunoistoquímica.

Para os marcadores α -SMA, Vimentina, HHF35 e Fibronectina foi considerada a imunoreatividade positiva quando células do estroma com morfologia fusiforme presentes na interface com as ilhas epiteliais neoplásicas, exibiram marcação marrom em núcleo e/ou citoplasma. Para o anticorpo FSP1 foram atribuídos os escores de acordo com a intensidade e proporção de células positivas no estroma: 1, marcação fraca em $<50\%$ ou marcação moderada em $<20\%$ de células estromais; 2, marcação fraca em $\geq 50\%$, marcação moderada em $20-50\%$ ou marcação forte em $<20\%$; 3, marcação moderada em $\geq 50\%$ ou marcação forte em $\geq 20\%$. Casos com escore 3 foram considerados positivos para expressão da proteína FSP-1.

Dois patologistas sem conhecimento prévio dos resultados clinicopatológicos avaliaram os resultados das reações imunoistoquímica, e discutiram eventuais discrepâncias até alcançar o consenso. A análise da expressão proteica foi realizada para cada marcador individualmente e a caracterização do imunofenótipo FAC (α -SMA+/Fibronectina+/FSP1+/HHF35+/Vimentina+) foi estabelecida através da expressão aos cinco marcadores.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De acordo com o delineamento da pesquisa, todos os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística através de testes não-paramétricos pelo programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA), utilizando intervalo de confiança de 95% e valor de $p < 0,05$. A associação da imunexpressão proteica do fenótipo FAC com os subtipos histológicos de FAC e com os parâmetros clinicopatológicos foi avaliada utilizando o Teste do Qui-Quadrado de *Pearson* ou Teste Exato de *Fisher* quando não houvesse condições para utilização do teste Qui-quadrado.

5. RESULTADOS

Os dados clinicopatológicos dos 34 casos de CEB analisados revelaram que a média de idade foi de 56 anos (variando de 27-89 anos, DP=13,7), sendo que 18 (58,1%) tinham menos que 60 anos e 13 (41,9%) idade igual ou superior a 60 anos. A maioria era do sexo masculino, com 25 casos, correspondendo a 80,7%. A localização principal do tumor primário foi assoalho de boca, com 14 casos (45,2%). O tamanho do tumor primário também foi um parâmetro clínico analisado, sendo que 15 (62,5%) apresentaram tamanho T1 (até 2 cm de diâmetro) ou T2 (entre 2 a 4 cm de diâmetro). Em relação a graduação histológica de malignidade, 19 (61,3%) casos foram classificados em BD, 6 (19,3%) casos MD e 6 (19,3%) PD.

De acordo com a os subtipos histológicos de FAC empregada aos casos de CEB, 16 casos (47%) foram considerados com o FAC maduro, e 18 casos (53%) como FAC imaturo (Figura 1). Nenhuma das variáveis clinicopatológicas analisadas (idade, sexo, tamanho do tumor, localização do tumor e graduação patológica) apresentou resultados estatisticamente significantes quando comparadas aos subtipos histológicos estudados (Tabela 1).

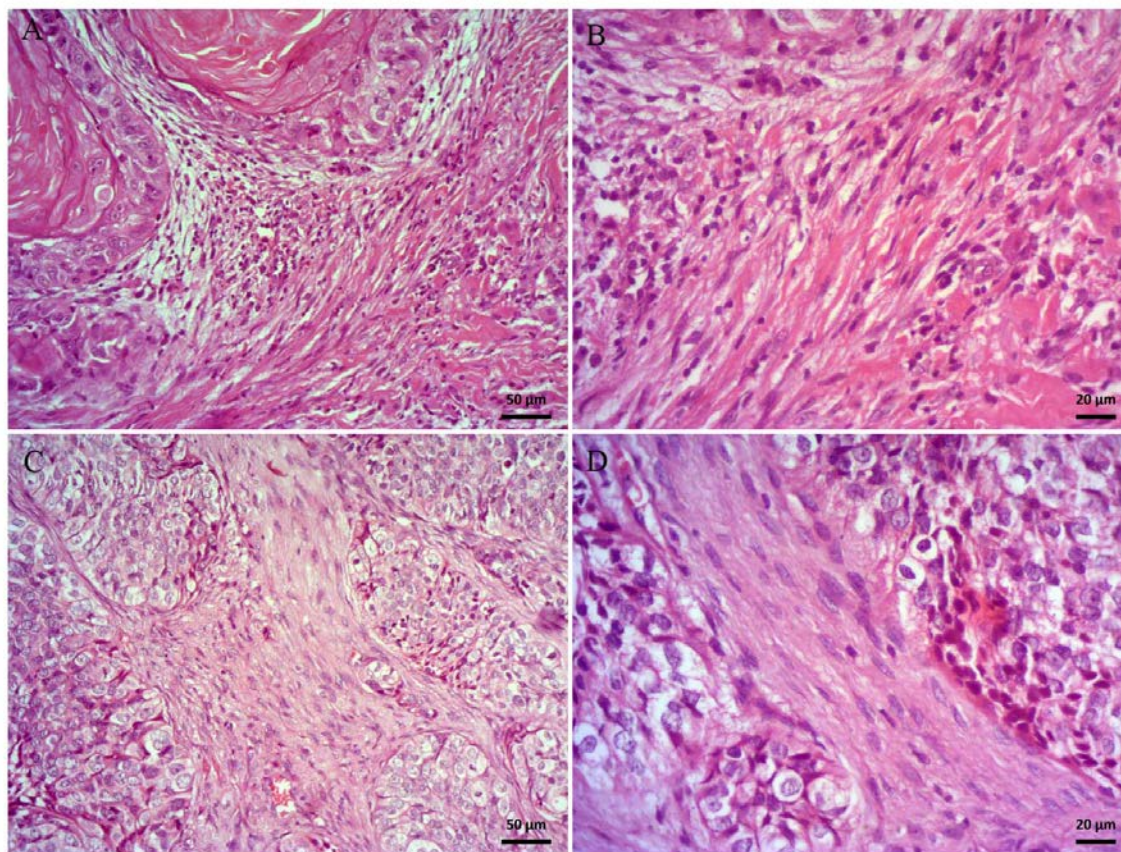


Figura 1 - Aspectos morfológicos dos subtipos histológicos de Fibroblastos Associados ao Câncer (FACs) em Carcinoma Epidermoide de Boca (CEB). O estroma tumoral que permeia as ilhotas neoplásicas exibindo FACs (A) de aspecto usual, delgado e alongado e por vezes ondulado (B), caracterizando o subtipo histológico maduro. Em C, nota-se estromatumoral de CEB rico em FACs na interface com ilhotas neoplásicas. Neste caso, os FACs apresentam-se como células largas, de aspecto fusiforme, cromatina frouxa e nucléolos proeminentes, representando o subtipo histológico imaturo. A escala indica 20 µm (B e D) e 50 µm (A e C). HE

Tabela 1. Associação dos subtipos histológicos de FAC com as características clinicopatológicas de CEB.

