



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**FARAH ESSGUÍ ORELLANA MARTÍNEZ**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS E ALTERAÇÕES DOS  
COMPONENTES ESTRUTURAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR COM  
PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS DE QUEILITE ACTÍNICA E  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO**

**FORTALEZA**

**2021**

FARAH ESSGUÍ ORELLANA MARTÍNEZ

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS E ALTERAÇÕES DOS  
COMPONENTES ESTRUTURAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR COM  
PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS DE QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA  
DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO

Dissertação apresentada à Coordenação do  
Programa de Pós-graduação em  
Odontologia da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial para obtenção  
do título de Mestre em Odontologia. Área  
de concentração: Clínica Odontológica,  
Área temática: Estomatopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Rogério Lima  
Mota

Coorientadora: Dra. Thâmara Manoela  
Marinho Bezerra

**FORTALEZA**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- M337a Martínez, Farah Essguí Orellana.  
Avaliação da associação de miofibroblastos e alterações dos componentes estruturais da matriz extracelular com parâmetros clinicopatológicos de queilite actínica e carcinoma de células escamosas de lábio / Farah Essguí Orellana Martínez. – 2021.  
81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota  
Coorientação: Profa. Dra. Thâmara Manoela Marinho Bezerra.

1. Neoplasias bucais . 2. Lábio. 3. Fibroblastos. 4. Carcinoma de células escamosas. 5. Microambiente tumoral. I. Título.

---

CDD 617.6

FARAH ESSGUÍ ORELLANA MARTÍNEZ

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS E ALTERAÇÕES DOS  
COMPONENTES ESTRUTURAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR COM  
PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS DE QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA  
DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO

Dissertação apresentada à Coordenação do  
Programa de Pós-graduação em Odontologia  
da Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre em Odontologia. Área de  
concentração: Clínica Odontológica, Área  
temática: Estomatopatologia.

Aprovada em:    /    /    .

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Mário Rogerio Lima Mota (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Filipe Nobre Chaves  
Universidade Federal do Ceará – (Sobral- UFC)

---

Prof. Dr. Antonio Ernando Carlos Ferreira Junior  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

DEDICATORIA.....

A DIOS...

A MIS QUERIDOS ABUELOS

## AGRADECIMENTOS

A Dios, señor tú que conoces los deseos de mi corazón me guiaste para llegar hasta donde estoy el día de hoy.

A mis padres **Iris Martínez** y **Armando Orellana** por ser la mayor fuente de inspiración en mi vida, además del modelo de profesor y profesional al que aspiro llegar a ser algún día. A mi querida hermana **Grecia Orellana** por impulsarme a ver todo con alegría y disfrutar cada momento. A mis hermanos, familiares y amigos por confiar en mis capacidades incluso cuando para mí fue difícil creer en ellas.

A **Obed Martínez**, creo que Dios te colocó en mi camino desde el comienzo de mi formación profesional como un apoyo en mis momentos de debilidad y un compañero para compartir mis alegrías, me siento muy feliz de que pudieras ser parte e impulsarme para alcanzar mis metas. Ver tu crecimiento personal y profesional a lo largo de los años ha sido una inspiración para mí, gracias por estar a mi lado, Amor.

Ao meu orientador Prof. **Mário Lima Mota**, o senhor é exemplo de inteligência humildade e profissionalismo, sou imensamente grata por todos os ensinamentos transmitidos e pela oportunidade de aprender ao seu lado. Obrigada por toda a confiança em mim depositada.

A minha querida coorientadora Dra. **Thâmara Marinho** você foi realmente um anjo que Deus colocou no meu caminho nesta jornada, obrigada pela paciência ao se sentar com comigo inúmeras vezes frente ao microscópio (o nosso cantinho) e me mostrar coisas que nunca acreditei que poderia chegar a compreender, por compartilhar todos teus conhecimentos que foram além dos científicos, sinto uma enorme admiração por sua qualidade humana e profissional.

Ao Prof. **Paulo Goberlânio de Barros Silva** obrigada por estar sempre disponível para ajudar com enorme sorriso e por fazer possível a realização de esta pesquisa, por sua atenção e contribuição para execução e das análises. Seu apoio foi fundamental.

Os Prof.<sup>a</sup> **Karuza Alves**, Prof.<sup>a</sup> **Ana Paula Negreiros** e Prof. **Fabricio Bitu** sou muito grata por tudo o conhecimento transmitido com tanto amor. Meu profundo respeito e admiração pelos senhores.

A mis queridos amigos **Elena** y **Octavio** su amistad es uno de los más grandes regalos que me deja la maestría, gracias por cada momento compartido.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de patologia oral **Priscila (Pri), Ronildo, Guilherme, Cassia, Dayrine, Sthefane, Thais, Lucas, Alceu** pelas alegrias e experiências compartilhadas. Em especial ao **Luis, Sussan, Yamyle, Liova** e amigos estrangeiros bolsistas da OEA que teve a oportunidade de conhecer.

Aos professores que formaram parte das bancas de qualificação, pré defesa e defesa deste trabalho, prof. **Mário Rogério Lima Mota**, prof. **Paulo Goberlânio de Barros Silva**, Dra. **Thâmara Manoela Marinho Bezerra** prof. **Filipe Nobre Chaves** e prof. **Antonio Ernando Carlos Ferreira Junior**. Obrigada pelas contribuições para o enriquecimento deste estudo.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (PPGO-UFC)**, coordenadora profa. **Cristiane Sá Roriz Fonteles**, vice-coordenador prof. **Vicente de Paulo Aragão Saboia** e funcionários, ao Laboratório de Patologia Bucal (UFC), pela vivência e ensinamentos durante o mestrado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e Grupo Coimbra pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

A queilite actínica (QA) é uma desordem potencialmente maligna do lábio, que tem como principal fator etiológico a exposição crônica à radiação solar ultravioleta (UV). A radiação UV é capaz de ocasionar alterações genéticas e da matriz extracelular (MEC) que podem contribuir ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas do lábio (CCEL). Nos últimos anos, o estudo das células que compõem o microambiente tumoral (MT) aumentou consideravelmente, em especial os miofibroblastos (MFs). Estudos mostram que MFs estão envolvidos na proliferação e invasão de células malignas, porém ainda não é claro como as alterações causadas pela radiação UV interferem no seu comportamento e no processo de carcinogênese labial. Dessa forma, constitui o objetivo desta pesquisa avaliar a participação dos MFs na carcinogênese labial, através da correlação de parâmetros clínicos, histológicos, histomorfométricos e imunoistoquímicos, em QAs e CCELS. Para isso, foram selecionados 30 casos de QAs, 30 CCELS do *front* tumoral e 15 lábios saudáveis (LSs) os quais foram preparados por *Tissue Micro Array* (TMA), dispostos em um único bloco para reações imunoistoquímicas (TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -AML e Ki-67) e histoquímicas (Hematoxilina e Eosina, Picrosirius Red e Verhoeff Van Gienson). Coleta de dados clínicos e gradação histopatológica das displasias epiteliais em QAs foram realizadas através do sistema binário e pelo sistema estabelecido por Bryne para CCELS. As áreas de elastose solar das QAs foram analisadas histomorfometricamente (grau, extensão, profundidade e distância para o epitélio displásico). Os *fronts* dos CCELS foram analisados na busca de invasão perineural e angiolímfática. Os dados foram expressos em forma de média e desvio-padrão, submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov, comparados pelos testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis/Dunn e Spearman (SPSS,  $p < 0,05$ ). As análises das QAs apresentaram maior número de células  $\alpha$ -AML+ em relação a amostras de LSs ( $p = 0,034$ ), e estas células (localizados nas áreas sem elastose) foram associadas com a expansão vertical da própria elastose ( $p = 0,027$ ). Adicionalmente, verificou-se que as áreas de elastose solar apresentaram menor deposição de colágeno ( $p < 0,001$ ) e imunomarcagem para TGF- $\beta$  ( $p < 0,001$ ) e maior densidade de fibras elásticas ( $p < 0,05$ ), quando comparadas com as áreas sem elastose. Em QAs, observou-se uma correlação positiva entre displasias de alto risco a proximidade da elastose solar ao epitélio displásico ( $p = 0,027$ ). As análises dos CCELS apresentaram maior número de células  $\alpha$ -AML+ em relação a amostras de LSs ( $p = 0,034$ ), além da redução da deposição de colágeno total ( $p = 0,009$ ) e colágeno tipo I ( $p < 0,001$ ) em relação as QAs e LSs. Verificou-se, ainda, uma correlação negativa entre a quantidade de células  $\alpha$ -AML+ e a

deposição de colágeno total ( $p=0.041$ ) e colágeno tipo III ( $p=0.041$ ). Observou-se, ainda, que a perda colagênica e de densidade elástica foi significativamente maior em tumores de maior tamanho ( $p=0.045$ ) e com metástase nodal ( $p=0.047$ ). Este estudo evidenciou o possível papel dos MFs, das fibras colágenas e das áreas de elastose no processo de carcinogênese de lábio.

**Palavras-chave (DeCS):** Neoplasias bucais; Lábio; Fibroblastos; Carcinoma de células escamosas; Microambiente tumoral.

## ABSTRACT

Actinic cheilitis (AC) is a potentially malignant disorder of the lip, whose main etiological factor is chronic exposure to ultraviolet (UV) solar radiation. UV radiation can cause genetic and extracellular matrix (ECM) changes that can contribute to the development of lip squamous cell carcinoma (LSCC). In recent years, the study of the cells that make up the tumor microenvironment (TME) has increased considerably, especially myofibroblasts (MFs), due to their role in carcinogenesis. Studies show that MFs are involved in the proliferation and invasion of malignant cells, but it is not yet clear how the changes caused by UV radiation interfere with the behavior of MFs in the process of lip carcinogenesis. Thus, the objective of this research is to evaluate the participation of MFs in lip carcinogenesis, through the correlation of clinical, histological, histomorphometric and immunohistochemical parameters, in ACs and. For this, were used 30 cases of ACs, 31 from the tumor front of LSCC and 14 healthy lips (HLs) that were arranged in blocks and prepared by tissue microarray (TMA) for immunohistochemical reactions (TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA and Ki-67) and histochemicals (Hematoxylin and Eosin, Picrosirius Red and Verhoeff Van Gienson). Collection of clinical data and histopathological grading of epithelial dysplasias in ACs were performed using the binary system and the system established by Bryne for LSCC. The areas of solar elastosis in the ACs were analyzed histomorphometrically (degree, extension, depth, and distance to the dysplastic epithelium). The fronts of the LSCCs were analyzed in search of perineural and angiolymphatic invasion. The data were expressed as means and standard deviations, submitted to the Kolmogorov-Smirnov test, compared by the Mann-Whitney, Kruskal-Wallis / Dunn tests, and finally correlated in their clinical, histological, immunohistochemical and histomorphometric data by the Spearman test. (SPSS,  $p < 0.05$ ). The analyzes of the ACs showed a greater number of  $\alpha$ -SMA + cells in relation to samples of HLs ( $p = 0.034$ ), and these cells (located in the areas without elastosis) were associated with the vertical expansion of the elastosis itself ( $p = 0.027$ ). Additionally, it was found that the areas of solar elastosis showed less collagen deposition ( $p < 0.001$ ) and immunostaining for TGF- $\beta$  ( $p < 0.001$ ), and higher density of elastic fibers ( $p < 0.05$ ), compared with areas without elastosis. Still in ACs, there was a positive correlation between high-risk dysplasias and the proximity of solar elastosis to the dysplastic epithelium ( $p = 0.027$ ). The analysis of the LSCCs showed a higher number of  $\alpha$ -SMA + cells in relation to samples of HLs ( $p = 0.034$ ), in addition to the reduction in the deposition of total collagen ( $p$

= 0.009) and type I collagen ( $p < 0.001$ ) in relation to the ACs and HLs. There was also a negative correlation between the amount of  $\alpha$ -SMA + cells and the deposition of total collagen ( $p = 0.041$ ) and type III collagen ( $p = 0.041$ ). We also observed that the collagen loss and elastic density was significantly greater in tumors of larger size ( $p = 0.045$ ) and with nodal metastasis ( $p = 0.047$ ). Our findings provide evidence of the possible role of myofibroblasts, collagen fibers and areas of elastosis in the process of lip carcinogenesis.

**Keywords (MeSH):** Mouth Neoplasms; Lip; Fibroblast; Squamous Cell Carcinoma; Tumor microenvironment.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Corte transversal do lábio. A porção mucosa labial rica em glândulas salivares menores. A porção cutânea é uma extensão da epiderme facial caracterizada pela presença de folículos e estruturas sebáceas.....	16
<b>Figura 2</b> Aspectos histopatológicos de QAs.....	17
<b>Figura 3</b> Marcadores do câncer regulados pelos CAFs. ....	24
<b>Figura 4</b> Sinalização cruzada entre célula cancerígena e CAF no microambiente tumoral ...	25
<b>Figura 5</b> Análise histomorfométrica e histomorfológica da elastose solar em QAs.....	45
<b>Figura 6</b> Perfil Histoquímico e Imunoistoquímica em LSs, QAs e CCEs. ....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Critérios arquiteturais e citológicos para o diagnóstico de displasias epiteliais, de acordo com a OMS.....	18
<b>Tabela 2</b> Sistema binário de risco de transformação malignas das displasias epiteliais.....	19
<b>Tabela 3</b> Sistema de gradação de malignidade “Modo de invasão” recomendado por Bryne (1998).....	21
<b>Tabela 4</b> Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo. ....	46
<b>Tabela 5</b> Perfil de imunexpressão para Ki-67, $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ bem como da porcentagem de fibras colágenas e densidade de fibras elásticas em LSs, QAs e CCELS.....	65
<b>Tabela 6</b> Influência de características clinicopatológicas de CCELS na imunexpressão de Ki-67, $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ bem como na porcentagem de fibras colágenas e densidade de fibras elásticas em áreas de <i>front</i> tumoral.....	66
<b>Tabela 7</b> Influência de características clinicopatológicas de QAs na imunexpressão de Ki-67, $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ bem como na porcentagem de fibras colágenas e densidade de fibras elásticas em áreas com e sem elastose solar.....	67
<b>Tabela 8</b> Associação entre aspectos histomorfológicos e histomorfométricos nas áreas de elastose solar em QAs em relação a gradação histopatológica de displasias epiteliais de lábio. ....	68
<b>Tabela 9</b> Correlação entre Correlação entre Ki-67, $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ , fibras colágenas e elásticas nas amostras de CCELS. ....	69
<b>Tabela 10</b> Correlação entre Ki-67, $\alpha$ -AML, TGF- $\beta$ , fibras colágenas e elásticas nas amostras de QAs.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAFs	Do inglês <i>Cancer associated Fibroblast</i>
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCEL	Carcinoma de Células Escamosas de Lábio
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CL	Carcinoma de Lábio
CP	Câncer de Pele
DAB	3,3'-diaminobenzidina-tetracloro
DDR2	Receptor 2 de domínio de discoidina
DE	Displasia Epitelial
DEL	Displasia Epitelial de lábio
EBP	Do inglês <i>Elastin Binding Proteins</i>
FAP	Proteína de ativação de fibroblastos
FCDP	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
FCE	Fator de Crescimento Epitelial
FGF	Fator de Crescimento de fibroblastos
H&E	Hematoxilina Eosina
ICC	Instituto de Câncer do Ceará
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Ki-67	Do inglês <i>Marker of Proliferation</i>
LS	Lábio Sadio

MEC	Matrix Extracelular
MF	Miofibroblastos
MMPS	Metaloproteinases
MT	Microambiente Tumoral
NF- $\kappa$ B	Fator ativador Nuclear kappa B
NG2	Antígeno neurônio-glial-2
OMS	Organização Mundial da Saude
PAF	Proteína específica de fibroblastos
PBS	Do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> (solução tampão de fosfato)
PDPN	Podoplanina
pH	Potencial de Hidrogênio
PIC	Picrosirus Red
POSTN	Periostina
QA	Queilite Actínia
SGHM	Sistema de Graduação Histológica de Malignidade
TGF- $\beta$	Do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TMA	Do inglês <i>Tissue Microarrays</i>
TNC	Tenascina-C
TNM	Sistema de Classificação de Tumores Malignos
UV	Radiação Ultravioleta
UVA	Radiação Ultravioleta tipo A
UVB	Radiação Ultravioleta tipo B
VER	Versican

VVG Verhoeff Van Gieson

$\alpha$ -AML Do inglês *Alpha Smooth Muscle Actin*

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
№	Sinal de número
%	Porcentagem
©	Copyright
$\mu\text{m}$	Micrometro
®	Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>1.1 Queilite Actínica</b> .....	15
<b>1.2 Carcinoma de células escamosas de lábio</b> .....	19
<b>1.3 Microambiente tumoral e Matriz extracelular</b> .....	22
<b>1.4 Miofibroblastos ou Fibroblastos Associados ao Câncer</b> .....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3. REFERENCIAS (INTRODUÇÃO GERAL)</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>4.1 Objetivo geral</b> .....	37
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	37
<b>5. HIPÓTESES DE TRABALHO</b> .....	38
<b>6. CAPÍTULO</b> .....	39
<b>6.1 Capítulo 1</b> .....	39
<b>7. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	64
<b>ANEXO A – CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	75
<b>ANEXO B – DECLARAÇÃO DE CORREÇÃO GRAMATICAL</b> .....	78

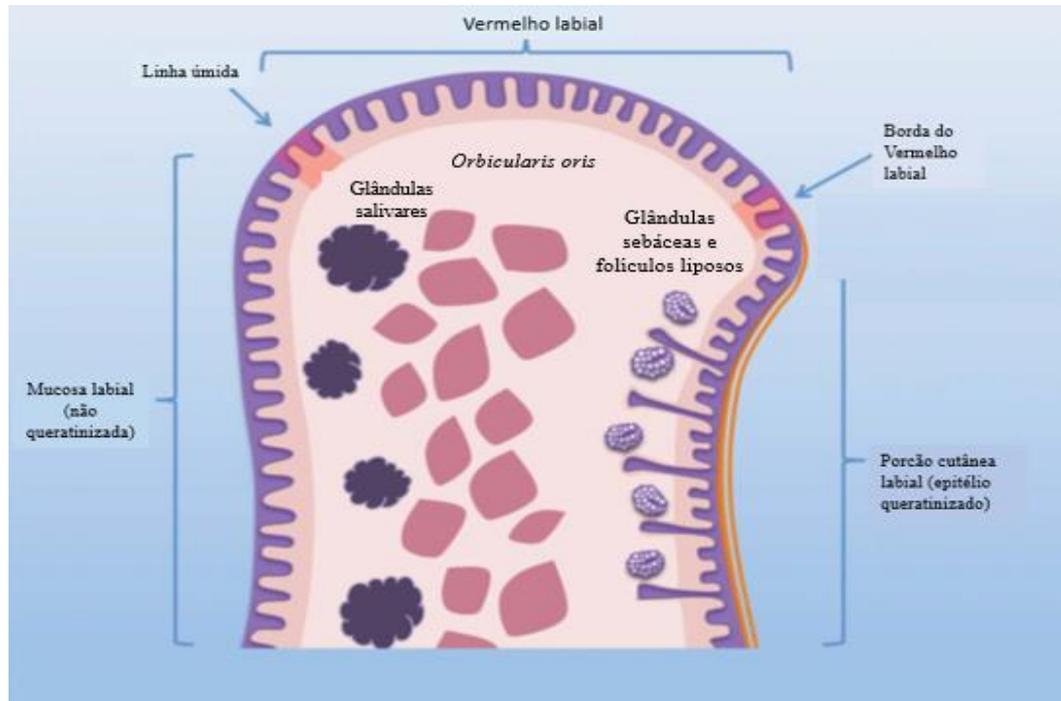
## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1 Queilite Actínica**

A queilite actínica (QA), também denominada de queilose solar, é um termo de origem grega (chei-los), que significa inflamação dos lábios (ARAÚJO et al., 2012a). Trata-se de uma desordem potencialmente maligna e inflamatória, resultante da exposição crônica e prolongada aos raios solares (ARAÚJO et al., 2012b; ARNAUD et al., 2014). A radiação solar ultravioleta é subdividida em três tipos de acordo com o comprimento de onda: a UVC (280 e 100nm) é absorvida pela camada de ozônio, no entanto, tanto a UVA (400 e 320nm) quanto a UVB (320 e 280nm) penetram na atmosfera e, apesar de serem essenciais para a conservação da vida (GALLAGHER; LEE, 2006), são igualmente fatores de risco para o desenvolvimento de doenças, como o câncer de pele (CP) e o carcinoma de lábio (CL) (ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010).