Características*	FAC		Valor de P [#]
	Imaturo	Maduro	
	18 (53%)	16 (47%)	
Idade			0,293
<60 anos	12 (38,7)	6 (19,4)	
≥ 60 anos	6 (19,4)	7 (22,5)	
Sexo			0,675
Feminino	3 (9,7)	3 (9,7)	
Masculino	15 (48,4)	10 (32,2)	
Tamanho do Tumor			1,000
T1+T2	7 (29,2)	8 (33,3)	
T3+T4	5 (20,9)	4 (16,6)	
Localização do Tumor			0,367
Assoalho de boca	7 (22,6)	7 (22,6)	
Língua	5 (16,1)	1 (3,2)	
Outros sítios	6 (19,3)	5 (16,2)	
Gradação Patológica			0,411
BD	8 (25,8)	11 (35,5)	
MD	4 (12,9)	2 (6,4)	
PD	4 (12,9)	2 (6,4)	

*Nos parâmetros utilizados a soma pode não corresponder ao número de casos devido dados perdidos.

[#]Teste Exato de *Fisher*, $p < 0,05$

Analisando a imunoexpressão dos marcadores α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35 e Vimentina na interface do estroma com a neoplasia (Figura 2), encontrou-se positividade de 88,2% para α -SMA, 94,0% para Fibronectina, 82,3% para FSP1, 76,4% para HHF35 e 97,1% em relação à Vimentina. A análise da expressão desses marcadores também foi realizada comparando-se à classificação histológica dos FAC em maduro ou imaturo e houve uma associação estatisticamente significativa entre a expressão positiva de α -SMA e FAC imaturos ($p=0,039$, Teste Exato de *Fisher*) (Tabela 2).

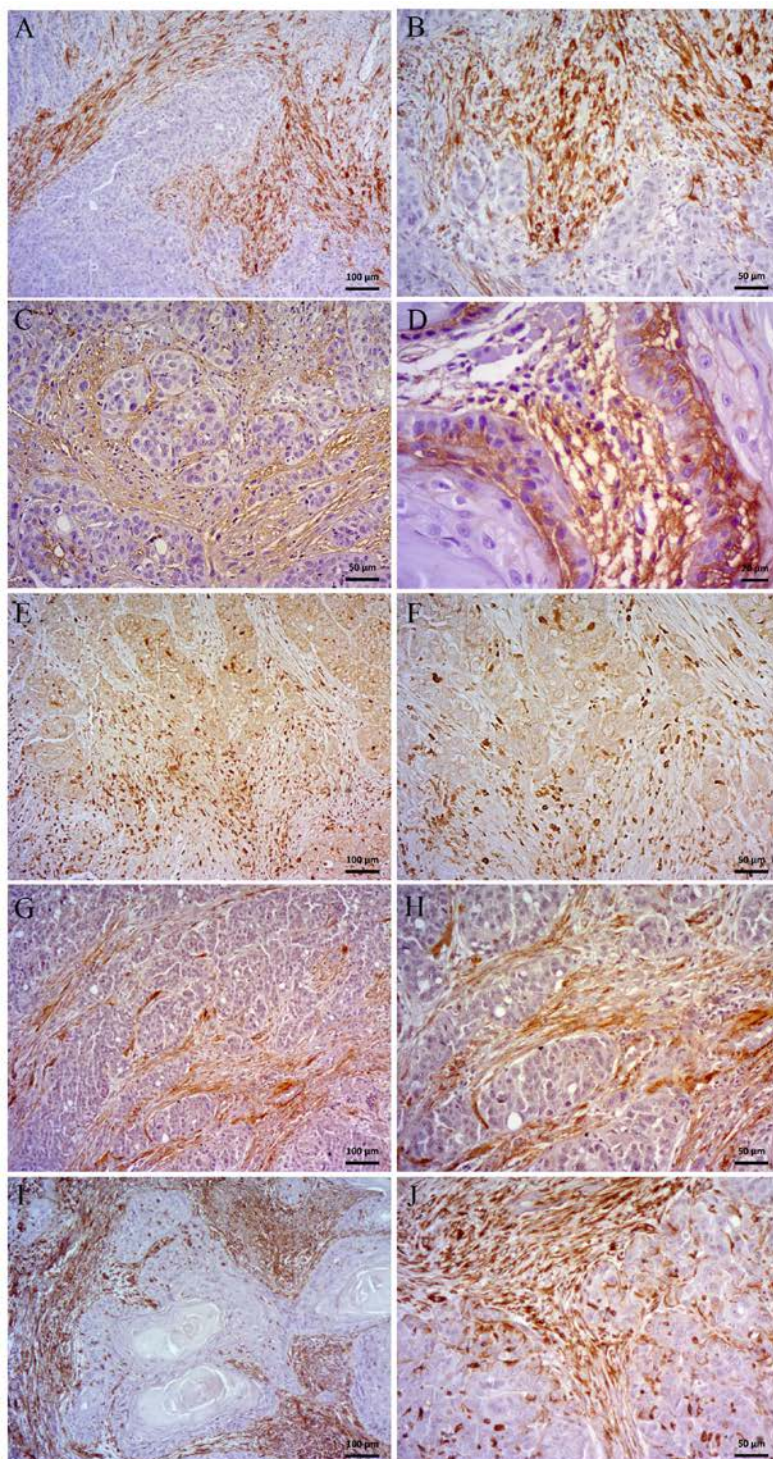


Figura 2 - Imunoexpressão de marcadores de Fibroblastos Associados ao Câncer (FACs) em Carcinoma Epidermoide de Boca (CEB) - Imunoexpressão de α -SMA em FACs na interface com ilhotas neoplásicas (A), exibindo padrão citoplasmático e nuclear (B). Imunoexpressão de Fibronectina em estroma tumoral (C), exibindo padrão citoplasmático em FACs e também em células neoplásicas da periferia das ilhotas tumorais (D). Imunoexpressão de FSP1 em FACs adjacentes a ilhotas neoplásicas (E), com padrão citoplasmático e nuclear (F). Imunoexpressão de HHF-35 em FACs no estroma tumoral que permeia as ilhotas neoplásicas (G) com padrão citoplasmático e nuclear (H). Imunoexpressão de vimentina em estroma tumoral na interface com a neoplasia (I), com padrão citoplasmático e nuclear em FACs e em algumas células neoplásicas (J). A escala indica 20 μ m (D), 50 μ m (B, C, F, H e J) e 100 μ m (A, E, G e I). Imunoperoxidase

Tabela 2. Associação entre expressão de α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35, Vimentina e classificação histológica de FAC.

	N (%)	Subtipos Histológicos		Valor de P [#]
		FAC Imaturo	FAC Maduro	
α-SMA				
Positiva	30 (88,2)	18 (52,9)	12 (35,3)	0,039
Negativa	4 (11,8)	-	4 (11,8)	
Fibronectina				
Positiva	32 (94,0)	16 (47,0)	16 (47,0)	0,486
Negativa	2 (5,9)	2 (05,9)	-	
FSP1				
Positiva	28 (82,3)	15 (44,1)	13 (38,2)	1,000
Negativa	6 (17,6)	3 (8,8)	3 (8,8)	
HHF35				
Positiva	26 (76,4)	16 (47,0)	10 (29,4)	0,110
Negativa	8 (23,5)	2 (5,9)	6 (17,6)	
Vimentina				
Positiva	33 (97,1)	18 (52,9)	15 (44,1)	0,470
Negativa	1 (2,9)	-	1 (2,9)	

*Nos parâmetros utilizados a soma pode não corresponder ao número de casos devido dados perdidos.

[#]Teste Exato de Fisher, $p < 0,05$

Para caracterização do imunofenótipo FAC, foi analisada a reatividade aos cinco marcadores simultaneamente (α -SMA+/Fibronectina+/FSP1+/HHF35+/Vimentina+) e em 19 (56%) dos casos, o imunofenótipo foi positivo para FAC. Em 15 casos (44%) não foi observada essa expressão e o imunofenótipo foi considerado variável.

Não houve associação estatisticamente significativa quando comparado a imunoexpressão dos marcadores de FAC com parâmetros clinicopatológicos. Entretanto, foi observada uma tendência para a presença de FAC estar associada à graduação patológica, uma vez que a maioria dos casos de tumores BD apresentou imunofenótipo de FAC e o padrão PD foi encontrado com mais frequência no imunofenótipo variável ($p = 0,071$, Teste Exato de Fisher), Tabela 3.

Por fim, a associação da imunoposição dos marcadores de FAC com os subtipos histológicos dos FAC em maduro ou imaturo revelou que o imunofenótipo FAC (α -SMA+/ Fibronectina+/ Vimentina+/ HHF35+/ FSP1+) foi encontrado com mais frequência nos FAC imaturos que nos maduros, e essa associação foi estatisticamente significativa ($p=0,041$), como indicado na Tabela 3.

Tabela 3. Associação do Imunofenótipo FAC por coexpressão de α -SMA, Fibronectina, HHF35, Vimentina e FSP-1 com achados clinicopatológicos e classificação histológica de FAC.

Características	Total	Imunofenótipo FAC	Imunofenótipo Variável	Valor de P [#]
Idade*				1,000
<60 anos	18 (58,0)	10 (32,2)	8 (25,8)	
≥ 60 anos	13 (42,0)	7 (22,6)	6 (19,3)	
Sexo*				1,000
Feminino	6 (19,3)	3 (9,7)	3 (9,7)	
Masculino	25 (80,6)	14 (45,1)	11 (35,5)	
Tamanho do Tumor*				1,000
T1+T2	15 (62,5)	6 (25,0)	9 (37,5)	
T3+T4	9 (37,5)	4 (16,6)	5 (20,8)	
Localização do Tumor*				0,669
Assoalho de boca	15 (48,4)	8 (25,7)	7 (22,6)	
Língua	5 (16,1)	2 (6,4)	3 (9,7)	
Outros Sítios	11 (35,5)	7 (22,6)	4 (13,0)	
Gradação Patológica*				0,071
BD	19 (61,3)	12 (38,7)	7 (22,6)	
MD	6 (19,4)	3 (9,7)	3 (9,7)	
PD	6 (19,3)	1 (3,2)	5 (16,1)	
Subtipos Histológicos				0,041
FAC Imaturo	18 (53,0)	13 (38,2)	5 (14,7)	
FAC Maduro	16 (47,0)	6 (17,6)	10 (29,4)	

*Nos parâmetros utilizados a soma pode não corresponder ao número de casos devido dados perdidos.

[#]Teste Exato de Fisher, $p < 0,05$

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou a presença de FAC em CEB através da expressão imunohistoquímica de cinco marcadores de FAC e associou o imunofenótipo FAC com subtipos histológicos e com parâmetros clinicopatológicos de pacientes portadores de CEB. Em 19 casos (56%), o imunofenótipo foi positivo para FAC e em 15 casos (44%), o imunofenótipo foi variável. De acordo com a classificação histológica de FAC, 16 casos (47%) foram considerados com o fenótipo de FAC maduro, e 18 casos (53%) como fenótipo FAC imaturo. Houve associação entre a expressão positiva de α -SMA e FAC imaturo, e foi observado que o imunofenótipo FAC se associou com tipo histológico FAC imaturo nesses tumores.

Fibroblastos são as células mais abundantes e versáteis do tecido conjuntivo, mostrando uma notável capacidade de se diferenciar em outros elementos, tais como osteoblastos, condroblastos, adipócitos e células musculares lisas. Essas transformações são reguladas por hormônios e fatores de crescimento secretados pela matriz extracelular circundante. É possível coexistirem lado a lado fibroblastos “maduros”, que tem uma menor capacidade de transformação, e fibroblastos “imatuross”, que podem se desenvolver em uma variedade de tipos de células maduras. Geralmente, fibroblastos imaturos são conhecidos por mostrar tipicamente um amplo núcleo eucromático, com um ou dois nucléolos, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi proeminentes em achados ultraestruturais. Fibroblastos imaturos frequentemente são chamados de células mesenquimais (ALBERTS et al., 2002).

Primeiramente examinamos o fenótipo FAC baseado em categorias histológicas de FAC. Segundo a classificação de HA et al. (2014), 18 (53%) casos foram classificados como FAC imaturo, definido como células fusiformes grandes, largas, com nucléolos proeminentes, e 16 casos (47%) como FAC maduro, caracterizado pela morfologia ondulada, alongada, delgada semelhante a fibroblastos normais. Resultados semelhantes foram obtidos pelo estudo prévio de HA et al. (2014) em carcinoma epidermoide esofágico (CEE), que classificou 55,2% dos casos como FAC imaturos e 44,8% dos casos como FAC maduros. Esse autor também encontrou correlação entre categorias histológicas e

desfechos clínicos: o fenótipo FAC imaturo foi fortemente correlacionado com diminuição da sobrevida global e sobrevida livre de doença. Outros fatores relacionados ao microambiente tumoral e diretamente envolvidos com a progressão do câncer, tais como aumento na densidade de microvasos, aumento de macrófagos associados a tumor e fenótipo de TEM, foram significativamente mais frequentes nos fenótipos FAC imaturos que no fenótipo maduro. Esses achados demonstraram que a classificação histológica do fenótipo FAC é clinicamente relevante e pode representar um marcador de prognóstico confiável em CEE, apesar da necessidade de uma compreensão mais detalhada do seu mecanismo molecular.