A QA acomete, principalmente, pessoas idosas do sexo masculino e de pele clara, que exercem ocupações profissionais que requerem exposição solar crônica e excessiva (EE SOUZA LUCENA et al., 2012; GONZAGA et al., 2020). O lábio inferior costuma ser mais acometido pela QA do que o superior, devido à sua posição anatômica na face favorecer maior recebimento de radiação UV (CHOQUET et al., 2020). Diferentemente da pele, os lábios são mais susceptíveis aos danos ocasionados pela radiação UV, pois, por estarem localizados em uma área de transição entre a mucosa oral e a pele, possuem epitélio mais delgado, levemente queratinizado, tecido conjuntivo subjacente ricamente capilarizado, menos glândulas sebáceas, melanina e ausência de glândulas sudoríparas (Figura 1) (ABREU et al., 2006; VIEIRA et al., 2012; BOTA; LYONS; CARROLL, 2017).

**Figura 1** Corte transversal do lábio. A porção mucosa labial rica em glândulas salivares menores. A porção cutânea é uma extensão da epiderme facial caracterizada pela presença de folículos e estruturas sebáceas.



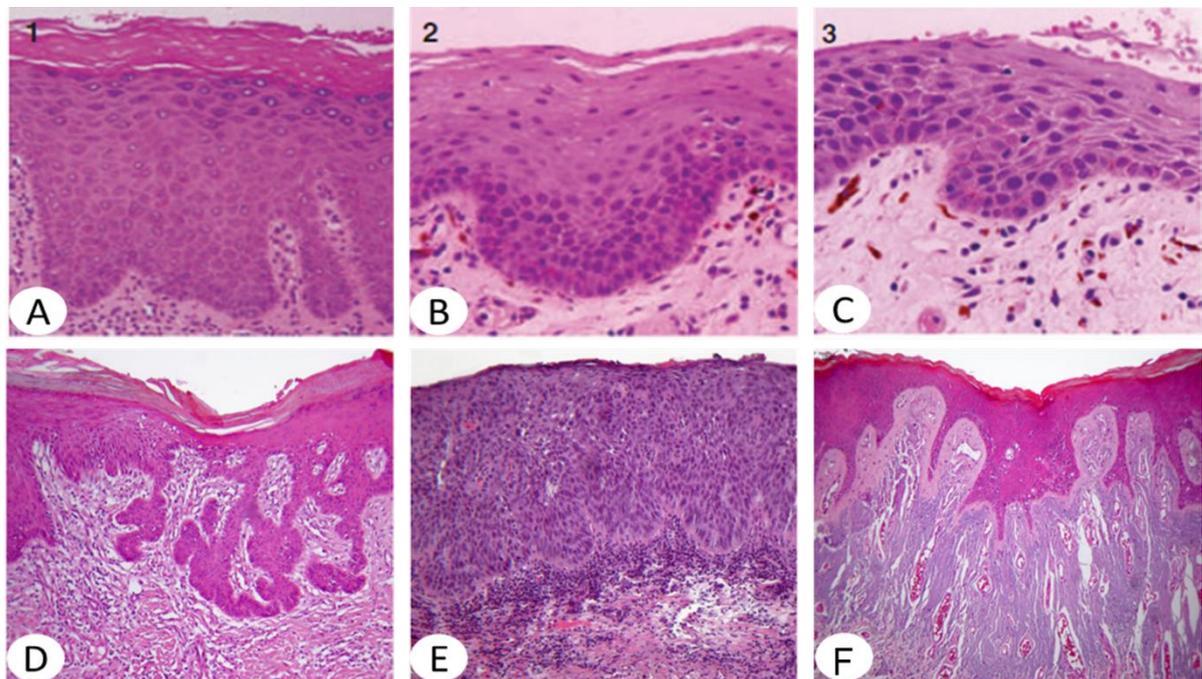
Fonte: Adaptado de BOTA et al. (2017).

Clinicamente, a QA pode se apresentar isoladamente e na forma multifocal e como um processo agudo e crônico. A forma aguda é menos comum e costuma acontecer no verão quando indivíduos, especialmente jovens, expõem-se intensamente ao sol. Seus aspectos clínicos são de úlceras, bolhas e crostas no vermelhão do lábio inferior, desaparecendo quando o agente etiológico é interrompido (EE SOUZA LUCENA et al., 2012). A forma crônica surge por causa da exposição solar de forma contínua, independente da estação do ano (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012). Ela é, geralmente, assintomática e caracterizada por exibir clinicamente apagamento da margem entre vermelhão do lábio inferior e porção cutânea labial (ABREU et al., 2006), bem como perda de elasticidade do tecido e ressecamento. Os indícios de danos teciduais profundos podem se mostrar clinicamente através do surgimento de áreas eritematosas irregulares, variando de finas a espessas, regiões ásperas e descamativas, além de úlceras e fissuras (CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012).

Histologicamente, o epitélio da QA possui aspectos que variam desde hiperqueratose, variados graus de displasia até carcinoma *in situ*. A hiperplasia, a acantose e a atrofia também são alterações epiteliais frequentemente presentes (DANCYGER et al., 2018). A lâmina própria das QAs mostra vasos sanguíneos, muitas vezes, dilatados e proeminentes, além de infiltrado inflamatório de intensidade variada e elastose solar no tecido conjuntivo (PILATI et al., 2017; DANCYGER et al., 2018) (Figura 2).

**Figura 2** Aspectos histopatológicos de QAs.

A: Hiperqueratose e hiperplasia epitelial. B: Hiperplasia da camada basal sem alterações citológicas e arquiteturais (ausência de DE). C: DE leve (alterações citológicas e arquiteturais no estrato epitelial restritos ao terço inferior). D: DE moderada (alterações citológicas e arquiteturais no estrato epitelial restritos ao terço médio). E: DE severa (alterações citológicas e arquiteturais no estrato epitelial restritos ao terço superior). F: Elastose solar proeminentemente no tecido conjuntivo.



Fonte: A, B e C: Adaptado de Warnakulasuriya et al. (2008). D, E, F: Adaptado de Pilati et al. (2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2005, estabeleceu critérios morfológicos para a interpretação histopatológica das displasias epiteliais (DEs) (Tabela 1). O epitélio de revestimento foi dividido em terços e a classificação das displasias foi estabelecida como leve, moderada e severa de acordo com o comprometimento celular e arquitetural dos terços epiteliais (BARNES et al., 2005). A severidade das displasias está correlacionada com a progressão para a malignidade (WARNAKULASURIYA et al., 2008).

**Tabela 1** Critérios arquiteturais e citológicos para o diagnóstico de displasias epiteliais, de acordo com a OMS.

Alterações arquiteturais	Alterações celulares
Estratificação epitelial irregular	Anisonucleose
Hiperplasia da camada basal	Pleomorfismo nuclear
Projeções epiteliais em gota	Anisocitose
Número aumentado de figuras de mitose	Pleomorfismo celular
Mitose superficiais	Aumento da proporção núcleo citoplasma
Disceratose individuais	Mitoses atípicas
Pérolas de queratina	Hipercromatismo nuclear
Aumento de número e tamanho dos nucléolos	

Fonte: Adaptado de BARNES et al. (2005).

Apesar da classificação da OMS ser adotada por várias pesquisas e na rotina histopatológica, existe variabilidade na interpretação das lâminas histológicas tanto interexaminador quanto intraexaminador, principalmente nas displasias moderadas (WARNAKULASURIYA et al., 2008). Subestimar uma displasia severa, classificando-a, por exemplo, como moderada, é algo preocupante, devido ao seu maior potencial de transformação maligna bem como a conduta clínica ser completamente diferente, sendo somente acompanhamento nos casos das DEs moderadas e cirurgia nas DEs severas. A redução de categorias na gradação das displasias é uma alternativa para atenuar as discordâncias no momento do diagnóstico. Por tanto, Kujan et al. (2006) propôs o sistema binário de gradação histológica, utilizando os mesmos parâmetros estabelecido pela OMS para simplificar e objetivar a gradação das DEs (Tabela 2).

**Tabela 2** Sistema binário de risco de transformação malignas das displasias epiteliais.

Risco de transformação maligna	Classificação das DEs segundo Barnes et al. (2005)
Baixo	DEs ausentes, questionáveis ou leve
Alto	DEs moderadas ou severas

Fonte: Adaptado de KUJAN et al. (2006).

A transformação maligna da QA é um processo lento, podendo ser necessário mais de vinte anos de exposição solar crônica. Em razão dessa evolução lenta e pelo fato de os primeiros sinais clínicos serem sutis, muitos pacientes associam a QA, em seu estágio inicial, com o processo de envelhecimento e negligenciam a lesão até que ela se transforme em carcinoma de células escamosas de lábio (CCEL) (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012). Dessa forma, entender os mecanismos envolvidos no processo de carcinogênese das QAs pode contribuir para a identificação de lesões com maior potencial de transformação maligna, uma vez que outros fatores poderiam ser agregados às características histopatológicas (atualmente padrão ouro), a fim de promover intervenção precoce e, conseqüentemente, tratamento mais eficaz e de mais baixo custo.

## 1.2 Carcinoma de células escamosas de lábio

Segundo a OMS, o câncer é a principal causa de morte no mundo. A maior incidência ocorre nos países desenvolvidos e os subtipos da doença possuem relação com a urbanização e com o desenvolvimento, como, por exemplo, câncer de pulmão, próstata, mama feminino, colón e reto (GLOBOCAN, 2021). A agência internacional de pesquisa em câncer da OMS estimou que, no ano 2020, ocorreriam 9,6 milhões de mortes por essa doença, sendo quase 70% delas nos países subdesenvolvidos (GLOBOCAN, 2021). Calcula-se que, no Brasil, ocorrerão 687 mil novos casos de câncer para o ano 2025, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente (177 mil). Para o câncer oral e de lábio, estima-se que a incidência será de 11.300 novos casos, sendo 8.270 deles em homens e 3.030 em mulheres (GLOBOCAN, 2021).

O subtipo mais comum de câncer oral é o carcinoma de células escamosas oral (CCEO), também chamado de carcinoma epidermoide ou carcinoma espinocelular (ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010). O comportamento clínico do CCEO é caracterizado por altas taxas de invasão local e metástase, possuindo, portanto, grande agressividade (RIVERA, 2015). O CCEO afeta, preferencialmente, homens de mais de 50 anos de idade (ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010). Os sítios de maior prevalência na cavidade oral variam conforme a localização geográfica, já que os fatores ambientais e culturais mudam entre as populações (ANTUNES et al., 2007). A língua é o principal sítio de acometimento, provavelmente, associado ao consumo de tabaco e álcool (CHOI et al., 2006). Na Ásia, a mucosa jugal é a localização mais comum devido ao hábito de mascar betel (IAMAROON et al., 2004). Em países tropicais, a população está bastante exposta à radiação solar, o que leva a uma alta incidência de CCEL inferior (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; BIASOLI et al., 2016).

Os CCELS representam 25% a 30% de todos os tumores da cavidade oral, sendo o lábio inferior 20 vezes mais acometido do que o superior (VIEIRA et al., 2012; BIANCO et al., 2015; LUPU et al., 2018). Aliados à exposição solar, fatores relacionados ao estilo de vida, sociodemográficos, imunossupressão e suscetibilidade genética podem produzir efeitos sinérgicos (PUKKALA et al., 2009). Clinicamente, apresentam-se sob as formas exofítica, úlcero-infiltrativa e verrucosa. Interessantemente, seu comportamento clínico é distinto dos cânceres na cavidade oral e na pele. Em relação à pele, o câncer de lábio tem maior probabilidade de desenvolver metástase, com taxas variando de 3% a 20%, todavia é de melhor prognóstico quando comparado ao câncer intraoral (ABREU et al., 2006).

Histopatologicamente, o CCEL é caracterizado pela proliferação de queratinócitos atípicos organizados em ilhas e cordões de tamanhos variados, que invadem o tecido conjuntivo. As células neoplásicas apresentam-se em formato poliédrico, volumosas, de limites precisos, com citoplasma amplo e claro, bem como núcleos redondos ou ovais centrais com cromatina frouxa. Individualmente, elas exibem importante pleomorfismo celular e nuclear, aumento do tamanho dos núcleos e das células, nucléolos numerosos e evidentes, alteração da relação núcleo-citoplasma, maior número de figuras de mitose que são, por vezes, atípicas (MARKOPOULOS; KAYAVIS, 2004). Na maioria das vezes, notam-se pérolas de queratina de tamanhos variados, evidenciando o grau de diferenciação celular. O estroma da lesão é composto por tecido conjuntivo denso com intenso infiltrado inflamatório, destacando-se a presença de degeneração basofílica das fibras colágenas (DE FREITAS et al., 2008).

Através dos anos, surgiram várias classificações histopatológicas dos CCEOs, como uma tentativa de dar explicação ou comportamento biológico de tumores com características clínicas similares. A OMS (2005) propôs um sistema de classificação dos CCEOs baseado no sistema de diferenciação celular sugerido por Broders (1920), que os classifica em 3 categorias: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados. Sendo denominados como bem diferenciados aqueles cujas características arquiteturais fossem semelhantes ao padrão normal de epitélio escamoso. Os CCEOs moderadamente diferenciados são os que apresentam atividade mitótica, certo grau de pleomorfismo nuclear e mínima ceratinização. Já aqueles que apresentam predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização, são classificados como pobremente diferenciados (ABREU et al., 2006). Apesar de essa classificação ser recomendada pela OMS e ser amplamente utilizada na rotina patológica, alguns autores questionam o destaque de outras características histológicas que desempenham um papel importante no comportamento dos CCEOs (LOURENÇO et al., 2017).

A fim de caracterizar o tumor, prever o prognóstico e propor a terapia mais adequada para cada caso, é usado o sistema de estadiamento clínico de tumores (TNM). Através desse sistema, dados acerca do tamanho, presença de metástase à distância e linfonodal são interpretados em conjunto para atribuir o estadiamento clínico ao câncer (NEVILLE, 2009; STRIEDER et al., 2017). Aliados ao TNM, o uso de sistemas de gradação histológica de malignidade (SGHM) vêm sendo amplamente usados para melhor prever o prognóstico (STRIEDER et al., 2017). Um dos sistemas de gradação mais utilizado é o de BRYNE (1998), o qual é específico para a frente invasiva de CCEO e baseado em uma série de parâmetros histopatológicos (grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário) que, quando somados, estimam o grau de malignidade do tumor (Tabela 3).

**Tabela 3** Sistema de gradação de malignidade “Modo de invasão” recomendado por Bryne (1998).

ESCORES DE MALIGNIDADE				
	1	2	3	4
Grau de ceratinização	Altamente ceratinizado (+ de 50% das células)	Moderadamente ceratinizado (de 20 a 50% das células)	Mínima ceratinização (de 5 a 20% das células)	Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco pleomorfismo (+ de 75% de células maduras)	Moderado pleomorfismo (50-)	Pleomorfismo intenso (25-50% de células maduras)	Pleomorfismo extremo (0-25% de células maduras)

75% de células maduras)				
Padrão de invasão	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)	Dissociação celular difusa e pronunciada em pequenos grupos e/ou células individuais (n<15)
Infiltrado inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Fonte: Adaptado de Bryne (1998).

Geralmente, a abordagem cirúrgica é a primeira escolha para tratamento de CCELS no seu estágio inicial (DOUGHERTY; GIVI; JAMESON, 2017). No entanto, a ressecção cirúrgica do lábio não implica só a remoção do tumor com uma margem de segurança, mas também precisa garantir uma reconstrução adequada das estruturas anatómicas adjacentes (ROSSOE et al., 2011). Uma outra opção, no tratamento de CCELS, é a radioterapia, porém, quando aplicada nos estágios iniciais, apresenta desvantagens, como tempos prolongados de tratamento, limitação de futuras reconstruções estéticas no campo irradiado e a abertura bucal limitada (trismo) (MARTINS et al., 2020). Para casos de CCELS maiores de 4 cm, recomenda-se o uso de terapia combinada de cirurgia e radioterapia e, em alguns casos, quimioterapia (DOUGHERTY; GIVI; JAMESON, 2017). Embora a gradação histopatológica dos CCELS seja essencial para prever o comportamento dessas lesões, o estudo dos mecanismos envolvidos na progressão tumoral, como o MT, é necessário para aportar conhecimento para a prevenção e o tratamento oportuno de ditas lesões.