Em CEB, essa classificação necessita de avaliação quanto ao seu valor prognóstico. No presente estudo, nenhuma das variáveis clinicopatológicas analisadas (idade, sexo, tamanho do tumor, localização do tumor e graduação patológica) apresentou resultados estatisticamente significantes quando comparadas aos subtipos histológicos de FAC. Investigações futuras que incluam estudos com uma maior casuística e com dados que possibilitem estimar o prognóstico da doença (estadiamento TNM, taxas de sobrevida e metástases) são necessárias para validar a caracterização histológica como biomarcador em CEB.

Até então não existe uma técnica específica de detecção de FAC. Eyden (2008) afirma que uma definição mais precisa de miofibroblastos deve incluir características ultraestruturais tais como retículo endoplasmático rugoso proeminente, miofilamentos periféricos, presença de fibronexos e junções *gap*, em combinação com imunofenótipo positivo para α -SMA, fibronectina e vimentina no contexto de células com morfologia fusiforme, o que destaca a importância da imunofenotipagem para caracterização de FAC.

Para caracterização do imunofenótipo FAC, analisamos a reatividade aos cinco marcadores simultaneamente, já que até o momento não foi identificada especificidade absoluta de marcadores FAC. Eyden (2008) define imunofenótipo de miofibroblastos pela expressão imuno-histoquímica de α -SMA, vimentina, fibronectina e miosina não muscular. Nós escolhemos α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35, Vimentina com base em estudos anteriores que mostram valor prognóstico desses marcadores individuais em CEB ou outros carcinomas

(BELLO et al., 2011; DING et al., 2014; HERRERA et al., 2013; MARSH et al., 2011; OSAMU et al., 1997; VERED et al., 2010b).

A expressão isolada de α -SMA é amplamente utilizada na caracterização de FAC (BELLO et al., 2011; DING et al., 2014; MARSH et al., 2011; VERED et al., 2010b), entretanto devido à diversidade de origem celular de FAC e grande heterogeneidade de fenótipos FAC, marcadores adicionais são necessários para uma boa especificidade (MAO et al., 2013). Esse é o primeiro estudo a utilizar a expressão de α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35 e Vimentina para caracterizar os FAC em CEB. Exceto a α -SMA, marcador mais utilizado na identificação de miofibroblastos diferenciados (BELLO et al., 2011), tentamos validar a co-expressão aos outros quatro anticorpos para caracterização do imunofenótipo FAC em CEB, e observamos com os resultados da imunohistoquímica que todos esses anticorpos foram caracteristicamente expressos em fibroblastos do estroma próximos de células neoplásicas, sugerindo co-expressão de Fibronectina, FSP1, HHF35, Vimentina como imunofenótipo característico de FAC em CEB.

A α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35 e Vimentina foram expressos em 88,2%, 94%, 82,3%, 76,4% e 97,1% dos fibroblastos do estroma em CEB, respectivamente. No trabalho de HA et al. (2014) com CEE, os marcadores FAC utilizados α -SMA, FSP1, FAP, PDGFR e PDGFRB foram expressos em 82,8%, 72,4%, 61,2%, 88,8%, 54,3% dos fibroblastos estromais, respectivamente, e esse autor observou ainda expressão extremamente heterogênea aos cinco marcadores FAC em cada CEE analisado (N=116). No nosso estudo, classificamos imunofenótipo FAC com base na reatividade aos cinco marcadores simultaneamente (α -SMA+, Fibronectina+, FSP1+, HHF35+, Vimentina+) e imunofenótipo dito variável quando não foi observada essa coexpressão. Dos 34 casos de CEB analisados, em 19 (56%) o imunofenótipo foi positivo para FAC e em 15 casos (44%) foi considerado imunofenótipo variável.

Especificamente, a análise de expressão dos marcadores FAC de acordo com classificação histológica revelou que houve uma associação estatisticamente significativa entre a expressão positiva de α -SMA e FAC imaturos. A α -SMA tem sido descrita como o marcador mais importante para identificar FAC (BELLO et al., 2011; DE WEVER et al., 2008; HINZ et al., 2007) e representa um importante marcador de prognóstico independente em CEB (BELLO et al., 2011; MARSH et

al., 2011; VERED et al., 2010b). Num estudo retrospectivo com 282 pacientes realizado por Marsh et al. (2011), a alta expressão de α -SMA foi preditiva de mortalidade em CEB.

O anticorpo anti-FSP1, também chamada S100A4, é reativo em fibroblastos de diferentes órgãos em remodelação de tecidos e em estroma tumoral (OKADA et al., 2000). Entre todos os marcadores conhecidos, a proteína FSP1 parece oferecer a melhor especificidade para a detecção *in vivo* de fibroblastos (KALLURI; ZEISBERG, 2006). A expressão aberrante de FSP1 está correlacionada à promoção do crescimento de tumores e metástases (SHERBET, 2009) e já foi demonstrado valor prognóstico significativo de FAC caracterizados por FSP1 em câncer colorretal (HERRERA et al., 2013; OSAMU et al., 1997) e carcinoma esofágico (HA et al., 2014). Apesar da escassa utilização desse anticorpo em CEB, foi verificada associação entre FAC positivos para FSP1 adjacentes à células neoplásicas com evidência de TEM em carcinoma de língua (VERED et al., 2010b). No presente trabalho, fibroblastos estromais exibiram positividade a FSP1 em 28 (82,3%) casos, mas não observamos associação entre expressão de FSP1 e os subtipos histológicos de FAC. Sugimoto et al. (2006) utilizando um modelo ortotópico com câncer de mama e de pâncreas, encontrou um subconjunto específico de células FSP1 positivas que não expressaram marcadores clássicos de miofibroblastos, incluindo α -SMA e desmina.

Outros autores estudaram a expressão de FSP1 em macrófagos inflamatórios e se observou que FSP1 identifica uma população única de macrófagos inflamatórios em lesão hepática, fibrose e câncer, que se sobrepõe aos marcadores α -SMA e PDGFR β nos casos analisados (ÖSTERREICHER et al., 2010). Dos 28 casos que analisamos como positivos para FSP1, 25 (89,3%) foram também positivos para α -SMA e o subgrupo específico FSP1+/ α -SMA- foi encontrado em 3 casos (10,7%) dos casos positivos para FSP1, os quais também apresentavam fenótipo FAC maduro. Esse achado é apenas descritivo e necessita de maior investigação, mas possivelmente corrobora com nosso achado que o fenótipo FAC imaturo dependa da expressão de α -SMA. Já HA et al. (2014) demonstrou que dos cinco marcadores FAC utilizados, a expressão do FSP1 foi mais frequentemente encontrada em CEE com FAC imaturos do que com os maduros.