### 1.3 Microambiente tumoral e Matriz extracelular

Atualmente, o MT tem ganhado atenção da comunidade científica por estar associado à tumorigênese, angiogênese, promoção de um fenótipo similar ao de célula-tronco, remodelação da matriz extracelular (MEC), invasão tecidual, metástase e quimio-resistência (DOURADO et al., 2018; ZIANI; CHOUAIB; THIERY, 2018; CUSTÓDIO; BIDDLE; TAVASSOLI, 2020). A MEC constitui o principal componente do estroma tumoral, sendo um regulador chave para função celular e tecidual (FANG et al., 2014).

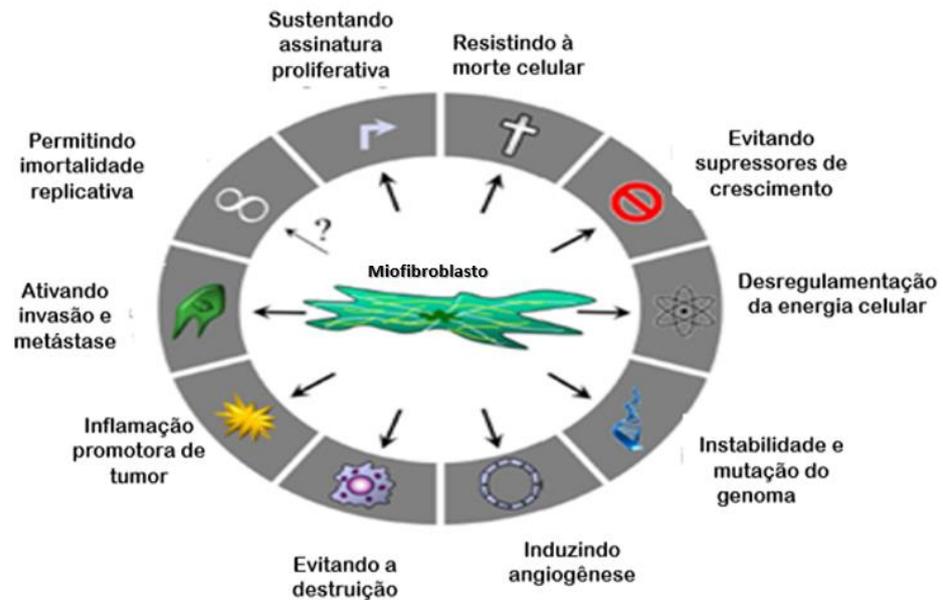
O colágeno é a principal proteína da MEC e tem sido tradicionalmente considerado como uma barreira passiva para as células tumorais, entretanto, no presente, sabe-se que está ativamente envolvido na progressão tumoral (NISSSEN; KARSDAL; WILLUMSEN, 2019). O

colágeno é o arcabouço do tumor como um todo e é afetado no seu microambiente por regular a remodelação da MEC (através de sua própria degradação e reposição) e por estar envolvido na angiogênese, bem como na invasão e, conseqüentemente, na migração das células malignas (FANG et al., 2014). Áreas de colágeno presentes nos cânceres de pele e lábio podem apresentar alterações microscópicas, chamadas de elastose solar ou degeneração basofílica do colágeno, devido ao alcance dos raios UVA e UVB na lâmina própria (BOTA; LYONS; CARROLL, 2017; SANTANA et al., 2020b). A radiação solar também afeta as proteínas da MEC, interferindo na integridade do genoma celular, assim como ocasionando perda da viabilidade celular e danos às membranas celulares (WONDRACK et al., 2003; PHILLIPS et al., 2007).

Os mecanismos envolvidos nas mudanças, que acontecem na MEC após a exposição solar crônica e contínua, são ainda desconhecidos (SGARBI et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012). Além disso, a exata composição do material elastótico, tal como sua patogênese, do mesmo modo, não foram completamente esclarecidos (SGARBI et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012). Não se sabe se o material elastótico é resultado de uma maior síntese de fibras elásticas ou da degradação do colágeno (SELLHEYER, 2003; JUST et al., 2007). Para Araújo et al. (2012), as áreas de elastose solar são formadas por fibras elásticas sintetizadas pelos fibrócitos alterados pela radiação UV. Outros estudos mostram que a elevada expressão de elastina pode ser mediada pelo aumento de TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta) (FANTASIA et al., 2013; LARROQUE-CARDOSO et al., 2014). Já outros autores defendem que o colágeno presente na região da elastose solar é degradado por ação de metaloproteinases de matriz (MMPs), que são expressas quando a radiação solar é absorvida pelos queratinócitos (BERNEBURG; PLETTENBERG; KRUTMANN, 2000) ou pela própria incidência dos raios solares no tecido conjuntivo (PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005). Dessa forma, há indícios de que a degradação das macromoléculas da MEC, bem como a elastose solar, estão relacionadas com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer (YANO et al., 2005). No entanto, pouco se sabe sobre a relação entre a elastose solar e as DEs de QAs e o CCELS.

A interação entre as células mesenquimais e a MEC também está alterada nos tumores, influenciando na proliferação e na invasão das células malignas. Os fibroblastos destacam-se entre as células que compõem a MEC, sendo os principais produtores de colágeno e elastina. Além disso, quando fazem parte do microambiente tumoral, são denominados de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e desempenham um papel controverso por favorecer a tumorigênese (DOURADO et al., 2018) (Figura 3).

**Figura 3** Marcadores do câncer regulados pelos CAFs.



Fonte: Adaptado de Tommelein et al. (2013).

#### 1.4 Miofibroblastos ou Fibroblastos Associados ao Câncer

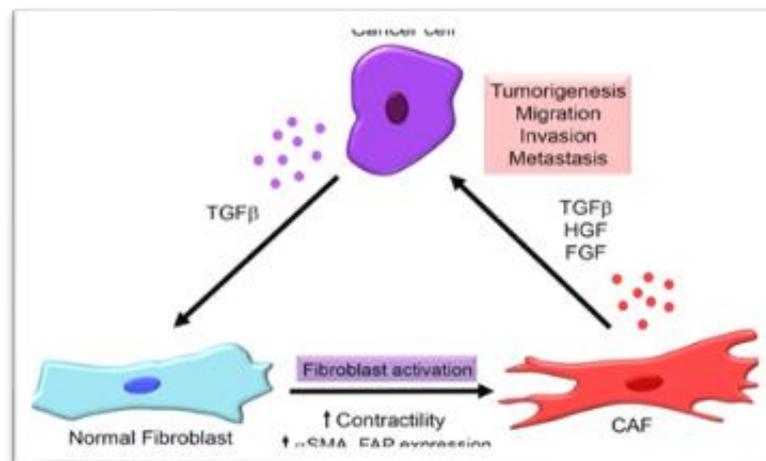
Os fibroblastos e os fibrócitos são as células mesenquimais mais abundantes no tecido conjuntivo e as produtoras principais da MEC, sendo normalmente considerados células quiescentes (SHI et al., 2020). Quando ativados, exibem atividade contrátil, exercem forças físicas para modificar a arquitetura dos tecidos, adquirem propriedades proliferativas e migratórias, assim como se tornam transcricionalmente ativos, levando à secreção de várias substâncias (citocinas, quimiocinas, proteases e fatores pro-angiogênicos) e de componentes da MEC (DOURADO et al., 2018). A habilidade de os fibroblastos se tornarem ativos foi primeiramente descrita no contexto da cicatrização e de doenças crônicas inflamatórias (DVORAK, 1986). No câncer, o acúmulo de células cancerígenas no interior do estroma representa uma injúria tecidual, imitando o processo de cicatrização, o qual ativa os fibroblastos e gera uma reação desmoplásica no estroma tumoral (OHTANI, 1998). Consequentemente, um MT rico em fibrose inclui CAFs, que representam uma das mais abundantes células presentes no estroma (DOURADO et al., 2018).

Os CAFs estão em maior número em cânceres orais mais agressivos, o que sugere seu envolvimento na metástase e na invasão (KELLERMANN et al., 2007). Os miofibroblastos também se mostram presentes em cânceres orais desmoplásicos e com características de

invasividade (KAWASHIRI; TANAKA; NOGUCHI, 2009). Além disso, uma maior quantidade de CAFs no *front* tumoral é significativamente correlacionada com pior prognóstico em CCEOs (LI et al., 2015; LUCKSIC et al., 2015). Em CL, existem poucas pesquisas sobre CAFs e sua relação com a agressividade tumoral. Estudo de Bianco et al. (2015) mostra quantidades significativas de CAFs em CLs e QAs, contudo, os autores não conseguiram demonstrar associações desses dados com características clínicas.

As células tumorais, principalmente aquelas localizadas no *front* tumoral (JENSEN et al., 2015), tal como o infiltrado inflamatório, são chaves determinantes no recrutamento, na ativação e proliferação de fibroblastos no MT (LI, Y et al., 2018). Isso acontece devido à secreção de fatores de crescimento por essas células, dentre eles, TGF- $\beta$ , fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP), fator de crescimento epidérmico (FCE) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (ZIANI; CHOUAIB; THIERY, 2018) (Figura 2). Além disso, a secreção de interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) por células do sistema imune também contribui para a ativação e a proliferação de fibroblastos, especialmente pela via do Fator Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (OHTANI, 1998).

**Figura 4** Sinalização cruzada entre célula cancerígena e CAF no microambiente tumoral.



Fonte: Adaptado de Erdogan; Webb (2017).

Os miofibroblastos são heterogêneos e não advêm somente de fibroblastos, mas sim de pericitos e das células musculares, epiteliais, endoteliais, hepáticas e mesenquimais. Dessa forma, os CAFs são considerados um fenótipo e não um tipo específico de célula (LI et al., 2015). Nesse sentido, a morfologia celular e a sua distribuição espacial são fatores

determinantes que auxiliam na sua identificação (KALLURI, 2016). Ademais, marcadores imunoistoquímicos, sobretudo alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -AML), têm sido frequentemente usados para identificar miofibroblastos diferenciados (SOBRAL et al., 2011; LI et al., 2015; KABIR et al., 2016; COLETTA; SALO, 2018). Outros marcadores incluem proteína-1 específica de fibroblastos (FSP-1; também chamada de S100A4), proteína de ativação de fibroblastos (FAP), antígeno neurônio-glião-2 (NG2), periostina (POSTN), podoplanina (PDPN), tenascina-C (TNC), desmina, CD90 / THY1, ou receptor 2 contendo domínio de discoidina (DDR2) (ZIANI; CHOUAIB; THIERY, 2018).

Apesar da ampla variedade de marcadores imunoistoquímicos, a diferenciação e a detecção dos CAFs continuam pobremente entendidos e não há marcadores específicos para caracterizar essas células (DOURADO et al., 2018). Além disso, muitos CAFs não expressam todos esses marcadores ao mesmo tempo, o que reflete o alto grau de heterogeneidade dessas células e possíveis funções opostas em contextos específicos do MT (THODE et al., 2011; ÖHLUND; ELYADA; TUVESON, 2014). Dessa forma, unir características ultraestruturas, positividade de imunomarcadores específicos e morfologia celular tem mostrado bons resultados na identificação dessas células (DAYAN et al., 2012; DOURADO et al., 2018).

O CCEL é uma entidade singular dentre os cânceres de cavidade oral e da região de cabeça e pescoço, pelo seu principal fator etiológico e pelas características histopatológicas únicas. Estudos mostraram um aumento na densidade de CAFs em QAs e CCEs, o que poderia estar associado com uma maior agressividade e pior prognóstico. No entanto, é desconhecida a relação entre a elastose solar e os CAFs na progressão de QA e CCEs. Devido à essa associação ainda controversa, faz com que seja o local mais estrategicamente apropriado para esse tipo de estudo.

## 2. JUSTIFICATIVA

De acordo com estudo epidemiológico brasileiro, o CCEL é responsável por mais de 10% de todos os cânceres que acometem a cavidade oral (EE SOUZA LUCENA et al., 2012). Desse modo, a detecção de alterações morfológicas e histopatológicas labiais características de QA poderia ser uma ferramenta para a prevenção do CCEL. A radiação solar UV é amplamente aceita como principal fator de risco para desenvolver CCEL e seu precursor QA. O lábio, pela sua localização anatômica e características, é mais suscetível do que a pele aos danos advindos da radiação solar (SANTANA et al., 2020a). Logo, surge a necessidade de entender melhor os mecanismos carcinogênicos associados à radiação UV no lábio.

Uma vez que a maioria das QAs possui achados de DEs na biópsia, a predição para a transformação maligna das DEs é avaliada por meio de análise histopatológica (método padrão ouro) aliada a sistemas de gradações de malignidade. No entanto, ainda existem lacunas nesse sistema de avaliação, não sendo possível prever com exatidão qual lesão de QA possui o maior potencial de transformação maligna. Isso acontece por serem obscuros os mecanismos envolvidos no processo de carcinogênese das lesões labiais. Aliar os achados histopatológicos e os sistemas de gradação juntamente com características histológicas inerentes a QAs e biomarcadores seria o ideal para que a predição de malignidade dessas lesões fosse mais fidedigna à realidade.

Estudos mostram que o aumento da densidade de CAFs no estroma de CCEOs está correlacionado com maior mortalidade (KELLERMANN et al., 2007; BELLO et al., 2011; MARSH et al., 2011). Até onde nós sabemos, apenas um estudo avaliou a influência de CAFs no processo de progressão das QAs para CCEls (BIANCO et al., 2015), porém sem conclusões significativas.

A elastose solar é o achado histopatológico mais característico dos tecidos expostos à radiação solar, como a pele e os lábios. Ela está presente no tecido conjuntivo superficial a médio e é composta pela deposição de material elastótico. Sua presença já foi relacionada com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer (YANO et al., 2005), no entanto, ainda é desconhecida sua relação com o processo de carcinogênese labial, tal como a associação dos CAFs com sua formação.

Com base no exposto, este estudo visa avaliar a presença e o papel dos miofibroblastos e do seu principal produto (fibras colágenas e elásticas) no processo de carcinogênese do lábio, assim como avaliar sua relação com a elastose solar em QAs e CCEs.

### 3. REFERENCIAS (INTRODUÇÃO GERAL)

ABREU, M. A. M. M. de et al. Queilite actínica adjacente ao carcinoma espinocelular do lábio como indicador de prognóstico. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 6, p. 767–771, 2006.

ANTUNES, A. et al. Câncer da língua: estudo retrospectivo de vinte anos. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço**, v. 36, n. 3, p. 152–154, 2007.

ARAÚJO, C. P. et al. Elastin Accumulation in Actinic Cheilitis with Different Degrees of Epithelial Dysplasia. **International Journal of Morphology**, v. 30, n. 2, p. 627–633, 2012.

ARAÚJO CP, VIDAL MTA, G. C. et al. Queilite actínica : um estudo de 35 casos com destaque para os aspectos morfológicos. **Rev Pós Grad**, v. 19, n. 1, p. 21–27, 2012.

ARNAUD, R. R. et al. Queilite actínica: avaliação histopatológica de 44 casos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, n. 6, p. 384–389, 2014.

BARNES, L. et al. World Health Organization Classification of Tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

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, p. 33-38, 2011.

BERNEBURG, M; PLETTENBERG, H; KRUTMANN, J. Photoaging of human skin. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 16, p. 239-44, 2000.

BIANCO, B. C. et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, myofibroblasts and Ki-67 in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, n. 5, p. 311–318, 2015.

BIASOLI, É. R. et al. Lip Cancer: A Clinicopathological Study and Treatment Outcomes in a 25-Year Experience. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 74, n. 7, p. 1360–1367, 2016.

BRASIL: Ministério da Saúde. Estimativa 2014, Incidência de câncer no Brasil. 1st ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2019.

BOTA, J. P.; LYONS, A. B.; CARROLL, B. T. **Squamous cell carcinoma of the lip - A review of squamous cell carcinogenesis of the mucosal and cutaneous junction**, v, 43, n. 4 p. 494-506, 2017.

BRYNE. M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication. **Oral Diseases**, n. 4 , p 70-77. 1998

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.

CAVALCANTE, A. S. R.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. Actinic Cheilitis: Clinical and Histological Features. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, n. 3, p. 498–503, 2008.

CHOI, K. K. et al. Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. **Oral Oncology**, v. 42, n. 2, p. 208–217, 2006.

CHOQUET, H. et al. Genetic and environmental factors underlying keratinocyte carcinoma risk. **JCI Insight**, v. 5, n. 10, p. 1-14, 2020.

COLETTA, R. D.; SALO, T. Myofibroblasts in oral potentially malignant disorders: Is it related to malignant transformation? **Oral Diseases**, v. 24, n. 1–2, p. 84–88, 2018.

CUSTÓDIO, M.; BIDDLE, A.; TAVASSOLI, M. Portrait of a CAF: The story of cancer-associated fibroblasts in head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 110, n. p. 104972, 2020.

DANCYGER, A. et al. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 9, n. 4, p. e12343, 2018.

DAYAN, D. et al. Molecular crosstalk between cancer cells and tumor microenvironment components suggests potential targets for new therapeutic approaches in mobile tongue cancer. **Cancer Medicine**, v. 1, n. 2, p. 128–140, 2012.

DE FREITAS, M. D. C. A. et al. P53 and MDM2 protein expression in actinic cheilitis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, n. 6, p. 414–419, 2008.

DOURADO, M. R. et al. Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 47, n. 5, p. 443–453, 2018.

DOUGHERTY, W; GIVI, B; JAMESON, MJ. AHNS Series – Do you know your guidelines? Lip cancer. **Head and Neck**, v. 39, n. 8, p. 1505–1509, 2017.

DRAGOMIR, L. P. et al. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 53, n. 1, p. 89–93, 2012.

DVORAK, H. F. Similarities between Tumour Stroma Generation and Wound Healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 16, p. 1650-1659, 1986.

EE SOUZA LUCENA, E. E. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Diseases**, v. 18, n. 6, p. 575–579, 2012.

ELMUSRATI, A. A. et al. Cancer-associated fibroblasts promote bone invasion in oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 6, p. 867–875, 2017.

FANG, M. et al. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. **Tumor Biology**, v. 35, n. 4, p. 2871–2882, 2014.

FANTASIA, J. et al. Differential levels of elastin fibers and TGF- $\beta$  signaling in the skin of Caucasians and African Americans. **J Dermatol Sci**, v. 70, n. 3, p. 159–65, 2013.

FREITAS, M. da C.A. de. Et al P53 and mdm2 protein expression in actinic cheilitis. **J Appl Oral Sci**. v. 16, n.6, p. 414-9, 2008.

GALLAGHER, R. P.; LEE, T. K. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 119-131, 2006.

GLOBAL OBSERVATORY OF CANCER. Cancer Tomorrow. **International Agency for Research on Cancer**, Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>, accessed, 27, 04, 2020.