Tem-se reconhecido que o microambiente tumoral, o qual é composto por vários componentes da MEC, células endoteliais, células inflamatórias e FAC, tem contribuição significativa para a progressão do CEB (GOETZ et al., 2011; LI et al., 2015). Muitas vezes FAC representam a maioria das células do estroma tumoral (XING; SAIDOU; WATABE, 2010), e em geral FAC têm sido demonstrados em cerca de 50% dos CEBs (THODE et al., 2011). Uma proporção significativa de FAC particularmente em frente de invasão já foi relatado em 73%, 60% e 54% de CEBs estudados por Lewis et al. (2004), Kellermann et al. (2007), Vered et al. (2010), respectivamente. Outros trabalhos mostraram que apesar da presença de FAC associar-se à estágios clinicopatológicos, esses não são constituintes comuns da maioria dos CEBs devido disparidade de expressão de TGF- β entre diferentes amostras de CEB utilizadas (DE-ASSIS et al., 2012; MARSH et al., 2011).

No presente estudo, a presença de FAC detectadas por imunofenotipagem foi de 56% (n=19) dos casos analisados, estando em conformidade com o que relata a maioria dos autores, e não houve associação estatisticamente significativa quando comparado imunofenótipo FAC aos parâmetros clínico-patológicos utilizados. Entretanto foi observada uma tendência de associação da presença de FAC estar associada à graduação patológica, uma vez que a maioria dos casos de tumores BD apresentou imunofenótipo de FAC e o padrão PD exibiu com mais frequência imunofenótipo variável. Similarmente, outros autores encontraram um aumento da prevalência de FAC quando a diferenciação tumor aumentava de pobremente diferenciado para bem diferenciado (KELLERMANN et al., 2007; LUKSIC et al., 2015). Em contraste, o fenótipo de FAC foi menos frequente em tumores BD que PD (DE-ASSIS et al., 2012; HA et al., 2014). Mais estudos são necessários para possibilitar a associação entre FAC e graduação patológica em CEB.

Investigações recentes demonstram que a presença de FAC caracterizados por imunoistoquímica no estroma do CEB particularmente em frente invasivo do tumor têm uma correlação significativa com parâmetros clínico-patológicos. Um incremento de FAC detectados por α -SMA no estroma de CEB foi significativamente correlacionado com maior estágio T, presença de metástases regionais ocultas e metástases distantes (LUKSIC et al., 2015) e FAC representou

um fator prognóstico independente para pacientes com CEB através da capacidade de promover o crescimento, proliferação, metástase e até mesmo TEM de células neoplásicas (LI et al., 2015; VERED et al., 2010b).

Previamente, outros resultados mostraram associação entre a presença de FAC e menores taxas de sobrevivência em CEB (BELLO et al., 2011; KAWASHIRI et al., 2009; MARSH et al., 2011; SOBRAL et al., 2011a). Quanto aos parâmetros clínicos, Vered et al. (2010) verificaram maior frequência de tumores com alto escore de miofibroblastos em pacientes com menos de 60 anos. Outros estudos mostraram que não houve diferença significativa entre a presença de FAC no estroma de CEB afetando pacientes jovens e idosos (FONSECA et al., 2014).

Outros resultados revelam percentuais imunoistoquímicos importantes de CEB que apresentam escassa quantidade de FAC ou são considerados negativos para estes tipos celulares. No trabalho realizado por Kellermann et al. (2008), 39,48% (n=15) dos CEB foram classificados como negativos para FAC em seus estromas e 47,82% (n=11) dos casos considerados positivos revelaram escassa quantidade destes tipos celulares. Apesar disto, estes autores observaram correlação significativa entre abundante quantidade de miofibroblastos no estroma tumoral e envolvimento linfonodal regional, estadiamento clínico avançado e recorrência regional. Em outro estudo, De-Assis et al. (2012) relataram uma quantidade abundante de FAC em 15 (36,58%) de 41 casos de CEB avaliados, e a maioria dos quais apresentava alto grau histológico de malignidade. Em conjunto, os achados destes estudos revelam que FAC não estão presentes de forma abundante em todos os CEB, mas adicionalmente sugerem o envolvimento de FAC apenas em estágios mais avançados da carcinogênese oral. Portanto, a análise da quantidade desses componentes estromais pode auxiliar na identificação de lesões com comportamento biológico mais agressivo (CARNEIRO LÚCIO et al., 2013; DE-ASSIS et al., 2012; KELLERMANN et al., 2008).

As evidências de que densidade de FAC pode ser útil na previsão do prognóstico de CEB se baseiam no papel que FAC exerce de modificar o microambiente tumoral. Através da produção de fatores de crescimento e quimiocinas na MEC, FAC contribuem para tumorigênese, facilita o crescimento do tumor primário, apoia invasão e metástase das células malignas, e induz a

inflamação em regiões de câncer (BELLO et al., 2011; THODE et al., 2011; VERED et al., 2010b; XING; SAIDOU; WATABE, 2010) e ainda pode modular TEM em CEB (DESMOULIÈRE et al., 1995; DING et al., 2014; LI et al., 2015; VERED et al., 2010b).

Apesar das pesquisas publicadas sobre a presença de miofibroblastos em CEB evidenciarem um valor prognóstico dos FAC, estudos sobre os mecanismos moleculares pelos quais FAC influenciam o comportamento biológico do CEB são escassos (MERTENS et al., 2013). Novas investigações sobre interações do estroma e características fenotípicas de FAC associados ao fronte de invasão tumoral são necessárias a fim de estabelecer novos marcadores de diagnóstico e estratégias terapêuticas apropriadas.

Quanto à associação dos subtipos histológicos com expressão de marcadores de FAC, HA et al. (2014) observaram diferentes padrões de expressão dos marcadores FAC em CEE, no entanto, o número total de marcadores FAC foi maior no fenótipo FAC imaturo do que no tipo maduro. Em consonância a esse achado e de forma inédita em CEB, o presente estudo encontrou o imunofenótipo positivo para FAC com mais frequência nos FAC imaturos que nos maduros. Assim, hipotetizamos que a expressão dos marcadores mesenquimais de FAC também sugerem a ocorrência do fenômeno da TEM nessas células.

De fato, alguns estudos sugeriram que FAC são gerados a partir de células epiteliais que sofreram TEM para adquirir fenótipo de células mesenquimais que expressam marcadores FAC (JENSEN et al., 2015; ORR et al., 2012; PETERSEN et al., 2003; ZEISBERG et al., 2007). Adicionalmente, o fenótipo completo de TEM caracterizada pela perda de expressão de E-caderina e aquisição da expressão de marcadores mesenquimais, foi significativamente mais frequente nos fenótipos FAC imaturos que no fenótipo maduro, bem como o fenótipo de FAC imaturo já foi associado com evolução clínica adversa em carcinoma esofágico, sendo potencial preditor de prognóstico nesta neoplasia (HA et al., 2014).