GONZAGA, A. et al. Actinic cheilitis: Morphometric parameters and its relationship with the degree of epithelial dysplasia. **Acta Histochemica**. V. 122, n. 1, p. 1-4, 2020.

IAMAROON, A. et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 1, p. 84–88, 2004.

JADOTTE, Y. T.; SCHWARTZ, R. A. Solar cheilosis: An ominous precursor: Part I. Diagnostic insights. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 2, p. 173–184, 2012.

JENSEN, D.H. et al. Single cell migration in oral squamous cell carcinoma—possible evidence of epithelial-mesenchymal transition in vivo. **J Oral Pathol Med**, v. 44, p. 674–679, 2015.

JUST, M. et al. Effect of smoking on skin elastic fibres: Morphometric and immunohistochemical analysis. **British Journal of Dermatology**, v. 156, n. 1, p 85–91, 2007.

KABIR, T. D. et al. A miR-335/COX-2/PTEN axis regulates the secretory phenotype of senescent cancer-associated fibroblasts. **Ageing**, v. 8, n. 8, p. 1608–1635, 2016.

KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 9, p. 582–598, 2016.

KAWASHIRI, S. A. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Head and Neck**, v. 31, n. 10, 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.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, n. 10, p. 987–993, 2006.

LARROQUE-CARDOSO, P. et al. 4-Hydroxynonenal impairs transforming growth factor- $\beta$ 1-induced elastin synthesis via epidermal growth factor receptor activation in human and murine fibroblasts. **Free Radic Biol Med**, V.71, p. 427–436, 2014.

Li, H.; ZHANG, J.; CHEN, S.W. et al. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. **J Transl Med.** v. 13, p. 198–208, 2015.

LI, Y. yin; ZHOU, C. X.; GAO, Y. Interaction between oral squamous cell carcinoma cells and fibroblasts through TGF- $\beta$ 1 mediated by podoplanin. **Experimental Cell Research**, v. 369, n. 1, p. 43–53, 2018.

LUKSIC, I.; SUTON, P.; MANOJLOVIC, S. 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. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v. 44, p. 1075–1080. 2015.

LOURENÇO, S.D.Q.C. et al. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 325–333, 2007.

LUPU, M. et al. Non-invasive imaging of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. **Molecular and Clinical Oncology**, n. 8, p. 640–646, 2018.

MARKOPOULOS, A.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: Clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Diseases**, v. 10, n. 4, p. 212–216, 2004.

MARSH D. et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **J Pathol**, v, 223, p. 470-481, 2011.

MARTINS, et al. Trismus and oral health conditions during diagnosis of malignant oral neoplasms. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 86, n. 5, p. 552-557, 2020.

NEVILLE BW et al. Patologia epitelial. In: Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE, editors. Patologia oral e maxilofacial. 3 rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 363-453, 2009.

NISSEN, N. I.; KARSDAL, M.; WILLUMSEN, N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 2019.

ÖHLUND, D.; ELYADA, E.; TUVESON, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1503–1523, 2014.

OHTANI, H. Stromal reaction in cancer tissue: Pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. **Pathology International**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 1998.

OUHTIT, A. et al. Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 1, p. 201–207, 2000.

PHILIPS, N. et al. Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. **Archives Of Dermatological Research**, v. 299, n. 8, p. 373-379, 2007.

PILATI, S.F.M. et al. Histopathologic features in actinic cheilitis by the comparison of grading dysplasia systems. **Oral Diseases**, v.23, p. 219–224, 2017.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation: A review. **Int J Cosmetic Sci**, v. 27, p. 17-34, 2005.

PUKKALA, E. et al. Occupation and cancer follow-up of 15 million people in five Nordic countries, **Acta Oncologica**, v. 48, n. 5, p. 646-790, 2009.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer, **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 11884-11894, 2015.

ROJAS, I. G. et al. Increased fibroblast density in actinic cheilitis: Association with tryptase-positive mast cells, actinic elastosis and epithelial p53 and COX-2 expression. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 27–33, 2012.

ROSSOE, E. T. et al. Actinic cheilitis: aesthetic and functional comparative evaluation of vermilionectomy using the classic and W-plasty techniques. **An. bras. dermatol**, v. 86, n. 1, p. 65–73, 2011.

SALVADORI, G. et al. Ki-67, TGF- $\beta$ 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. **Tumor Biology**, v. 35, n. 8, p. 7635–7644, 2014.

SANTANA, T. et al. Can immunohistochemical biomarkers distinguish epithelial dysplasia degrees in actinic cheilitis? A systematic review and meta-analysis. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 25, n. 1, p. 106-116, 2020a.

SANTANA, T. et al. Histopathological features of photodamage and mast cell infiltrate in actinic cheilitis with different grades of epithelial dysplasia. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 47, n. 7, p. 592–600, 2020b.

SCULLY, C. Challenges in predicting which oral mucosal potentially malignant disease will progress to neoplasia. **Oral Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–5, 2014.

SELLHEYER, K. Pathogenesis of solar elastosis: Synthesis or degradation? **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 30, n. 2, p. 123–127, 2003.

SHI, X. et al. Transforming Growth Factor-  $\beta$  Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. **Biomolecules**, v. 3, p. 1–22, 2020.

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. 840–846, 2011.

STRIEDER, L. et al. Comparative analysis of three histologic grading methods for squamous cell carcinoma of the lip. **Oral Diseases**, v. 23, n. 1, p. 120–125, 2017.

THODE, C. et al. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 3, p. 201-207, 2011.

VIEIRA, R. A. M. A. R. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 87, n.1, p.105-14, 2012.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: Predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 127-133, 2008.

WONDRAK, G.T. et al. Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells. **J. Invest. Dermatol**, v. 121, n. 3, p. 578-86, 2003.

YANO, K. et al. Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and by downregulation of thrombospondin-1. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 1, p. 115–121, 2005.

ZIANI, L.; CHOUAIB, S.; THIERY, J. Alteration of the antitumor immune response by cancer-associated fibroblasts. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 414, p. 1-14, 2018.

ZINI, A.; CZERNINSKI, R.; SGAN-COHEN, H. D. Oral cancer over four decades: Epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 39, n. 4, p. 299–305, 2010.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre componentes celulares (miofibroblastos) e alterações estruturais (fibras colágenas e elásticas) da matriz extracelular no processo de carcinogênese do lábio, bem como avaliar sua relação com a elastose solar em QAs e CCELS.

### 4.2 Objetivos específicos

- Identificar, através de imunistoquímica ( $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ ) e características morfológicas, a presença de miofibroblastos em amostras de lábio sadio (LSs), QAs e CCELS.
- Quantificar, através de técnica histoquímica, a quantidade de fibras colágenas (picrosirius red) e elásticas (Verhoeff van Gienson) presentes no *front* tumoral de CCELS e nas áreas com e sem elastose solar de QAs.
- Avaliar a possível correlação dos miofibroblastos  $\alpha$ -AML<sup>+</sup> e TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, o índice de proliferação celular (células Ki-67<sup>+</sup>), bem como a quantidade de fibras colágenas e elásticas com achados clínicos (sexo e idade) e histopatológicos (gradação de malignidade) dos casos de QAs nas áreas com e sem elastose solar.
- Avaliar a possível associação dos miofibroblastos  $\alpha$ -AML<sup>+</sup> e TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, o índice de proliferação celular (células Ki-67<sup>+</sup>) e a quantidade de fibras colágenas e elásticas com achados clínicos (TNM) e histopatológicos (gradação de malignidade, invasão perineural e angiolinfática) dos casos de CCELS presentes no *front* tumoral de CCELS.
- Analisar aspectos histomorfológicos e histomorfométricos da elastose solar (grau, profundidade e extensão, assim como sua distância ao epitélio de revestimento displásico) e correlacionar com a gradação histopatológica nos casos de QAs.
- Avaliar a correlação entre Ki-67,  $\alpha$ -AML, TGF- $\beta$ , fibras colágenas e elásticas em amostras de QAs, CCELS e LSs.

## **5. HIPÓTESES DE TRABALHO**

- H0: Os miofibroblastos não estão significativamente em maiores quantidades em amostras de CCELS de alto grau de malignidade e em amostras de QAs com alto risco de transformação maligna.

H1: Os miofibroblastos estão significativamente em maiores quantidades em amostras de CCELS de alto grau de malignidade e em amostras de QAs com alto risco de transformação maligna.

## 6. CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46, do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para trabalhos de conclusão de mestrado e doutorado (dissertações e teses) e permite a inserção de artigos científicos de autoria do candidato.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Haroldo Juçaba (Instituto do Câncer do Ceará), protocolado com o número de registro de 2.191.839 (Anexo). Foram respeitados todos os aspectos éticos expressos na Resolução nº 466 de 2012, do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, que traz as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de pesquisas com seres humanos e em conformidade com a norma do CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa).

Desta forma, a presente dissertação é composta por um artigo científico redigido de acordo com a revista científica escolhida.

### 6.1 Capítulo 1

“Avaliação da associação de miofibroblastose e alterações dos componentes estruturais da matriz extracelular com parâmetros clinicopatológicos de queilite actínica e carcinoma de células escamosas de lábio.” (*Assessment of the association of myofibroblasts and structural components of the extracellular matrix with clinicopathological parameters of actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma*)

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico:

*Archives of Oral Biology*

ISSN: 0003-9969

## Research Article

### Title page

Miofibroblastos se mostram envolvidos na carcinogênese do lábio e na elastose solar de queilites actínicas

Farah Essguí Orellana Martínez<sup>1</sup>, Thâmara Manoela Marinho Bezerra<sup>1</sup>, Paulo Goberlânio de Barros Silva<sup>1</sup>, Ana Paula Negreiros Nunes Alves<sup>1</sup>, Isabelle Joyce Lima Silva Fernandes<sup>1</sup>, Mário Rogério Lima Mota<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ce, Brazil

\*Correspondence author: PhD. MSc. DDS. Mário Rogério Lima Mota

Department of Dental Clinic

School of Pharmacy, Dentistry and Nursing

Federal University of Ceará

Rua Monsenhor Furtado, 1273 - Rodolfo Teófilo – Cep 60416-030

Fortaleza - CE, Brazil.

Phone / Fax Number: +55 85 3366 8232

E-mail: [mariolmota@yahoo.com.br](mailto:mariolmota@yahoo.com.br)

#### Running title:

**Keywords:** Lip neoplasm, Cancer-associated fibroblasts, Tumour microenvironment

#### Funding:

**Conflict of Interest:** Authors declares that they have no conflict of interest.

All authors have agreed to the submission.

#### Highlights

- Dos primeiros estudos histomorfométricos com amostras de lábio sadio
- Proposição de análises isolado de áreas com e sem ES em QAs
- Distância da área de ES relacionasse com a severidade da displasia em QAs
- CCEL com menor expressão de colágeno tem comportamento mais agressivo

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar a participação dos miofibroblastos (MFs) na carcinogênese labial, através da correlação de parâmetros clínicos, histológicos, histomorfométricos e imunoistoquímicos, em queilite actínica (QAs) e carcinomas de células escamosas de lábio (CCELS). **Metodologia:** 30 casos de QAs, 30 CCELS do *front* tumoral de e 15 lábios sadios (LSs) foram preparadas por tissue microarray (TMA) para reações imunoistoquímicas (TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -AML e Ki-67) e histoquímicas (H&E, Picrosirius Red e Verhoeff Van Gienson). Dados clínicos e microscópicos foram associados pelos testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis/Dunn e correlação de Spearman (SPSS,  $p < 0,05$ ). **Resultados:** QAs apresentaram maior número de células  $\alpha$ -AML+ em relação a amostras de LSs ( $p = 0,034$ ), e estas células (localizados nas áreas sem elastose) foram associadas com a expansão vertical da própria elastose ( $p = 0,027$ ). Adicionalmente, verificou-se que as áreas de elastose solar apresentaram menor deposição de colágeno ( $p < 0,001$ ) e imunomarcagem para TGF- $\beta$  ( $p < 0,001$ ) e maior densidade de fibras elásticas ( $p < 0,05$ ), quando comparadas com as áreas sem elastose. Observou-se uma correlação positiva entre DEs de alto risco a proximidade da elastose solar ao epitélio displásico ( $p = 0,027$ ). As análises dos CCELS apresentaram maior número de células  $\alpha$ -AML+ em relação a LSs ( $p = 0,034$ ), além da redução da deposição de colágeno total ( $p = 0,009$ ) e colágeno tipo I ( $p < 0,001$ ) em relação as QAs e LSs. Verificou-se, ainda, uma correlação negativa entre a quantidade de células  $\alpha$ -AML+ e a deposição de colágeno total ( $p = 0,041$ ) e colágeno tipo III ( $p = 0,041$ ). Observamos, ainda, que a perda colagênica e de densidade elástica foi significativamente maior em tumores de maior tamanho ( $p = 0,045$ ) e com metástase nodal ( $p = 0,047$ ). **Conclusão:** os achados deste trabalho trazem evidências do possível papel dos MFs, das fibras colágenas e das áreas de elastose no processo de carcinogênese de lábio.

## Introdução

O câncer de lábio (CL) representa cerca de 25% a 30% dos tumores de cavidade oral, sendo o carcinoma de células escamosas (CCE) o subtipo mais frequente (Lupu et al., 2018). Devido ao seu principal fator etiológico ser a radiação solar ultravioleta do tipo UVA e UVB (Wolff et al., 2012), sua incidência encontra-se intimamente relacionada com a latitude e, portanto, apresenta ampla variação geográfica. Altas taxas de CCE de lábios (CCELS) têm sido reportadas no Canadá, Austrália, Estados Unidos e Israel (Zini et al., 2010). Países da América

do Sul que se encontram perto do Equador, como Brasil, também são bastante acometidos pela doença, havendo aumento no número de casos nos últimos anos (Biasoli et al., 2016; Jadotte & Schwartz, 2012). Adicionalmente, os CCELS costumam acometer predominantemente no vermelhão do lábio inferior de homens mais velhos de pele clara, os quais exercem atividades ocupacionais expostos de forma crônica e prolongada à radiação UV (Cavalcante et al., 2008) e, apesar dos CCELS serem menos agressivos, eles possuem maior possibilidade de desenvolver metástases quando comparados com o câncer de pele (CP), que possui o mesmo fator etiológico (Dancyger et al., 2018).

A queilite actínica (QA) é uma desordem inflamatória crônica, normalmente assintomática e com potencial de transformação maligna para o CCEL (Araújo et al., 2012). De modo geral, as QAs podem apresentar histopatologicamente: alterações epiteliais como hiperqueratose, acantose, variados graus de displasia e, até mesmo, carcinoma *in situ* (Cavalcante et al., 2008; Markopoulos & Kayavis, 2004), acúmulo de material basofílico amorfo, acelular, denominado elastose solar (ES), presença de variados graus de infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos dilatados (Cavalcante et al., 2008). As áreas de ES são constituídas por degenerações colagênicas formadas pela incidência da radiação solar UV, logo são observadas com frequência em lesões associadas com o fotoenvelhecimento e constituem a principal alteração do conjuntivo em QAs (Bota et al., 2017).

Além da ES, diversas outras células, que compõem o tecido conjuntivo e o microambiente tumoral (MT), vêm ganhando destaque na literatura científica por sua interação com as células epiteliais e a modulação do microambiente local, contribuindo para o desenvolvimento do tumor (Custódio et al., 2020; Dourado et al., 2018a). Dentre essas células, destacam-se os miofibroblastos/fibroblastos associados ao câncer (CAFs), que possuem relação direta com o processo da carcinogênese, promovendo proliferação, invasão e metástase das células tumorais (Scully, 2014).

Os CAFs superexpressam  $\alpha$ -AML (Custódio et al., 2020) e possuem seu fenótipo direcionado por TGF- $\beta$ , que se encontra estocado na matriz extracelular (MEC) (Elmusrati et al., 2017; Shi et al., 2020). No entanto, apesar de não existirem técnicas específicas para a identificação de CAFs (Dourado et al., 2018a), unir características de imunomarcadores específicos positivos e morfologia celular fornece uma boa acurácia sobre a identificação de miofibroblastos e destaca a importância da imunofenotipagem para sua caracterização (Dayan

et al., 2012). Além disso, trabalhos que utilizam a morfologia de CAFs com parâmetros imunoistoquímicos têm obtido resultados satisfatórios (Dourado et al., 2018b; Ha et al., 2014).

Estudos anteriores evidenciaram um aumento na densidade de miofibroblastos em QAs e CCEs (Rojas et al., 2012), porém a relação dessas células com os componentes conjuntivos e estromais (fibras colágenas e elásticas) ainda não foram descritas. Assim, os conhecimentos acerca de CAFs no estroma de CCEs e na carcinogênese do lábio são limitados (Coletta & Salo, 2018) e, até onde nós sabemos, não há na literatura pesquisas que mostrem o papel dos miofibroblastos na carcinogênese de lábio.

Com base no exposto, este estudo tem como objetivo inovar ao avaliar a presença e a participação dos miofibroblastos no processo de carcinogênese do lábio, apresentado como diferencial verificação da relação destas células com os componentes morfoestruturais da MEC (fibras colágenas e elásticas) nas amostras de QAs e CCEs, através da correlação de dados clínicos, histológicos, imunoistoquímicos e histomorfométricos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Seleção da amostra**

Os grupos de estudo desta pesquisa foram compostos por casos de lábios sadios (LSs), QAs e CCEs. Para a seleção da amostra foi realizado cálculo amostral com base no estudo de Bianco et al (2015) que avaliou a presença de CAFs em mucocelos, QAs e CCEs. Foi dimensionada uma amostra de 30 casos, para o grupo (2 casos para um controle), estratégia estatística que vem sendo utilizada para aquelas pesquisas onde houver limitado número de amostras que consigam representar de fidedigna a situação clínica a ser estudada, ou nos casos em que a obtenção de amostras de algum dos grupos constituiria uma violação ética. Assim, foi estabelecida uma relação de 2:1, a fim de obter um resultado que represente com 95% de confiança e 90% de poder da hipótese proposta.

As amostras foram advindas de biópsias excisionais de QAs e CCEs fixadas em formalina e embebidas em parafina dos anos de 2010 a 2019 do Laboratório de Patologia Livino Pinheiro, do Hospital Haroldo Juçaba, Instituto de Câncer do Ceará (ICC). Os casos de LSs foram obtidos das margens cirúrgicas livres de alterações histológicas das amostras de QAs. Informações acerca do TNM clínico (cTNM), sexo, idade, ocupação profissional foram obtidas dos prontuários médicos. A pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa do ICC (2.191.839).

## **Confecção de TMA**

Análise histológica dos espécimes de biópsias permitiu a seleção de áreas displásicas e com ES nos casos de QAs, *front* tumoral em CCELS e áreas epiteliais livres de alterações morfológicas para os casos de LSs.

Para a confecção dos blocos, utilizou-se o dispositivo Tissue Microarrayer (Quick-Ray UNITMA®) (TMA). Foi realizada a punção em cada área previamente selecionada, obtendo-se um fragmento de 2mm de diâmetro, o qual foi transferido de maneira ordenada para o bloco receptor. Foram confeccionados 3 blocos de TMA (um para cada grupo de estudo), contendo, cada um deles, 70 fragmentos de tecidos. Cada bloco receptor foi submetido a cortes sequenciais de 4µm de espessura, os quais foram posteriormente dispostos em lâminas de vidro para coloração por hematoxilina e eosina (HE) e histoquímica e dispostos em lâminas silanizadas para estudo imunoistoquímico (Dantas et al., 2019).

## **Análises histomorfológicas e histomorfométricas**

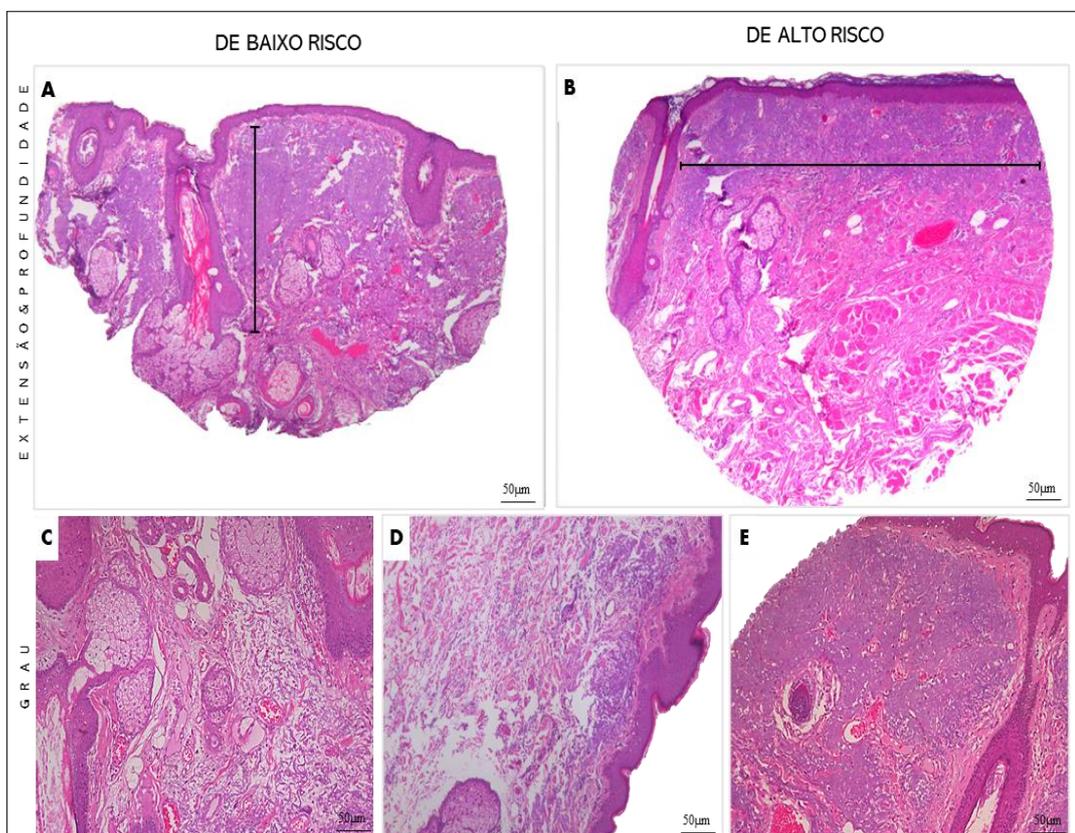
Os espécimes histológicos de biópsias excisionais corados com HE foram analisados sob microscopia de luz (Nikon Eclipse-E200, Tokyo, Japan) por um único patologista para realização de gradação histopatológica. As QAs foram gradadas através do sistema binário (Warnakulasuriya, 2009) e classificadas como alto e baixo risco de transformação maligna. As lâminas histológicas de CCELS foram gradadas de acordo com Bryne (1998) e classificadas como alto e baixo grau de malignidade.

Foi realizada uma análise histomorfométrica da ES com o auxílio de uma régua milimetrada (Nikon –Lâmina Padrão Calibração Escala 1/0.01 - 10/0.1) acoplada em um microscópio óptico (Nikon Eclipse-E200, Tokyo, Japan), realizou-se, nos casos de TMA de QAs coradas em HE, a medição vertical da distância entre a ES e a camada basal do epitélio de revestimento displásico (200x) e a espessura da ES (100x), bem como a medição horizontal da extensão da ES pelo espécime (100x) (Gonzaga et al., 2020) (Figura 5) . Todas essas medidas foram realizadas em 3 regiões diferentes do espécime e em seguida, foi calculada a média. Adicionalmente, avaliou-se, de forma semiquantitativa, o grau de ES nas lâminas histológicas de TMA coradas em HE sob microscopia de luz (Nikon Eclipse-E200, Tokyo, Japan) por um único patologista. Os campos histopatológicos considerados representativos (100x) foram avaliados baseados em uma escala (score +3 a 0), na qual +3 corresponde a um aumento difuso das fibras elásticas com um padrão de elastose em massa, +2 corresponde a um aumento difuso das fibras

elásticas, +1 corresponde a um aumento parcial com ninhos focais de fibras elásticas e 0 corresponde às mesmas características daquelas encontradas no grupo controle (Adaptado de Salvadori et al., 2014) (Figura 5). Nos casos de CCEls não foi possível realizar esta análise histomorfométrica devido a área do *front* tumoral ser escassa ou ausente de elastose solar.

**Figura 5** Análise histomorfométrica e histomorfológica da elastose solar em QAs.

(A) Medição da espessura da elastose solar, e da vertical da distância entre a elastose solar e camada basal do epitélio displásico. (B) Medição da extensão horizontal da elastose solar. Grau da elastose solar avaliada por meio do padrão de disposição das áreas de degeneração basofílica das fibras colágenas. Aglomerados focais (C), Aumento difuso (D) e aumento difuso com padrão em massa (E) (100x).



Fonte: Dados da pesquisa

### Técnica e análise imunoistoquímica

Os blocos de TMA foram cortados (3µm) em um micrótomo e as seções foram montadas em lâminas de vidro silanizadas. O método da imunoperoxidase foi usado (Dantas et al., 2019). A reação imunoistoquímica foi padronizada usando como controle positivo cortes histológicos parafinados de (CEC humano para KI-67, úlcera de mucosa oral de rato TGF-β e

intestino de rato  $\alpha$ -AML). A omissão do anticorpo primário foi utilizada para o controle negativo. Informações acerca do anticorpo primário, da diluição e do sistema de detecção usado em cada proteína são descritas na (Tabela 4):

**Tabela 4** Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição para imunoistoquímica	Recuperação Antigênica	Incubação
$\alpha$ -AML	Ab32575	Abcam®	1/300	Tampão de citrato ph 6.0	24h-4°C
TGF- $\beta$	Ab92486	Abcam®	1/300	Tampão de citrato ph 6.0	24h-4°C
Ki-67	MIB1	DAKO®	1/100	Tampão de citrato ph 6.0	24h-4°C

Fonte: Dados da pesquisa

Após desparafinização e reidratação, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica por aquecimento (tampão de recuperação antigênica na Tabela 4) em banho maria. Após resfriamento, seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% e bloqueio da proteína a 1% por 10 minutos. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários descritos na Tabela 4 (clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação). As lâminas foram depois incubadas com o anticorpo secundário Envision System Plus-HRP (Dako®) (pronto para uso), por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com solução cromógena preparada com DAB (3,3'-diaminobenzidina-tetracloro) (DAKO®, Carpentaria, CA, USA) por 5 minutos em uma câmara escura e posteriormente contracoradas com hematoxilina de Harris por 10 segundos. Por fim, as lâminas foram desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e montadas com Enhtellan® para análise sob microscopia de luz.

A positividade para TGF- $\beta$  e  $\alpha$ -AML foi definida quando havia presença de coloração acastanhada no citoplasma de células conjuntivas de formato fusiforme ou ovalado. Para quantificação, foram fotomicrografados 5 campos no aumento de 400x no tecido conjuntivo de LSs e nas áreas com presença e ausência de ES nas QAs. Nos casos de CCELS, as áreas fotomicrografadas foram na região de *front* tumoral (Bianco et al., 2015).

A positividade para Ki-67 foi definida quando havia presença de coloração acastanhada no núcleo e nucleoplasma das células epiteliais. Usando aumento de 100x, 5 campos de maior imunorreatividade para Ki-67 foram selecionados no epitélio dos LSs, no epitélio displásico de QAs e no parênquima próximo ao *front* tumoral de CCEs. Cada campo foi fotomicrografado no aumento de 400x (Adaptado de Chaves et al., 2018).

Um patologista, que não tinha conhecimento os dados clínico-patológicos avaliaram os resultados imunoistoquímicos. A porcentagem de células imunomarcadas foi calculada e expressa como média e desvio padrão (Dourado et al., 2018a).

### **Estudo e análise histológica do Picrosirius Red**

A coloração histoquímica de Picrosirius Red (PIC) foi usada como marcador histológico para a identificação de fibras colágenas no tecido conjuntivo. Para isso, seções de tecido de 3µm foram estendidas em lâminas histológicas de vidro e desparafinizadas em estufa na temperatura de 60°C por 3 horas. Em sequência, as lâminas foram desparafinadas, reidratadas e finalmente, incubadas em solução de picrosirius (ScyTek®) por 30 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contracoradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com Enhtellan® para análise sob microscopia de luz (Nunes Alves et al., 2015).

Por meio de uma câmara acoplada a um microscópio de luz polarizada (Leica® modelo DM 2000), foram fotomicrografados em QAs 10 campos (5 com elastose solar e 5 campos sem elastose solar) e em LSs e CCEs 5 campos no aumento de 400X vezes. Através do software Image J® as fotomicrografias foram calibradas pelo comando Color Thershold para as cores vermelho (mínimo de 71 e máximo de 255), verde (mínimo de 0 e máximo de 69) e azul (mínimo de 0 e máximo de 92) sob luz convencional. Após a calibração, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits, binarizadas e mensuradas através da porcentagem de área de colágeno marcada em vermelho (Analyse>AnalyseParticles). As imagens em luz polarizada seguiram o mesmo protocolo na função RGB para vermelho (mínimo de 0 e máximo de 255) e verde (mínimo de 0 e máximo de 255). Após ajuste, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (Image>Type> 8-bit), binarizadas (Process>Binary>MakeBinary) e mensuradas através da porcentagem de área de colágeno com birrefringência vermelho/alaranjado (compatível com colágeno tipo I). Em seguida, do total da área marcada em vermelho, foi separado um percentual da região ocupada somente pela birrefringência

vermelho/alaranjado. A área amarelo/esverdeado (relativa ao colágeno tipo III) foi obtida pela subtração da região total marcada em vermelho e o percentual marcado unicamente pela cor amarelo avermelhada (Adaptado de Nunes Alves et al., 2015).

### **Técnica e análise histológica de Verhoeff van Gieson**

A coloração histoquímica de Verhoeff Van Gieson (VVG) foi usada como marcador histológico para a identificação de fibras elásticas no tecido conjuntivo. Utilizando-se o kit para coloração de fibras elásticas (Êxodo Científica®), as lâminas histológicas de TMA foram incubadas em solução de Verhoeff® por 24 horas, contracoradas com solução de Van Gieson por 3 segundos e montadas com Enhtellan® para análise sob microscopia de luz (Adaptado de Rojas et al., 2012).

As fibras coradas em negro foram consideradas do tipo elásticas após a coloração de VVG. Sob aumento de 100x, foram identificadas a presença dessas fibras e as lâminas foram fotomicrografadas em 3 campos sob o aumento de 400x. Posteriormente foi medida a área total de cada fibra elástica usando a ferramenta polygon selection do ImageJ®. Por fim, foi calculada a densidade de fibras em cada fotomicrografia por meio da equação (Ferreira et al., 2020).

$$\text{Densidade} = \frac{\text{Área marcada campo 1} + \text{Área marcada campo 2} + \text{Área marcada campo 3}}{\text{Área total de em micrometros}}$$

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e apresentados na forma de média e desvio-padrão. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis/Dunn foram usados para comparar os grupos entre si. O teste de correlação de Spearman avaliou as correlações entre os grupos QA e CCEL com miofibroblastos e composição do tecido conjuntivo.

## **RESULTADOS:**

### **Descrição das variáveis clinicopatológicas das amostras CCELS e QAs**

Neste estudo foram incluídos 30 casos de CCELS, sendo a grande parte de baixo grau de malignidade (22; 70,96%), sem invasão angiolinfática (29; 93,54%) ou perineural (22; 70,97%). De acordo com a classificação TNM, grande parte dos tumores eram de menores tamanhos (T1/T2) (25; 83%) e com ausência de invasão linfática (N0) (29; 96,7%). Nenhum tumor apresentou metástase à distância. A amostra incluiu 30 casos de QAs, sendo a maioria

gradadas como de baixo risco de transformação maligna (20; 66,66%), com preferência por acometer homens (17; 56%) com mais de 65 anos de idade (20; 66,66%).

**Análise da imunoexpressão de TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -AML e Ki-67 bem como da histoquímica para fibras colágenas e elásticas nas amostras de LSs, QAs (áreas com e sem elastose solar) e CCELS.**

Todos os casos de LSs, QAs e CCELS apresentaram células com morfologia compatível com fibroblastos imunomarcados para  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ , sugerindo miofibroblastos.

Uma maior taxa de proliferação celular (células Ki-67+) ( $p=0.004$ ; Tabela 5) (Figura 6; L, M, N) e de miofibroblastos (células  $\alpha$ -AML+) ( $p=0.034$ ; Tabela 1) foram observadas em QAs e CCELS do que no grupo controle (Figura 6; D, E/E+, F/E+, G). Relativo à densidade colagênica, uma menor quantidade de colágeno foi observada no *front* tumoral dos CCELS quando comparado às QAs o grupo controle ( $p=0,009$ ; Tabela 5), sendo o colágeno do tipo I encontrado em menor quantidade em CCELS do que no controle e nas QAs ( $p<0.001$ ; Tabela 5) (Figura 6; Q, T).

Ao analisar as características clinicopatológicas dos CCELS em relação a imunoexpressão de Ki-67,  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$  bem como a quantidade média de fibras colágenas e a densidade de fibras elásticas presentes no *front* tumoral, observamos que as áreas de *front* tumoral com maior densidade de fibras elásticas estão presentes em tumores menores (T1/T2) ( $p=0.045$ ; Tabela 6) e sem comprometimento linfonodal (N0) ( $p=0.047$ ; Tabela 6). Uma maior quantidade de fibras colágenas do tipo I também foram encontradas em tumores sem comprometimento linfonodal ( $p=0.033$ ; Tabela 6). Nós observamos, que tumores com invasão linfonodal apresentaram maior expressão de Ki-67 ( $p=0.039$ ; Tabela 6). Adicionalmente, não verificamos diferença estatística em relação à densidade de células  $\alpha$ -AML+/TGF- $\beta$ + em relação aos outros parâmetros clínicos, histopatológicos e indicativos de agressividade ( $p>0.05$ ; Tabela 6).

Em QAs há uma quantidade significativamente menor de células TGF- $\beta$ +, que foram encontradas na área da elastose solar ( $p<0.001$ ; Tabela 7) (Figura 6: I/E+, J/E-) independente da gradação histopatológica das DELs ( $p<0.05$ ; Tabela 7) (Figura 6; I/E+, J/E-). No entanto, não encontramos diferença estatisticamente significativa na quantidade de células  $\alpha$ -AML+ nas áreas com e sem elastose solar, assim como entre as gradações histopatológicas de DELs ( $p<0.05$ ; Tabela 7). (Figura 6: E/E+, F/E-)

Houve redução significativa na quantidade total de colágeno nas áreas com elastose solar ( $p < 0.001$ ; Tabela 7). (Figura 6; P/E+, S/E-). Apesar de ambos os tipos de colágeno analisados mostrarem redução, o colágeno tipo I foi o tipo mais reduzido nessa região ( $p < 0.001$ ; Tabela 7). A redução do colágeno nas áreas de elastose ocorreu de forma independente do grau das DELs. As fibras elásticas apresentaram aumento significativo de sua densidade total nas áreas com elastose solar independente do grau das DELs ( $p < 0.05$ ; Tabela 7) (Figura 6; V/E+, W/E-).

Independente do sexo e do aumento da idade, observamos redução significativa na quantidade de células TGF- $\beta$ +, colágeno total, principalmente do colágeno tipo I, e aumento na densidade das fibras elásticas nas áreas de elastose solar ( $p < 0.05$ ; Tabela 7). Uma quantidade significativamente maior de células  $\alpha$ -AML+ foi encontrada nas áreas com elastose solar em pacientes do sexo masculino com QA ( $p = 0.018$ ; Tabela 7).

#### **Análise da associação entre aspectos histomorfológicos e histomorfométricos da elastose solar em QAs, de acordo com a gradação histopatológica.**

Ao analisar os aspectos histomorfológicos e histomorfométricos da elastose solar, verificou-se associação significativa entre a gradação histopatológica das QAs e a proximidade da elastose solar ao epitélio de revestimento displásico, ou seja, as displasias de alto risco apresentaram uma menor distância entre a elastose solar e epitélio de revestimento quando comparado às displasias de baixo risco ( $p = 0,028$ ; Tabela 8).

#### **Avaliação de correlação entre Ki-67, $\alpha$ -AML, TGF- $\beta$ , fibras colágenas e elásticas em amostras de QAs, CCELS e LSs**

Em CCELS observou-se correlação negativa e significativa entre células  $\alpha$ -AML+ e quantidade de colágeno total ( $p = 0.041$ ; Tabela 9) e tipo III ( $p = 0.041$ ; Tabela 9).

Em QAs, observou-se correlação positiva e significativamente estatística entre quantidade de células  $\alpha$ -AML+ (nas áreas sem elastose solar) com profundidade da elastose solar ( $p = 0.027$ ; Tabela 10) e sua proximidade ao epitélio de revestimento displásico ( $p = 0.037$ ; Tabela 10), também com a densidade de fibras elásticas nas áreas com elastose solar ( $p = 0.034$ ; Tabela 10). Além disso, foi observada a correlação inversa e significativa entre as fibras colágenas e fibras elásticas (nas áreas sem elastose solar) ( $p = 0.029$ ; Tabela 10).