O mecanismo mais aceito na literatura acerca da origem dos miofibroblastos é a transdiferenciação de fibroblastos pré-existentes, postulado por Gabbiani et al (1971). No entanto, TEM é o segundo maior mecanismo postulado para fornecer uma origem para miofibroblastos em condições de fibrose (KALLURI; NEILSON,

2003) e estroma tumoral (GUARINO, 2007). TEM é caracterizada por uma perda de adesão intercelular de E-caderina e aquisição de um fenótipo tipicamente mesenquimal com mobilidade aumentada, tornando as células neoplásicas capazes de penetrar nos tecidos circundantes (THIERY, 2002). É um processo dinâmico e reversível, que tem sido observada com um amplo espectro de fenótipos (HUBER; KRAUT; BEUG, 2005).

Muitos autores observaram no epitélio transformado de diferentes carcinomas a possível ocorrência de TEM (através da perda de fenótipo epitelial) de forma concomitante ao aumento da expressão de marcadores correspondentes à miofibroblastos do estroma adjacente. Dessa forma, sugerem que muitos FAC, na verdade, representam células epiteliais malignas que tenham sido submetidos à TEM (KALLURI; ZEISBERG, 2006; PETERSEN et al., 2003; SPAETH et al., 2009; TRUJILLO et al., 2011; ZEISBERG et al., 2007). Para Routray, Sunkavali e Bari (2013), a presença de FAC no frente invasivo do tumor comprova a diferenciação através de TEM, porém as explicações para essa estimulação são insuficientes.

Em CEB, estudos que abordam FAC no contexto na TEM exploram o papel que miofibroblastos tem de induzir a TEM em células tumorais na progressão do câncer (DING et al., 2014; JENSEN et al., 2015; LI et al., 2015). A expressão proteica de marcadores mesenquimais nas células fusiformes caracterizadas como FAC estão possivelmente correlacionados ao fenômeno da TEM. No entanto, definir os possíveis mecanismos para a origem, ativação e diferenciação de FAC continua sendo o principal obstáculo no âmbito da biologia dos miofibroblastos (JENSEN et al., 2015). Uma maior compreensão dos mecanismos da TEM pode auxiliar nesse processo e aumentar as possibilidades de isolamento destas células para fins terapêuticos.

Recentemente vários estudos têm mostrado a importância e o papel do estroma tumoral, incluindo FAC na progressão do câncer. No entanto, existe forte evidência que os fibroblastos em diferentes partes do corpo são intrinsecamente diferentes. Este estudo originalmente analisou os fibroblastos estromais em CEB com base na histologia e imunofenótipo e determinou um imunofenótipo FAC e biomarcadores que podem apoiar pesquisas futuras em CEB. Embora o estudo tenha demonstrado de forma inédita que o imunofenótipo FAC se associa com

tipo histológico FAC imaturo em CEB, são necessários estudos prospectivos com número significativo de pacientes e informações referentes ao desfecho clínico para assegurar o valor clínico desse achado.

7. CONCLUSÕES

- As proteínas α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35 e Vimentina se expressam positivamente em fibroblastos estromais da maioria dos CEBs;
- A expressão imunoistoquímica das proteínas α -SMA, Fibronectina, FSP1, HHF35 e Vimentina caracteriza um imunofenótipo apropriado de FAC em CEB;
- O imunofenótipo FAC se associa ao subtipo histológico imaturo de FAC;
- O fenótipo FAC imaturo se associa com expressão isolada do marcador α -SMA, mas pode não estar associada com expressão do FSP1.

REFERÊNCIAS

- ABUL, K.; ABBAS, N.F.; KUMAR, V. **Patologia: Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. Fibroblasts and their transformations: the connective-tissue cell family, 4 ed., New York: Garland Science, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28373/>>. Acesso em: 21 de dez 2015.
- AOYAGI, Y. et al. Overexpression of TGF- β by infiltrated granulocytes correlates with the expression of collagen mRNA in pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 91, n. 7, p. 1316–1326, 2004.
- ARMULIK, A.; GENOVÉ, G.; BETSHOLTZ, C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. **Developmental Cell**, v. 21, n. 2, p. 193–215, 2011.
- BAE, J. Y. et al. Reciprocal Interaction between Carcinoma-Associated Fibroblasts and Squamous Carcinoma Cells through Interleukin-1 alpha Induces Cancer Progression. **Neoplasia**, v. 16, n. 11, p. 928–938, 2014.
- BELLO, I. O. et al. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. **Oral Oncol**, v. 47, n. 1, p. 33–38, 2011.
- BERNDT, A. et al. Effects of activated fibroblasts on phenotype modulation, EGFR signalling and cell cycle regulation in OSCC cells. **Experimental cell research**, v. 322, n. 2, p. 402–14, 2014.
- BOUMBER, B. Y.; ISSA, J. J.; DE, D. M. Epigenetics in Cancer: What 's the Future? **Drugs**, v. 25, n. 3, p. 1–13, 2011.
- BRANDIZZI, D. et al. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 13, n. 9, p. 544–548, 2008.
- CALVO, F. et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 637–646, 2013.
- CAMP, J. T. et al. Interactions with fibroblasts are distinct in Basal-like and luminal breast cancers. **Mol Cancer Res**, v. 9, n. 1, p. 3–13, 2011.
- CARDESA, A.; GALE, N.; NADAO, A.; ZIDAR, N. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: **IARC Press**, 2005; 120–3.
- CARNEIRO LÚCIO, P. S. et al. Myofibroblasts and their relationship with oral squamous cell carcinoma. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 1, p. 112–118, 2013.
- CHANG, H. Y. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 12877–12882, 2002.

CIRRI, P.; CHIARUGI, P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. **Cancer metastasis reviews**, v. 31, n. 1-2, p. 195–208, jun. 2012.

DALY, A. J.; MCILREAVEY, L.; IRWIN, C. R. Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblasts - Implications for invasion of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 44, n. 7, p. 646–651, 2008.

DARBY, I. A. et al. Skin flap-induced regression of granulation tissue correlates with reduced growth factor and increased metalloproteinase expression. **The Journal of pathology**, v. 197, n. 1, p. 117–27, 2002.

DE WEVER, O. et al. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 10, p. 2229–2238, 2008.

DE-ASSIS, E.-M. et al. Stromal myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 17, n. 5, p. e733–8, 2012.

DESMOULIÈRE, A et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 56–66, 1995.

DESMOULIÈRE, A.; GUYOT, C.; GABBIANI, G. The stroma reaction myofibroblast: A key player in the control of tumor cell behavior. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 509–517, 2004.

DING, L. et al. α -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. **Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 43, n. 5, p. 335–43, maio 2014.

DUFORT, C. C.; PASZEK, M. J.; WEAVER, V. M. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 5, p. 308–319, 2011.

DUMONT, N. et al. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 3, p. 249–62, 2013.

EREZ, N. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner. **Cancer Cell**, v. 17, n. 2, p. 135–147, 2010.

ETEMAD-MOGHADAM, S. et al. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 8, p. 639–643, 2009.

EYDEN, B. The myofibroblast: Phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine: Translational Medicine. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 22–37, 2008.