## DISCUSSÃO:

Este trabalho evidenciou quantidades significativamente maiores de células  $\alpha$ -AML+ em QAs e no *front* de CCEs em relação ao grupo controle (Tabela 5), sugerindo uma maior presença desse tipo celular em lesões malignas e pré-malignas de lábio. A maior presença de miofibroblastos no câncer é vista em diversos estudos (de-Assis et al., 2012; Dourado et al., 2018a; Fujii et al., 2012; Kellermann et al., 2007). Além disso, sua presença está relacionada com as características clínicas e histopatológicas indicativas de pior prognóstico e agressividade na carcinogênese oral (Coletta & Salo, 2018; Dourado et al., 2018a; Elmusrati et al., 2017)

Sabe-se que a quantidade e os tipos de colágeno peritumoral de diferentes tipos de câncer estão relacionados de formas distintas com as características clínicas e histopatológicas do tumor. Carcinoma invasivo e metastático de cólon (Halvorsen & Seim, 1989) e bem diferenciados de câncer de pele em modelo animal (Stenback et al., 1999) apresentam fibrose peritumoral. Já CCEs mostram uma maior quantidade de colágeno tipo I presente na borda invasora dos tumores de prognóstico favorável e de baixo grau de malignidade (Sekiguchi et al., 1997). O colágeno tipo III mostra-se mais abundante no estroma de CCEs de pobre prognóstico (John & Murthy, 2016). Apesar disso, ainda é limitado o conhecimento acerca da forma como o colágeno estromal influencia na tumorigênese (Nissen et al., 2019). Além disso, existe uma lacuna no conhecimento acerca das alterações das fibras elásticas no estroma de CCEs. Assim, este estudo avaliou de forma inédita a composição estromal do *front* tumoral de CCEs.

Foi observado que há uma redução gradual significativa do colágeno total, principalmente do tipo I, no *front* tumoral nos CCEs em relação às QAs e aos LSs ( $p < 0.05$ ; Tabela 5). Durante o processo de carcinogênese, a invasão de células epiteliais malignas está associada ao aumento na expressão de enzimas tais como colagenases, elastases e metaloproteinases de matriz, por tanto, o estabelecimento da lesão maligna propriamente dita, como nos CCEs deste estudo, pode levar ao aumento da degradação do colágeno em relação às QAs e aos LSs. Isso também pode explicar os resultados acerca de que os CCEs com metástases linfonodais, que apresentaram maior índice de proliferação celular Ki-67 ( $p = 0.039$ ; Tabela 6), menores quantidades de colágeno tipo I ( $p = 0.033$ ; Tabela 6) e reduzida densidade de fibras elásticas ( $p = 0.047$ ; Tabela 6), no *front* tumoral. Além disso, tumores maiores (T3/4)

também apresentam menor densidade de fibras elásticas ( $p=0.047$ ; Tabela 6) no *front* tumoral. De forma semelhante, estudos demonstraram que CCEOs com menores quantidades de colágeno nas bordas invasoras possuem mais características de malignidade (Sekiguchi et al., 1997). Além disso, uma menor quantidade de fibras elásticas foram detectadas em CCEOs com pior prognóstico (John & Murthy, 2016) e sua ausência foram observadas em casos que apresentaram metástase linfonodal (Agrawal et al., 2011).

A degeneração basofílica do colágeno é a representação morfológica do dano solar ao tecido conjuntivo (Bota et al., 2017; Santana et al., 2020). Ela ocorre quando a radiação solar UV alcança a derme e degenera o colágeno pela ação de espécies reativas de oxigênio, os quais também induzem a suprarregulação de MMPs (Sgarbi et al., 2010; Trautinger, 2001). Além disso, as células presentes no tecido conjuntivo degenerado sofrem alterações qualitativas e quantitativas (Bianco et al., 2015). Com o objetivo de entender como a elastose solar altera os constituintes teciduais nas QAs, nós realizamos uma análise histoquímica da composição do tecido conjuntivo por meio de coloração com PIC (que potencializa a birrefringência do colágeno sob luz polarizada) e VVG (fibras elásticas). Até onde nós sabemos, poucos estudos investigaram a degeneração basofílica do colágeno no vermelhão de lábio. De forma contrária ao que foi sugerido por Bianco et al (2015), nossos achados mostram que áreas com elastose solar de QAs não possuem quantidades de CAFs  $\alpha$ -AML+ estatisticamente diferentes daquelas sem elastose solar (Tabela 7). No entanto, células TGF- $\beta$ + estão em quantidades significativamente maiores nas áreas sem elastose solar de QAs quando comparado com as áreas com elastose solar ( $p < 0.001$ ; Tabela 7). Como TGF- $\beta$  atua como fator de crescimento para componentes da matriz extracelular, sua ativação estimula fibroblastos para formar um microambiente pró-fibrótico, ou seja, com maior quantidade de colágeno, assim como são as áreas sem elastose solar, além de proporcionar a transição de fibroblastos para miofibroblastos, o que aumentaria a quantidade de CAFs TGF- $\beta$ + bem como do componente fibroso, como ocorreu nos resultados (Shi et al., 2020). Além disso, pesquisas mostram que fibroblastos expostos a radiação UVB apresentam um perfil senescente e de iniciação da autofagia (Cavinato et al., 2017; Chainiaux et al., 2002). Isso pode explicar por que nossos achados mostram uma menor quantidade de células TGF- $\beta$ + nas áreas com elastose solar, visto que células senescentes possuem perda irreversível da capacidade replicativa. Aliado a isso, TGF- $\beta$  é capaz de acelerar e induzir senescência em fibroblastos (Tominaga & Suzuki, 2019). É interessante observar que a redução de células TGF- $\beta$ + ocorreu de forma independente da gradação histopatológica das

DELs (Tabela 7). Apesar de TGF- $\beta$  possuir um efeito contexto dependente no processo de cancerização, a relação entre células TGF- $\beta^+$  e envelhecimento é desconhecida (Tominaga & Suzuki, 2019) principalmente no contexto de fotoenvelhecimento.

Apesar de os elementos que compõem a elastose solar não serem conhecidos com exatidão (Miura et al., 2004; Sgarbi et al., 2010), sabe-se que, além de colágeno degradado, há acúmulo desorganizado de fibras elásticas emaranhadas, tropoelastina, fibrilina, metaloproteinases e lisozimas, tal como aumento de quantidade de substância fundamental amorfa (Miura et al., 2004; Rojas et al., 2012; Yaar & Gilchrest, 2007). Em QAs, nós encontramos uma quantidade estatisticamente menor de colágeno total, colágeno tipo I e III nas áreas de elastose solar, sendo o colágeno tipo I o mais reduzido (Tabela 7). Esses achados são condizentes com o que é relatado na literatura sobre os componentes do tecido conjuntivo com elastose solar (Araújo et al., 2012; Martínez et al., 2008; Rojas et al., 2012). Houve maior perda do colágeno tipo I por fotodano, isso acontece porque na presença de colágeno degradado por colagenase, os fibroblastos reduzem a produção de pró-colágeno tipo I (Varani et al., 2002). Aliado a isso, a radiação UV também suprime a transcrição de genes pró-colágeno tipo I, o que reduz a substituição do tecido conjuntivo danificado por colágeno recém-sintetizado (Santana et al., 2020). Nossos achados mostram que na área de elastose solar também há um aumento consistente na quantidade de fibras elásticas (Tabela 7) bem como alterações morfológicas da elastina (variados graus de espessura, fragmentação e formação de glóbulos). Isso pode ocorrer devido a um modelo regulatório anormal na área de elastose que envolve os componentes estruturais (Versican - VER) ou de formação (Elastin Binding Proteins -EBP) das fibras elásticas (Araújo et al., 2012). Durante a exposição crônica a radiação UV, há uma redução consistente nos níveis de mRNA de VER e menores níveis de transcrição de EBP (Knott et al., 2009).

Sabe-se que a composição do estroma pode criar um microambiente atípico que favorece o campo de cancerização. Isso pode acontecer com estromas continuamente expostos a radiação solar, uma vez que as proteínas presentes na MEC interferem na integridade do genoma e contribuem para fotoenvelhecimento e carcinogênese (Araújo et al., 2012; Wondrak et al., 2003). Além disso, estudos em pele humana expostas a radiação UV mostram que não somente a degradação das macromoléculas da MEC como também a elastose actínica aumentam o risco de desenvolvimento do câncer (Yano et al., 2005). A elastose tem sido associada a piores prognósticos e grau de invasão em diversos tipos de câncer (Walther et al.,

2004), além de estar presente em diversas doenças como asma e enfisema pulmonar, bem como em fumantes (M. Just et al., 2007; Miquel Just et al., 2005). Isso fornece fortes indícios de que a elastose solar participa do remodelamento da MEC. Com base nisso, nós decidimos investigar como a elastose actínica afeta a progressão das DELs em QAs. Nossos achados evidenciaram que a redução colagênica total e dos tipos I e III de colágeno bem como o aumento das fibras elásticas na área de elastose solar ocorreu independente do grau da DELs presentes nas QAs (Tabela 7). De forma semelhante, Araújo et al (2012) não encontrou influência da elastina, presente na elastose solar, na severidade das DELs em amostras de QAs. Esses autores sugerem que outras proteínas da MEC devem ser investigadas para melhor compreender os mecanismos envolvidos na progressão das DELs em QAs. Os achados mostram aumento na quantidade de células  $\alpha$ -AML+ nas áreas com elastose solar em QAs de pacientes do sexo masculino ( $p=0,018$ ; Tabela 7). Nós supomos que isso pode estar relacionado a lesões maiores, mais velhas e que conseqüentemente apresentam um processo de carcinogênese mais avançada, uma vez que homens geralmente tardam em procurar o tratamento o que contribui para que esses pacientes apresentem lesões mais agressivas e de pior prognóstico no momento do diagnóstico. (Kawasaki et al., 2009).

No entanto, nós investigamos, além dos constituintes da elastose solar, seus parâmetros histomorfométricos (profundidade, extensão e grau da elastose solar bem como proximidade da elastose ao epitélio de revestimento displásico) (Tabela 8). Nós encontramos que a degeneração basofílica do colágeno estava significativamente mais próxima a epitélios displásicos com alto grau de malignidade ( $p= 0.028$ ; Tabela 8). Gonzaga et al (2020) ao correlacionar medidas histomorfométricas com severidade de DELs em QAs, somente detectou significância estatística entre espessura de ceratina e gradação histopatológica das displasias. Os achados desses autores podem divergir dos nossos porque eles não usaram o sistema de gradação binário para displasias e, além disso, não fica claro na metodologia do trabalho se a medida vertical usada para aferir a distância entre epitélio e elastose foi realizada na área displásica, como foi feito no presente estudo. Os achados sugerem que realmente o tecido conjuntivo com elastose actínica sofre remodelamento da MEC e que isso está ligado à severidade das DELs em QAs. Isto abre perspectivas futuras para a uma avaliação criteriosa da área de elastose imediatamente abaixo do epitélio displásico, devendo este achado ser considerado como um possível fator de agressividade nas QAs. Além disso, em concordância

com Araújo et al (2012), nós acreditamos que outros constituintes da elastose solar, que não o colágeno e a elastina, devem estar envolvidos com a progressão das DELs nas QAs.

As análises de correlação evidenciaram que em CCELS há uma correlação significativa inversamente proporcional entre quantidade de células  $\alpha$ -AML+ e quantidade de colágeno total ( $p=0.041$ ; Tabela 9) e tipo III ( $p=0.041$ ; Tabela 9). Isso nos dá indícios de que a degeneração colagênica é preponderante no *front* tumoral, apesar da presença marcante de células estromais  $\alpha$ -AML+. No entanto, não podemos desconsiderar que CAFs também são capazes de produzir MMPs, induzir epithelial-to-mesenchymal transcrição, desregulação de E-cadherin e aumentar a invasividade celular (Hanley et al., 2016; John & Murthy, 2016; Kalluri, 2016; Nissen et al., 2019). Um Estudo, *in vitro* de linhagem celular de câncer de mama mostrou que a presença do TGF- $\beta$  em CAFs foi capaz de aumentar a expressão de vimentina, fibronectina e (MMP2 e MMP9), contribuindo ao comportamento migratório e ao aumento da invasão em Matrigel (Yu et al., 2013).

Em QAs, interessante, os resultados deste estudo mostram que quanto mais a elastose solar penetra no tecido conjuntivo e se aproxima do epitélio de revestimento displásico, mais células  $\alpha$ -AML+ se concentram de forma significativa em áreas sem elastose solar ( $p<0.050$ ; Tabela 10). Talvez, isso aconteça porque os miofibroblastos (células  $\alpha$ -AML+) contidos nas áreas sem elastose solar podem participar de forma mais ativa do processo de expansão das áreas de elastose do que aqueles confinados nas áreas de elastose solar. De forma semelhante, nós observamos que células  $\alpha$ -AML+ presentes nas áreas de colágeno morfologicamente normal aumentam a densidade de fibras elásticas nas áreas de elastose solar ( $p=0.034$ ; Tabela 10). Como discutimos anteriormente, células presentes nas áreas de elastose podem estar senescentes e, portanto, em um estado de quiescência. Além disso, não podemos descartar que aparentemente a degeneração das fibras colágenas ocasionadas pela radiação UV pode afetar as células adjacentes presentes em áreas de colágeno normal, através de mecanismos ainda desconhecidos.

## **CONCLUSÃO:**

Este estudo promove evidências sobre o possível papel dos miofibroblastos, das fibras colágenas e das áreas de elastose no processo de carcinogênese de lábio. Em QAs, observou-se um aumento de miofibroblastos, bem como uma associação dessas células (em áreas sem elastose) com expansão vertical da elastose solar. Destaca-se, ainda, que, em QAs, a

proximidade das áreas de elastose ao epitélio displásico está associada à presença de displasias de alto risco e que as áreas de elastose apresentam menor percentual de colágeno, menor imunexpressão de TGF- $\beta$  e maior densidade de fibras elásticas que as áreas sem elastose solar. Em CCEs, ao passo que foi observado um aumento de miofibroblastos  $\alpha$ -AML+, foram visualizadas de forma inversamente proporcional perda colagênica total, principalmente, do colágeno tipo I, assim como de fibras elásticas na região do *front* tumoral. Finalmente, observou-se que a perda colagênica e de densidade de fibras elásticas foi significativamente maior em tumores agressivos e como metástase nodal.

## Referencias

- Agrawal, U., Rai, H., & Jain, A. K. (2011). Morphological and ultrastructural characteristics of extracellular matrix changes in oral squamous cell carcinoma. *Indian Journal of Dental Research*, 22(1), 16–21. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.79968>
- Araújo, C. P., Xavier, F. C. de A., Gurgel, C. A. S., Ramos, E. A. G., Freitas, V. S., Schlaepfer-Sales, C. B., Ramalho, L. M. P., & dos Santos, J. N. (2012). Elastin Accumulation in Actinic Cheilitis with Different Degrees of Epithelial Dysplasia. *International Journal of Morphology*, 30(2), 627–633. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022012000200044>
- Bianco, B. C., Scotti, F. M., Vieira, D. S. C., Biz, M. T., Castro, R. G., & Modolo, F. (2015). Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, myofibroblasts and Ki-67 in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *International Journal of Experimental Pathology*, 96(5), 311–318. <https://doi.org/10.1111/iep.12140>
- Biasoli, É. R., Valente, V. B., Mantovan, B., Collado, F. U., Neto, S. C., Sundefeld, M. L. M., Miyahara, G. I., & Bernabé, D. G. (2016). Lip Cancer: A Clinicopathological Study and Treatment Outcomes in a 25-Year Experience. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 74(7), 1360–1367. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2016.01.041>
- Bota, J. P., Lyons, A. B., & Carroll, B. T. (2017). Squamous cell carcinoma of the lip - A review of squamous cell carcinogenesis of the mucosal and cutaneous junction. In *Dermatologic Surgery* (Vol. 43, Issue 4, pp. 494–506). <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001020>

- Bryne, M. (1998). Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication. *Oral Diseases*,(4), 70-77.
- Cavalcante, A. S. R., Anbinder, A. L., & Carvalho, Y. R. (2008). Actinic Cheilitis: Clinical and Histological Features. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66(3), 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2006.09.016>
- Cavinato, M., Koziel, R., Romani, N., Weinmüllner, R., Jenewein, B., Hermann, M., Dubrac, S., Ratzinger, G., Grillari, J., Schmuth, M., & Jansen-Dürr, P. (2017). UVB-induced senescence of human dermal fibroblasts involves impairment of proteasome and enhanced autophagic activity. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 72(5), 632–639. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw150>
- Chainiaux, F., Magalhaes, J. P., Eliaers, F., Remacle, J., & Toussaint, O. (2002). UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(11), 1331–1339. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00022-5)
- Coletta, R. D., & Salo, T. (2018). Myofibroblasts in oral potentially malignant disorders: Is it related to malignant transformation? *Oral Diseases*, 24(1–2), 84–88. <https://doi.org/10.1111/odi.12694>
- Custódio, M., Biddle, A., & Tavassoli, M. (2020). Portrait of a CAF: The story of cancer-associated fibroblasts in head and neck cancer. *Oral Oncology*, 110(October), 104972. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104972>
- Dancyger, A., Heard, V., Huang, B., Suley, C., Tang, D., & Ariyawardana, A. (2018). Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 9(4), e12343. <https://doi.org/10.1111/jicd.12343>
- Dantas, T. S., de Barros Silva, P. G., Verde, M. E. Q. L., Ribeiro Júnior, A. de L., Cunha, M. do P. S. S., Mota, M. R. L., Alves, A. P. N. N., Leitão, R. F. de C., & Sousa, F. B. (2019). Role of inflammatory markers in prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(12), 3635–3642. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.12.3635>

- Dayan, D., Salo, T., Salo, S., Nyberg, P., Nurmenniemi, S., Costea, D. E., & Vered, M. (2012). Molecular crosstalk between cancer cells and tumor microenvironment components suggests potential targets for new therapeutic approaches in mobile tongue cancer. *Cancer Medicine*, *1*(2), 128–140. <https://doi.org/10.1002/cam4.24>
- de-Assis, E. M., Pimenta, L. G. G. S., Costa-e-Silva, E., Souza, P. E. A., & Horta, M. C. R. (2012). Stromal myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, *17*(5), 17–22. <https://doi.org/10.4317/medoral.17834>
- Dourado, M. R., Guerra, E. N. S., Salo, T., Lambert, D. W., & Coletta, R. D. (2018a). Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, *47*(5), 443–453. <https://doi.org/10.1111/jop.12623>
- Dourado, M. R., Guerra, E. N. S., Salo, T., Lambert, D. W., & Coletta, R. D. (2018b). Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. In *Journal of Oral Pathology and Medicine* (Vol. 47, Issue 5, pp. 443–453). <https://doi.org/10.1111/jop.12623>
- Elmusrati, A. A., Pilborough, A. E., Khurram, S. A., & Lambert, D. W. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, *117*(6), 867–875. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.239>
- Ferreira, K. D., Cardoso, L. D., Oliveira, L. P., Franzo, V. S., Pancotti, A., Miguel, M. P., Silva, L. A. F., & Vulcani, V. A. S. (2020). Histological analysis of elastic cartilages treated with alkaline solution. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, *72*(3), 647–654. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11539>
- Fujii, N., Shomori, K., Shiomi, T., Nakabayashi, M., Takeda, C., Ryoke, K., & Ito, H. (2012). Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: Their clinicopathological and prognostic significance. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, *41*(6), 444–451. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2012.01127.x>
- Gonzaga, A. K. G., Mafra, R. P., da Silva, L. P., de Almeida Freitas, R., de Souza, L. B., & Pinto, L. P. (2020). Actinic cheilitis: Morphometric parameters and its relationship with the degree of epithelial dysplasia. *Acta Histochemica*, *122*(1), 151452. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.151452>

- Ha, S. Y., Yeo, S. Y., Xuan, Y. H., & Kim, S. H. (2014). The prognostic significance of cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099955>
- Halvorsen, T. B., & Seim, E. (1989). Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*, *42*(2), 162–166. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.2.162>
- Hanley, C. J., Noble, F., Ward, M., Bullock, M., Drifka, C., Mellone, M., Manousopoulou, A., Johnston, H. E., Hayden, A., Thirdborough, S., Liu, Y., Smith, D. M., Mellows, T., John Kao, W., Garbis, S. D., Mirnezami, A., Underwood, T. J., Eliceiri, K. W., & Thomas, G. J. (2016). A subset of myofibroblastic cancer-associated fibroblasts regulate collagen fiber elongation, which is prognostic in multiple cancers. *Oncotarget*, *7*(5), 6159–6174. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6740>
- Jadotte, Y. T., & Schwartz, R. A. (2012). Solar cheilosis: An ominous precursor: Part I. Diagnostic insights. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *66*(2), 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.09.040>
- John, R. E., & Murthy, S. (2016). Morphological analysis of collagen and elastic fibers in oral squamous cell carcinoma using special stains and comparison with Broder's and Bryne's grading systems. *Indian Journal of Dental Research*, *27*(3), 242–248. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.186242>
- Just, M., Ribera, M., Monsó, E., Lorenzo, J. C., & Ferrándiz, C. (2007). Effect of smoking on skin elastic fibres: Morphometric and immunohistochemical analysis. *British Journal of Dermatology*, *156*(1), 85–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07575.x>
- Just, Miquel, Monsó, E., Ribera, M., Lorenzo, J. C., Morera, J., & Ferrandiz, C. (2005). Relationships between lung function, smoking and morphology of dermal elastic fibres. *Experimental Dermatology*, *14*(10), 744–751. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2005.00353.x>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *16*(9), 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
- Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Hase T, Nakaya H, Ohara T, Kato K, Yamamoto E. (2009). Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*. *31*(10), 1346-53. doi: 10.1002/hed.21097. PMID: 19373786.

- Kellermann, M. G., Sobral, L. M., Da Silva, S. D., Zecchin, K. G., Graner, E., Lopes, M. A., Nishimoto, I., Kowalski, L. P., & Coletta, R. D. (2007). Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis [3]. *Histopathology*, *51*(6), 849–853. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02873.x>
- Knott, A., Reuschlein, K., Lucius, R., Stäb, F., Wenck, H., & Gallinat, S. (2009). Deregulation of versican and elastin binding protein in solar elastosis. *Biogerontology*, *10*(2), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s10522-008-9165-3>
- Lupu, M., Caruntu, A., Caruntu, C., Boda, D., Moraru, L., Voiculescu, V., & Bastian, A. (2018). Non-invasive imaging of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Molecular and Clinical Oncology*, 640–646. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1599>
- Markopoulos, A., & Kayavis, I. (2004). Actinic cheilitis: Clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Diseases*, *10*(4), 212–216. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01004.x>
- Martínez, A., Brethauer, U., Borlando, J., Spencer, M. L., & Rojas, I. G. (2008). Epithelial expression of p53, mdm-2 and p21 in normal lip and actinic cheilitis. *Oral Oncology*, *44*(9), 878–883. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.11.008>
- Miura, Y., Fujimoto, N., Komatsu, T., Tajima, S., Kawada, A., Saito, T., & Fujii, N. (2004). Immunohistochemical study of chronological and photo-induced aging skins using the antibody raised against D-aspartyl residue-containing peptide. *Journal of Cutaneous Pathology*, *31*(1), 51–56. <https://doi.org/10.1046/j.0303-6987.2004.0144.x>
- Nissen, N. I., Karsdal, M., & Willumsen, N. (2019). Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *38*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1110-6>
- Nunes Alves, A. P. N., Lima Verde, M. E. Q., Ferreira Júnior, A. E. C., Barros Silva, P. G., Pinheiro Feitosa, V., Lima Júnior, E. M., Borges de Miranda, M. J., & Moraes Filho, M. O. (2015). Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. *Rev Bras Queimaduras*, *14*(3), 203–210.
- Rojas, I. G., Boza, Y. V, Spencer, M. L., Flores, M., & Martínez, A. (2012). Increased fibroblast density in actinic cheilitis: Association with tryptase-positive mast cells, actinic elastosis and epithelial p53 and COX-2 expression. *Journal of Oral Pathology*

*and Medicine*, 41(1), 27–33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2011.01057.x>

- Salvadori, G., dos Santos, J. N., Martins, M. A. T., Vasconcelos, A. C., Meurer, L., Rados, P. V., Carrard, V. C., & Martins, M. D. (2014). Ki-67, TGF- $\beta$ 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. *Tumor Biology*, 35(8), 7635–7644. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1989-7>
- Santana, T., Nagata, G., Saturno, J. L., & Trierweiler, M. (2020). Histopathological features of photodamage and mast cell infiltrate in actinic cheilitis with different grades of epithelial dysplasia. *Journal of Cutaneous Pathology*, 47(7), 592–600. <https://doi.org/10.1111/cup.13677>
- Scully, C. (2014). Challenges in predicting which oral mucosal potentially malignant disease will progress to neoplasia. *Oral Diseases*, 20(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/odi.12208>
- Sekiguchi, T., Noguchi, M., Nakamori, K., & Kohama, G. I. (1997). Clinical significance of interstitial collagen deposition at the invading edge in oral cancer: Immunohistochemistry for type I collagen. *International Journal of Clinical Oncology*, 2(1), 21–28. <https://doi.org/10.1007/BF02492593>
- Sgarbi, F. C., Bertini, F., Tera, T. D. M., & Cavalcante, A. S. R. (2010). Morphology of collagen fibers and elastic system fibers in actinic cheilitis. *Indian Journal of Dental Research*, 21(4), 518–522. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.74224>
- Shi, X., Young, C. D., Zhou, H., & Wang, X. (2020). *Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts*. 3(Figure 1), 1–22.
- Stenbäck F, Mokinen MJ, Tommi J, Kowppilas S, Juha R, Talue L et al. The extracellular matrix in skin tumor development – a morphological study. *J Cut Pathol*. 1999 26(7), 327-38.
- Tominaga, K., & Suzuki, H. I. (2019). TGF- $\beta$  signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205002>
- Trautinger, F. (2001). Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology*, 26(7), 573–577. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2001.00893.x>

- Varani, J., Perone, P., Fligiel, S. E. G., Fisher, G. J., & Voorhees, J. J. (2002). Inhibition of Type I procollagen production in photodamage: Correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *Journal of Investigative Dermatology*, *119*(1), 122–129. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01810.x>
- Walther, U., Kron, M., Sander, S., Sebastian, G., Sander, R., Peter, R. U., Meurer, M., Krähn, G., & Kaskel, P. (2004). Risk and protective factors for sporadic basal cell carcinoma: Results of a two-centre case-control study in southern Germany. Clinical actinic elastosis may be a protective factor. *British Journal of Dermatology*, *151*(1), 170–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06030.x>
- Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, *45*(4–5), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>
- Wolff, K.-D., Follmann, M., & Nast, A. (2012). The Diagnosis and Treatment of Oral Cavity Cancer. *Deutsches Ärzteblatt Online*, *109*(48). <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0829>
- Wondrak, G. T., Roberts, M. J., Cervantes-Laurean, D., Jacobson, M. K., & Jacobson, E. L. (2003). Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells. *Journal of Investigative Dermatology*, *121*(3), 578–586. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12414.x>
- Yaar, M., & Gilchrist, B. A. (2007). Photoageing: Mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology*, *157*(5), 874–887. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08108.x>
- Yano, K., Kadoya, K., Kajiya, K., Hong, Y. K., & Detmar, M. (2005). Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and by downregulation of thrombospondin-1. *British Journal of Dermatology*, *152*(1), 115–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06368.x>
- Yu, Y; Xiao, C-H; Tan, L-D; Wang, Q-S; Li, X-Q; Feng, Y-M (2013). Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling. *British Journal Of Cancer*, *110*(3), 724-732.

Zini, A., Czerninski, R., & Sgan-Cohen, H. D. (2010). Oral cancer over four decades: Epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 39(4), 299–305. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00845.x>

## **7 CONCLUSÃO GERAL**

Este estudo promove evidências sobre o possível papel dos miofibroblastos, das fibras colágenas e das áreas de elastose no processo de carcinogênese de lábio.

1. Em QAs, observou-se um aumento de miofibroblastos, bem como uma associação dessas células (em áreas sem elastose) com expansão vertical da elastose solar.
2. Em QAs, a proximidade das áreas de elastose ao epitélio displásico está associada à presença de displasias de alto risco e que as áreas de elastose apresentam menor percentual de colágeno, menor imunoe expressão de TGF- $\beta$  e maior densidade de fibras elásticas que as áreas sem elastose solar.
3. Em CCEs, ao passo que foi observado um aumento de miofibroblastos  $\alpha$ -AML+, foram visualizadas de forma inversamente proporcional perda colagênica total, principalmente, do colágeno tipo I, assim como de fibras elásticas na região do front tumoral.
4. Finalmente, observou-se que a perda colagênica e de densidade de fibras elásticas foi significativamente maior em tumores agressivos e como metástase nodal.

## Tabelas

**Tabela 5** Perfil de imunexpressão para Ki-67,  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$  bem como da porcentagem de fibras colágenas e densidade de fibras elásticas em LSs, QAs e CCELS.

	<b>Ki-67</b>	<b><math>\alpha</math>-AML</b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Colágeno total (%)</b>	<b>Colágeno tipo I (%)</b>	<b>Colágeno tipo III (%)</b>	<b>Densidade de fibras elásticas(<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>
<b>Tecido</b>							
Lábio (n=15)	1.20 $\pm$ 0.86	0.18 $\pm$ 0.42	54.72 $\pm$ 19.70	40.96 $\pm$ 16.53	9.24 $\pm$ 6.57	31.72 $\pm$ 12.89	2331.74 $\pm$ 1290.19
Queilite (n=30)	9.82 $\pm$ 4.65*	10.86 $\pm$ 15.90*	39.12 $\pm$ 11.53	44.39 $\pm$ 10.02	8.58 $\pm$ 5.21	35.81 $\pm$ 9.19	3345.49 $\pm$ 1754.66
CEC (n=30)	9.10 $\pm$ 9.59*	7.21 $\pm$ 11.61*	40.70 $\pm$ 23.65	33.40 $\pm$ 12.72* <sup>†</sup>	3.67 $\pm$ 2.70* <sup>†</sup>	29.73 $\pm$ 11.24	4540.55 $\pm$ 6113.62
<b>p-Valor</b>	<b>0,004</b>	<b>0,034</b>	0,104	<b>0,009</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,149	0,488

p<0,05\* *versus* LSs; <sup>†</sup>p<0,05 *versus* QAs.

Teste Kruskal-Wallis/Dunn (média  $\pm$  DP).

**Tabela 6** Influência de características clinicopatológicas de CCELS na imunexpressão de Ki-67,  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$  bem como na porcentagem de fibras colágenas e densidade de fibras elásticas em áreas de *front* tumoral.

	<b>Ki-67</b>	<b><math>\alpha</math>-AML</b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Colágeno total (%)</b>	<b>Colágeno tipo I (%)</b>	<b>Colágeno tipo III (%)</b>	<b>Densidade de fibras elásticas(<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>
<b>Estadiamento T</b>							
T1/2 (n=25)	8.19 $\pm$ 10.77	49.58 $\pm$ 13.07	4.60 $\pm$ 2.74	29.50 $\pm$ 13.57	3.30 $\pm$ 1.97	26.20 $\pm$ 12.05	4012.53 $\pm$ 2237.70
T3/4 (n=6)	20.57 $\pm$ 21.93	41.32 $\pm$ 32.29	7.31 $\pm$ 7.46	27.19 $\pm$ 13.84	1.49 $\pm$ 1.38	25.70 $\pm$ 12.52	1038.65 $\pm$ 1004.00*
<b>p-Valor</b>	0,300	0,610	0,467	0,809	0,148	0,953	<b>0,045</b>
<b>Estadiamento N</b>							
N0 (n=28)	6.82 $\pm$ 10.20	39.11 $\pm$ 20.74	5.34 $\pm$ 2.91	29.43 $\pm$ 13.86	3.09 $\pm$ 1.68	26.34 $\pm$ 12.97	4002.33 $\pm$ 2247.67
N+ (n=3)	27.43 $\pm$ 20.95*	48.59 $\pm$ 41.02	7.40 $\pm$ 10.28	20.85 $\pm$ 9.78	0.88 $\pm$ 0.68*	19.97 $\pm$ 9.17	1183.56 $\pm$ 1104.14*
<b>p-Valor</b>	<b>0,039</b>	0,611	0,616	0,366	<b>0,033</b>	0,468	<b>0,047</b>
<b>Gradação histopatológica</b>							
Baixo grau (n=22)	6.54 $\pm$ 12.50	39.84 $\pm$ 25.89	9.48 $\pm$ 10.47	31.43 $\pm$ 11.88	3.31 $\pm$ 1.59	28.12 $\pm$ 10.99	4697.32 $\pm$ 7009.84
Alto grau (n=9)	6.75 $\pm$ 8.47	39.83 $\pm$ 19.29	8.42 $\pm$ 8.28	37.27 $\pm$ 14.71	4.23 $\pm$ 4.30	33.04 $\pm$ 12.18	3589.73 $\pm$ 3082.53
<b>p-Valor</b>	0,964	0,999	0,801	0,245	0,387	0,269	0,714
<b>Invasão angiolímfática</b>							
Não (n=29)	6.64 $\pm$ 11.68	38.84 $\pm$ 24.49	9.49 $\pm$ 9.79	32.49 $\pm$ 13.00	3.71 $\pm$ 2.84	28.78 $\pm$ 11.32	4597.52 $\pm$ 6292.35
Sim (n=2)	6.26 $\pm$ 8.65	49.47 $\pm$ 2.61	0.61 $\pm$ 2.34	41.00 $\pm$ 11.09	2.67 $\pm$ 0.92	38.33 $\pm$ 10.16	3470.20 $\pm$ 2010.20
<b>p-Valor</b>	0,957	0,465	0,381	0,285	0,538	0,172	0,515
<b>Invasão perineural</b>							
Não (n=22)	7.27 $\pm$ 12.62	42.21 $\pm$ 23.39	8.05 $\pm$ 7.08	33.30 $\pm$ 13.74	4.00 $\pm$ 3.14	29.30 $\pm$ 11.62	5161.20 $\pm$ 7048.19
Sim (n=9)	4.79 $\pm$ 6.74	34.61 $\pm$ 24.11	12.56 $\pm$ 15.59	33.33 $\pm$ 11.68	2.79 $\pm$ 1.30	30.55 $\pm$ 11.55	2198.11 $\pm$ 933.44
<b>p-Valor</b>	0,604	0,405	0,297	0,995	0,254	0,782	0,323

\*p<0,05; teste Mann-Whitney (media  $\pm$  DP).

**Tabela 7** Influência de características clinicopatológicas de QAs na imunexpressão de Ki-67,  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$  bem como na porcentagem de fibras colágenas e densidade de fibras elásticas em áreas com e sem elastose solar.