EYDEN, B. et al. The myofibroblast and its tumours. **Journal of clinical pathology**, v. 62, n. 3, p. 236–249, 2009.

- EYDEN, B.; CURRY, A.; WANG, G. Stromal cells in the human gut show ultrastructural features of fibroblasts and smooth muscle cells but not myofibroblasts Subepithelial and interstitial stromal cells. v. 15, n. 7, p. 1483–1491, 2011.
- FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453–458, 2003.
- FONSECA, F. P. et al. Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients - a multicenter collaborative study. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 118, n. 4, p. 483–9, 2014.
- FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of cell science**, v. 123, p. 4195–4200, 2010.
- FRANZ, M. et al. Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 131, n. 5, p. 651–660, 2009.
- FRANZ, M. et al. Stromal laminin chain distribution in normal, hyperplastic and malignant oral mucosa: relation to myofibroblast occurrence and vessel formation. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 39, n. 4, p. 290–8, 2010.
- GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 500–503, 2003.
- GAGGIOLI, C. et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 12, p. 1392–1400, 2007.
- GOETZ, J. G. et al. Biomechanical Remodeling of the Microenvironment by Stromal Caveolin-1 Favors Tumor Invasion and Metastasis. **Cell**, v. 146, n. 1, p. 148–163, 2011.
- GONDA, T. A. et al. Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: Can these cells be targeted in anti-cancer therapy? **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 2–10, 2010.
- GRUM-SCHWENSEN, B.; KLINGELHOFER, J. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4 (mts1) gene. **Cancer research**, v. 4, n. 9, p. 3772–3780, 2005.
- GUARINO, M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 2153–2160, 2007.
- HA, S. Y. et al. The Prognostic Significance of Cancer-Associated Fibroblasts in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99955, 2014.
- HERRERA, M. et al. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. **Cancer Science**, v. 104, n. 4, p. 437–444, 2013.
- HINZ, B. et al. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **The American journal of pathology**, v. 159, n. 3, p. 1009–1020, 2001a.

HINZ, B. et al. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 9, p. 2730–41, 2001b.

HINZ, B. et al. The Myofibroblast. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 6, p. 1807–1816, 2007.

HINZ, B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. **Journal of Biomechanics**, v. 43, n. 1, p. 146–155, 2010.

HUANG, C.-H. et al. Clinicopathologic Evaluation of Prognostic Factors for Squamous Cell Carcinoma of the Buccal Mucosa. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 70, n. 4, p. 164–170, 2007.

IKUSHIMA, H.; MIYAZONO, K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 6, p. 415–424, 2010.

JENSEN, D. H. et al. Single cell migration in oral squamous cell carcinoma - possible evidence of epithelial-mesenchymal transition in vivo. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, p. n/a–n/a, 2015.

JOYCE, J. A; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–252, 2009.

JUNTTILA, M. R.; DE SAUVAGE, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 346–354, 2013.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. v. 112, n. 12, 2003.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, 2006.

KARAGIANNIS, G. S. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 11, p. 1403–1418, 2012.

KAWASHIRI, S. et al. SIGNIFICANCE OF STROMAL DESMOPLASIA AND MYOFIBROBLAST APPEARANCE AT THE INVASIVE FRONT IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY. **Head Neck**, v. 31, p. 1346–1353, 2009.

KELLERMANN, M. G. et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 849–853, 2007.

KELLERMANN, M. G. et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: Induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. **Oral Oncology**, v. 44, n. 5, p. 509–517, 2008.

KESSENBRÖCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.

KLEMM, F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 4, p. 198–213, 2014.

KOJIMA, Y. et al. Autocrine TGF- and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)

signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 46, p. 20009–20014, 2010.

LEVER, E.; SHEER, D. The role of nuclear organization in cancer. **The Journal of pathology**, v. 220, n. September, p. 114–125, 2010.

LEWIS, M. P. et al. Tumour-derived TGF- β 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 4, p. 822–832, 2004.

LI, H. et al. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. **J Transl Med**, v. 13, n. 1, p. 198, 2015.

LIU, J. et al. G-protein α -s and -12 subunits are involved in androgen-stimulated PI3K activation and androgen receptor transactivation in prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 71, n. 12, p. 1276–86, set. 2011.

LIU, L.-K. et al. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 23, n. 2, p. 213–24, fev. 2010.

LUGA, V. et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. **Cell**, v. 151, n. 7, p. 1542–1556, 2012.

LUKSIC, I. et al. Significance of myofibroblast appearance in squamous cell carcinoma of the oral cavity on the occurrence of occult regional metastases, distant metastases, and survival. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 9, p. 1075–1080, 2015.

MAESHIMA, A. M. et al. Modified scar grade. **Cancer**, v. 95, n. 12, p. 2546–2554, 2002.

MAJNO, G. et al. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. **Science (New York, N.Y.)**, v. 173, n. 996, p. 548–550, 1971.

MAO, Y. et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 1-2, p. 303–315, 2013.

MARSH, D. et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **Journal of Pathology**, v. 223, n. January, p. 470–481, 2011.

MCANULTY, R. J. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 4, p. 666–671, 2007.

MERTENS, J. C. et al. Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. **Cancer research**, v. 73, n. 2, p. 897–907, 2013.

MICALLEF, L. et al. The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 5 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S5, 2012.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 5, p. 558–64, 2004.

NABA, A. et al. The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 4, p. M111.014647–M111.014647, 2012.

NAWSHAD, A. et al. Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. **Cells, tissues, organs**, v. 179, n. 1-2, p. 11–23, 2005.

NIELSEN, J. D. et al. Influences of tumor stroma on the malignant phenotype. **Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 37, n. 7, p. 412–6, 2008.

OKADA, H. et al. Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. **Kidney international**, v. 58, n. 2, p. 587–597, 2000.

OLUMI, A. F. et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. **Cancer Research**, v. 59, n. 19, p. 5002–5011, 1999.

ORR, B. et al. Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. **Oncogene**, v. 31, n. 9, p. 1130–1142, 2012.

OSAMU, K. et al. A number have. v. 3, n. December, p. 2309–2316, 1997.

ÖSTERREICHER, C. H. et al. Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. 2010.

OTOMO, R. et al. TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 52, p. 18691–6, 2014.

OTRANTO, M. et al. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. **Cell Adhesion and Migration**, v. 6, n. 3, p. 203–219, 2012.

ÖZDEMİR, B. C. et al. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. **Cancer Cell**, v. 25, n. 6, p. 719–734, 2014.

PARDALI, K.; MOUSTAKAS, A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1775, n. 1, p. 21–62, 2007.

PETERSEN, O. W. et al. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. **The American journal of pathology**, v. 162, n. 2, p. 391–402, 2003.

PIETRAS, K.; ÖSTMAN, A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1324–1331, 2010.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 17, p. 2713–2722, 2010.

RHIM, A. D. et al. Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cancer Cell**, v. 25, n. 6, p. 735–747, 2014.

RONNOV-JESSEN, L. et al. The Origin of the Myofibroblasts in Breast Cancer. **J Clin Invest**, v. 95, n. 2, p. 859–873, 1995.

ROUTRAY, S.; SUNKAVALI, A; BARI, K. Carcinoma-associated fibroblasts, its implication in head and neck squamous cell carcinoma: a mini review. **Oral diseases**, p. 246–253, 2013.

SAMBASIVARAO, S. V. NIH Public Access. v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2013.

SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 2, p. 153–162, 2009.

SCHWENCKE, C. et al. Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: Implications for human disease. **Cardiovascular research**, v. 70, n. 1, p. 42–9, 1 abr. 2006.

SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: Clinico-pathological applications. **Oral Oncology**, v. 36, p. 404–413, 2000.

SEIFI, S. et al. Myofibroblast stromal presence and distribution in squamous epithelial carcinomas, oral dysplasia and hyperkeratosis. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 11, n. 2, p. 359–64, 2010.

SEMBA, S. et al. Direct cancer-stromal interaction increases fibroblast proliferation and enhances invasive properties of scirrhous-type gastric carcinoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 8, p. 1365–1373, 2009.

SERINI, G.; GABBIANI, G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. **Experimental cell research**, v. 250, p. 273–283, 1999.

SHERBET, G. V. Metastasis promoter S100A4 is a potentially valuable molecular target for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 280, n. 1, p. 15–30, 2009.

SHIMODA, M. et al. Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 889–901, 2014.

SOBRAL, L. M. et al. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. **Oral oncology**, v. 47, n. 9, p. 840–6, 2011a.

SOBRAL, L. M. et al. Isolation and characterization of myofibroblast cell lines from oral squamous cell carcinoma. **Oncology reports**, v. 25, n. 4, p. 1013–20, 2011b.

SPAETH, E. L. et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. **PLoS one**, v. 4, n. 4, p. e4992, 2009.

SUROWIAK, P. et al. Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. **Anticancer Res**, v. 27,

p. 2917–2924, 2007.

SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. SUPPL., p. 59–66, 2005.

TARIN, D. Tissue Interactions in Morphogenesis , Morphostasis and Carcinogenesis. p. 61–72, 1972.

THODE, C. et al. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 3, p. 201–207, 2011.

TIPPENS, D. et al. and Biochemical Characterization. 1986.

TOGO, S. et al. Carcinoma-Associated Fibroblasts Are a Promising Therapeutic Target. **Cancers**, v. 5, n. 1, p. 149–169, 2013.

TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 3, n. 5, p. 349–63, 2002.

TRUJILLO, K. A et al. Markers of fibrosis and epithelial to mesenchymal transition demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 129, n. 6, p. 1310–21, 2011.

TRUONG, M. et al. Using the epigenetic field defect to detect prostate cancer in biopsy negative patients. **The Journal of urology**, v. 189, n. 6, p. 2335–41, jun. 2013.

TSUJINO, T. et al. Stromal Myofibroblasts Predict Disease Recurrence for Colorectal Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 7, p. 2082–2090, 2007.

UENO, H. et al. Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. **Gut**, v. 53, n. 4, p. 581–6, 2004.

VERED, M. et al. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. **Oral Oncology**, v. 43, p. 999–1006, 2007.

VERED, M. et al. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. **Cancer Science**, v. 101, n. 1, p. 274–280, 2010a.

VERED, M. et al. Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 127, n. 6, p. 1356–62, 1 set. 2010b.

XING, F.; SAIDOU, J.; WATABE, K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 15, n. 2, p. 166–179, 2010.

YAMAGUCHI, H. et al. Stromal Fibroblasts Mediate Extracellular Matrix Remodeling and Invasion of Scirrhus Gastric Carcinoma Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85485, 2014.

YAMAGUCHI, H.; SAKAI, R. Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion. **Cancers**, v. 7, n. 4, p. 2054–2062, 2015.

ZEISBERG, E. M. et al. Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts. **Cancer Research**, v. 67, n. 21, p. 10123–10128, 2007.

ZHANG, J. et al. FSP1+ fibroblasts promote skin carcinogenesis by maintaining MCP-1-mediated macrophage infiltration and chronic inflammation. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 1, p. 382–90, 2011.

ZHANG, J. et al. Fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells prevent carcinoma through collagen production and encapsulation of carcinogens. **Cancer Research**, v. 73, n. 9, p. 2770–2781, 2013.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA



PROJETO DE PESQUISA

Título: Transição epitélio-mesenquimal na carcinogênese de boca: estudo de biomarcadores

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 00645412.8.0000.5024

Pesquisador: Flávia Caló de Aquino Xavier

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 102.359

Data da Relatoria: 08/08/2012

Apresentação do Projeto:

A pesquisa está estruturada em duas etapas, sendo a primeira constituída de caracterização histopatológica dos casos de displasia epitelial e carcinoma epidermóide e a segunda etapa correspondente ao estudo de moléculas reguladoras do fenômeno de EMT a partir da expressão de proteínas E-caderina, N-caderina, Fibronectina, Colágeno IV, MMP-25 e Cav-2 em tecidos humanos considerando as diferentes etapas da carcinogênese

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo pretende analisar a imunexpressão de proteínas E-caderina, N-caderina, Fibronectina, Colágeno IV, MMP-25 e Cav-2, por estarem diretamente envolvidas no processo de EMT, em casos de carcinomas epidermóides de boca com diferentes graus histológicos de malignidade, e em casos de displasias epiteliais de alto e baixo risco de transformação maligna em comparação com o tecido morfologicamente sadio, fornecendo melhores perspectivas na compreensão da carcinogênese de boca.

Objetivo Secundário:

a) Avaliar a expressão das proteínas E-caderina, N-caderina, Fibronectina, Colágeno IV, MMP-25 e Cav-2 por imuno-histoquímica em displasias epiteliais de acordo com o sistema binário de graduação estabelecidos por Kujan et al.. (2006); b) Avaliar a expressão das proteínas E-caderina, N-caderina, Fibronectina, Colágeno IV, MMP-25 e Cav-2 por imuno-histoquímica em carcinoma epidermóide de boca de

diferentes graus histológicos de malignidade, segundo os critérios da OMS (2005); c) Verificar se existe associação das proteínas E-caderina, N-caderina, Fibronectina, Colágeno IV, MMP-25 e Cav-2 nos diferentes estágios da carcinogênese comparando com tecido sadio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A casuística não ser alcançada devido a critérios de exclusão. Problemas de padronização dos anticorpos primários.

Benefícios:

Utilização de marcadores biológicos confiáveis nas diferentes etapas a carcinogênese.

Endereço: Av. Araújo Pinho nº 62 - Sala dos Departamentos
 Bairro: Canela CEP: 40.110-150
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8969 Fax: (71)3283-8962 E-mail: rosana.regner@ufba.br