	$\alpha$ -AML				TGF- $\beta$			Colágeno total (%)			Colágeno tipo I (%)			Colágeno tipo III (%)			Densidade de fibras elásticas( $\mu\text{m}^2$ )		
	Ki-67	E+	E-	p-Valor	E+	E-	p-Valor	E+	E-	p-Valor	E+	E-	p-Valor	E+	E-	p-Valor	E+	E-	p-Valor
<b>Displasia</b>	9.82 $\pm$ 4.65	10.03 $\pm$ 6.93	10.86 $\pm$ 15.90	0,824	23.07 $\pm$ 10.36	39.12 $\pm$ 11.53	<0,001*	18.02 $\pm$ 6.29	44.39 $\pm$ 10.02	<0,001*	2.06 $\pm$ 1.69	8.58 $\pm$ 5.21	<0,001*	15.96 $\pm$ 5.47	35.81 $\pm$ 9.19	<0,001*	3345.49 $\pm$ 1754.66	0.14 $\pm$ 0.09	<0,001*
<b>Gradação histopatológica</b>																			
Baixo risco (n=20)	8.82 $\pm$ 4.37	10.83 $\pm$ 7.98	11.25 $\pm$ 19.33	0,944	25.58 $\pm$ 11.21	39.59 $\pm$ 13.60	0,012*	16.72 $\pm$ 6.78	44.58 $\pm$ 10.50	<0,001*	1.85 $\pm$ 1.53	8.20 $\pm$ 4.83	<0,001*	14.87 $\pm$ 6.16	36.38 $\pm$ 8.51	<0,001*	3505.38 $\pm$ 1801.48	0.12 $\pm$ 0.08	<0,001*
Alto risco (n=10)	11.80 $\pm$ 4.95	8.31 $\pm$ 3.90	10.03 $\pm$ 3.49	0,438	17.04 $\pm$ 4.38	38.01 $\pm$ 4.61	<0,001*	20.43 $\pm$ 4.78	44.08 $\pm$ 9.87	<0,001*	2.45 $\pm$ 2.01	9.20 $\pm$ 6.07	0,015*	17.98 $\pm$ 3.38	34.88 $\pm$ 10.7	0,002*	3145.63 $\pm$ 1795.11	0.17 $\pm$ 0.11	0,002*
<b>p-Valor</b>	0,210	0,476	0,882		0,124	0,806		0,217	0,916		0,465	0,678		0,234	0,726		0,679	0,335	
<b>Idade</b>																			
Até 65(n=10)	10.70 $\pm$ 5.36	7.98 $\pm$ 4.18	7.24 $\pm$ 4.87	0,734	23.29 $\pm$ 7.02	40.26 $\pm$ 6.65	0,001*	20.29 $\pm$ 7.88	41.76 $\pm$ 10.44	<0,001*	1.79 $\pm$ 1.61	7.13 $\pm$ 3.81	0,002*	18.50 $\pm$ 6.60	34.62 $\pm$ 9.15	0,001*	3598.02 $\pm$ 2059.53	0.18 $\pm$ 0.10	0,001*
>65(n=20)	8.94 $\pm$ 3.95	11.89 $\pm$ 8.52	14.13 $\pm$ 21.44	0,762	22.92 $\pm$ 12.57	38.33 $\pm$ 14.33	0,020*	16.50 $\pm$ 4.74	46.37 $\pm$ 9.66	<0,001*	2.24 $\pm$ 1.78	9.67 $\pm$ 5.98	<0,001*	14.26 $\pm$ 4.01	36.70 $\pm$ 9.53	<0,001*	3092.97 $\pm$ 1468.80	0.10 $\pm$ 0.07	<0,001*
<b>p-Valor</b>	0,439	0,230	0,360		0,944	0,746		0,194	0,308		0,575	0,281		0,089	0,621		0,558	0,052	
<b>Sexo</b>																			
Feminino (n=13)	9.46 $\pm$ 4.33	6.59 $\pm$ 3.33	6.45 $\pm$ 4.34	0,935	20.86 $\pm$ 7.38	36.30 $\pm$ 8.92	<0,001*	18.63 $\pm$ 8.07	45.08 $\pm$ 9.41	<0,001*	2.22 $\pm$ 2.12	9.18 $\pm$ 6.89	<0,001*	16.42 $\pm$ 6.78	35.90 $\pm$ 8.56	<0,001*	4024.70 $\pm$ 1965.73	0.10 $\pm$ 0.06	<0,001*
Masculino(n=17)	10.18 $\pm$ 5.20	13.86 $\pm$ 8.03	15.77 $\pm$ 22.28	0,812	25.55 $\pm$ 13.04	42.30 $\pm$ 13.83	0,026*	17.40 $\pm$ 4.18	43.64 $\pm$ 11.11	<0,001*	1.90 $\pm$ 1.19	7.92 $\pm$ 2.58	<0,001*	15.50 $\pm$ 4.07	35.71 $\pm$ 10.3	<0,001*	2802.13 $\pm$ 1439.47	0.17 $\pm$ 0.11	
<b>p-Valor</b>	0,754	0,018	0,211		0,369	0,299		0,673	0,751		0,689			0,717	0,965		0,147	0,114	

\*p<0,05; teste Mann-Whitney (media  $\pm$  DP);

E+ = Elastose presente; E- = Elastose ausente.

**Tabela 8** Associação entre aspectos histomorfológicos e histomorfolométricos nas áreas de elastose solar em QAs em relação a gradação histopatológica de displasias epiteliais de lábio.

	Gradação histopatológica das displasias epiteliais de lábio		p-valor
	Baixo risco	Alto risco	
Grau de elastose solar (+1)	1 (7.1%)	1 (12.5%)	0,911
Grau de elastose solar (+2)	9 (64.3%)	5 (62.5%)	
Grau de elastose solar (+3)	4 (28.6%)	2 (25%)	
Distância da elastose solar ao epitélio de revestimento displásico	13.73±17.55	3.39±5.13	<b>0.028*</b>
Extensão da elastose solar	259.50±84.91	192.88±80.95	0.101
Profundidade da elastose solar	108.50±57.44	109.13±35.48	0.978

- Grau de elastose: Teste qui-quadrado de Pearson (n, %).

- Distância da elastose solar ao epitélio de revestimento displásico, extensão e profundidade da elastose solar: Teste  $p < 0.05^*$  de Mann-Whitney.

**Tabela 9** Correlação entre Correlação entre Ki-67,  $\alpha$ -AML, TGF- $\beta$ , fibras colágenas e elásticas nas amostras de CCELS.

		$\alpha$ -AML	TGF- $\beta$	Ki67	Colágeno total	Colágeno tipo I	Colágeno tipo III	Densidade de fibras elásticas
$\alpha$ -AML	r		0,201	0,104	<b>-0,376</b>	-0,248	<b>-0,374</b>	-0,149
	p-valor		0,279	0,599	<b>0,041*</b>	0,187	<b>0,041*</b>	0,478
TGF- $\beta$	r			-0,316	0,241	0,171	0,225	-0,100
	p-valor			0,095	0,183	0,349	0,216	0,634
ki67	r				-0,171	-0,046	-0,165	0,119
	p-valor				0,385	0,815	0,403	0,579
Colágeno total	r					<b>0,473</b>	<b>0,990</b>	0,215
	p-valor					<b>0,006*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	0,312
Colágeno tipo I	r						<b>0,389</b>	0,384
	p-valor						<b>0,028*</b>	0,064
Colágeno tipo III	r							0,222
	p-valor							0,297
Densidade de fibras elásticas	r							
	p-valor							

p<0,05\*, correlação de Spearman.

**Tabela 10** Correlação entre Ki-67,  $\alpha$ -AML, TGF- $\beta$ , fibras colágenas e elásticas nas amostras de QAs.

		Distância da elastose solar do epitélio de revestimento	Extensão da elastose solar	Profundidade da elastose solar	$\alpha$ -AML E+	$\alpha$ -AML E-	TGFE+	TGFE-	Ki-67	Colágeno total E-	Colágeno tipo I E-	Colágeno tipo III E-	Colágeno total E+	Colágeno tipo I E+	Colágeno tipo III E+	Densidade de fibras elásticas E-	Densidade de fibras elásticas E+
<b>Distância</b>	r	-0,026	<b>0,530*</b>	0,223	<b>0,532</b>	0,265	-0,158	-0,365	-0,046	0,074	-0,092	-0,033	-0,160	-0,093	-0,120	0,257	
<b>da elastose solar do epitélio de revestimento</b>	p-valor	0,908	<b>0,011</b>	0,359	<b>0,037*</b>	0,304	0,545	0,136	0,853	0,762	0,707	0,898	0,527	0,715	0,636	0,303	
<b>Extensão</b>	r		-0,014	0,160	-0,171	0,375	0,164	0,111	-0,264	-0,185	-0,232	-0,433	-0,003	-0,391	0,410	-0,376	
<b>da elastose solar</b>	p-valor		0,951	0,513	0,483	0,138	0,529	0,662	0,275	0,449	0,339	0,073	0,990	0,108	0,091	0,125	
<b>Profundidade</b>	r			0,201	<b>0,505</b>	0,010	-0,256	-0,099	-0,373	-0,144	-0,390	0,331	-0,175	0,365	0,188	0,173	
<b>da elastose solar</b>	p-valor			0,409	<b>0,027*</b>	0,970	0,321	0,695	0,116	0,556	0,099	0,179	0,487	0,137	0,455	0,493	
<b><math>\alpha</math>-AML E+</b>	r				<b>0,526</b>	-0,196	-0,275	-0,049	0,265	0,199	0,200	-0,280	-0,031	-0,362	-0,306	0,253	
	p-valor				<b>0,021*</b>	0,451	0,286	0,852	0,305	0,445	0,442	0,294	0,909	0,168	0,249	0,345	
<b><math>\alpha</math>-AML E-</b>	r					-0,306	-0,406	-0,118	-0,037	0,191	-0,124	-0,044	0,116	-0,172	-0,435	<b>0,532*</b>	

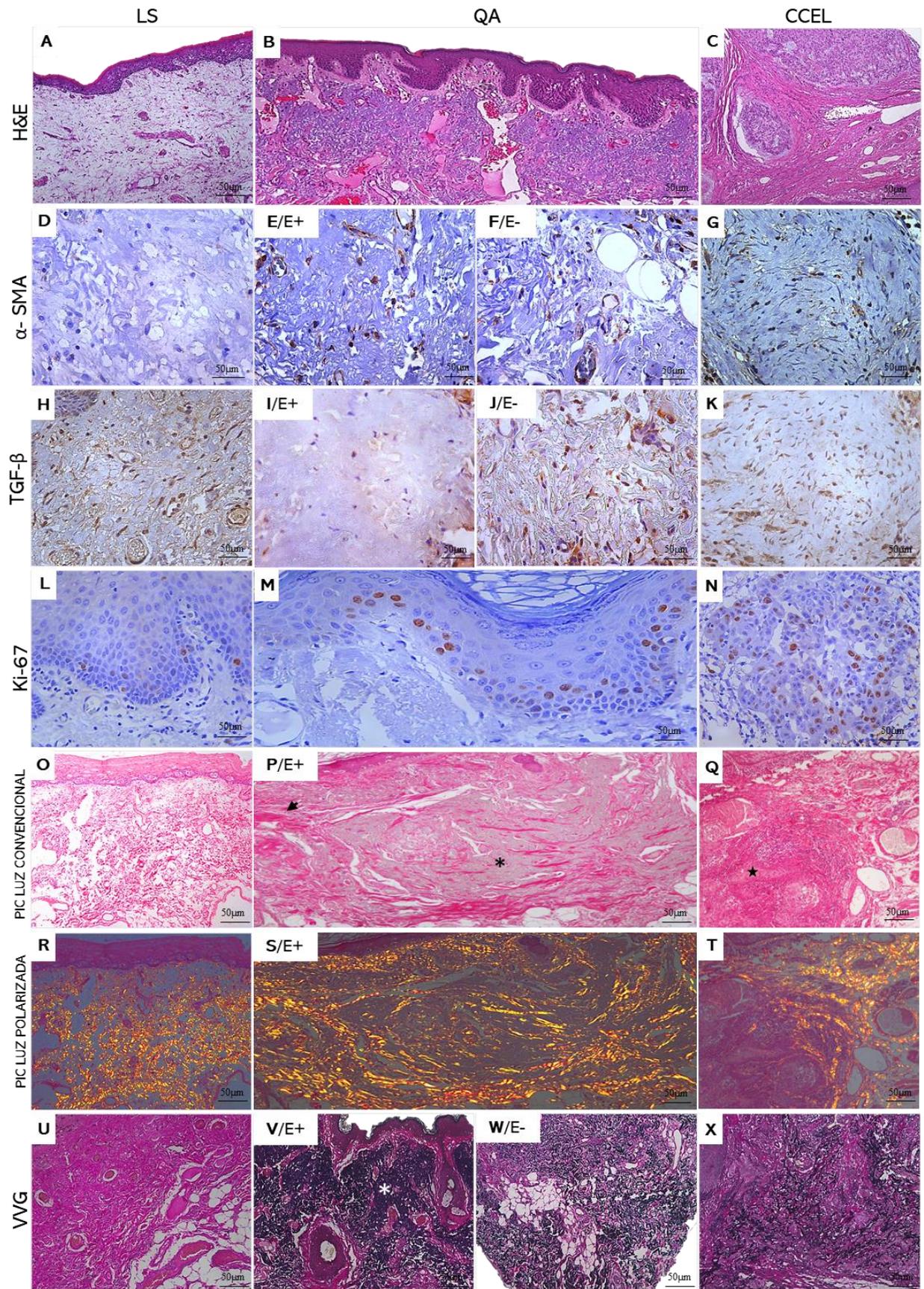
	p-valor	0,232	0,106	0,653	0,889	0,462	0,636	0,871	0,670	0,524	0,092	<b>0,034</b>
<b>TGFE+</b>	r		<b>0,560</b>	-0,382	-0,111	0,125	-0,229	-0,099	0,293	-0,174	0,132	0,082
	p-valor		<b>0,019*</b>	0,160	0,694	0,657	0,412	0,736	0,309	0,552	0,639	0,771
<b>TGFE-</b>	r			-0,116	0,122	-0,024	0,148	-0,322	0,271	-0,387	0,084	-0,041
	p-valor			0,680	0,666	0,932	0,597	0,262	0,348	0,171	0,766	0,884
<b>Ki-67</b>	r				-0,009	-0,130	0,122	0,005	-0,429	0,102	0,132	-0,124
	p-valor				0,974	0,633	0,652	0,985	0,110	<b>0,718</b>	0,625	0,649
<b>Colágeno</b>	r					0,429	0,882	0,106	0,327	<b>-0,012*</b>	<b>-0,544</b>	-0,379
<b>Total E-</b>	p-valor					0,052	1,000	0,656	0,159	0,960	<b>0,029*</b>	0,147
<b>Colágeno</b>	r						0,008	0,146	<b>0,468</b>	0,032	-0,199	0,025
<b>Tipo IE-</b>	p-valor						0,973	0,540	<b>0,037*</b>	0,895	0,460	0,927
<b>Colágeno</b>	r							0,064	0,157	-0,020	<b>-0,653*</b>	-0,276
<b>Tipo III E-</b>	p-valor							0,787	0,510	0,933	<b>&lt;0,001</b>	0,300
<b>Colágeno</b>	r								0,366	<b>0,966*</b>	-0,118	0,045
<b>Total E+</b>	p-valor								0,112	<b>&lt;0,001</b>	0,675	0,874
<b>Colágeno</b>	r									0,167	-0,296	-0,056

<b>Tipo I E+</b>	p-valor	0,482	0,284	0,843
<b>Colágeno</b>	r		-0,005	0,046
<b>Tipo III E+</b>	p-valor		0,985	0,869
<b>Densidade de fibras elásticas E-</b>	r p-valor			-0,162 0,521
<b>Densidade de fibras elásticas E+</b>	r p-valor			

p<0,05\*, correlação de Spearman; E+ = Elastose presente; E- = Elastose ausente

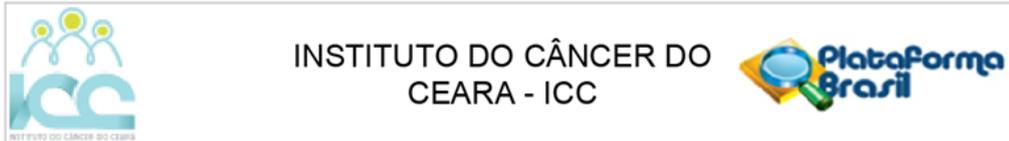
**Figura 6** Perfil Histoquímico e Imunoistoquímica em LSs, QAs e CCELS.

Microfotografias ilustrativas. LSs= Margem de ressecção cirúrgica correspondente a Lábio Sadio; QA= Queilite actínica e CCEL= *front* de invasão de carcinoma de células escamosas de lábio. Coloração de H&E (A, B e C) (100X).  $\alpha$ -AML+; imunorreatividade citoplasmática (D), área de elastose solar (E/E+) e sem elastose solar (F/E-) e (G) (400X). TGF- $\beta$ ; imunorreatividade citoplasmática em fibroblastos (H), (I/E+), (J/E-) e (K), (400x). Ki-67+; Expressão nuclear em celulares epiteliais (L, M, N) (400X). Coloração histoquímica de Picrosirius Red (PIC) sob microscopia de luz, regiões de elastose solar (asterisco), área (abundante em colágeno) sem elastose (ponta de seta) e *front* tumoral (estrela) (O, P e Q) (100x). PIC; sob luz polarizada, visualizasse colágeno tipo I (vermelho/alaranjado e tipo III amarelo/esverdeado, (T, S e R) (100x). Verhoeff Van Gieson (VVG); densidade de fibras elásticas visualizadas na coloração enegrecida, elastose solar (asterisco). (U, V/E+, W/E-, X) (100x).



FONTE: Dados da pesquisa

## ANEXO A – CONSIDERAÇÕES ÉTICAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Influência da imuno-expressão de proteínas de reparo do DNA no prognóstico e sobrevida de pacientes com câncer de boca e de orofaringe

**Pesquisador:** Paulo Gobelânio de Barros Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 70596317.6.0000.5528

**Instituição Proponente:** Instituto do Cancer do Ceara

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.191.839

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional de corte transversal, no qual serão selecionados os dados de 100 pacientes que se submeteram, no período de 01 de janeiro de 2008 a 31 de dezembro de 2014, à cirurgia de ressecção de carcinomas de células escamosas em região de boca e orofaringe sem tratamentos neoadjuvantes, no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC),

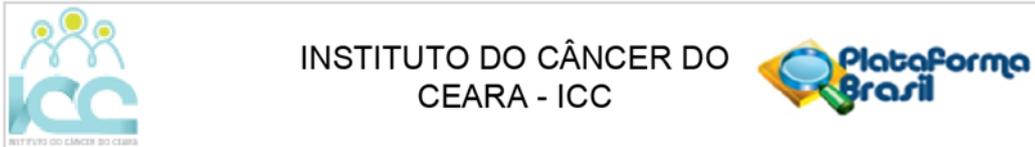
#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a influência da imuno-expressão das proteínas do reparo de DNA (imuno-marcação para MSH2,MSH6, MLH1, PMS2, PCNA e RFC) , bem como p16 e Ki67 no prognóstico e sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de boca e orofaringe diagnosticados e tratados em uma instituição terciária de referência estadual

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Há benefícios com o conhecimento científico adquirido, haja visto que o prognóstico do câncer de boca e de orofaringe são significativamente distintos o que se deve provavelmente aos seus diferentes comportamentos biológicos.Os riscos são os pertinentes ao manuseio de prontuários e informações que devem ser resguardadas.

**Endereço:** PAPI JÚNIOR, 1222  
**Bairro:** RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.430-230  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3288-4653 **Fax:** (85)3228-4653 **E-mail:** eco@icc.org.br



Continuação do Parecer: 2.191.839

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem comentários

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos presentes e adequados

**Recomendações:**

Adequar no texto divergências quando referido pacientes diagnosticados e tratados no HHJ, sendo um critério de exclusão a presença de neoadjuvância

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem comentários.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O colegiado aprova o Projeto de Pesquisa, mas com a recomendação de Adequar no texto divergências quando referido pacientes diagnosticados e tratados no HHJ, sendo um critério de exclusão a presença de neoadjuvância

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_920771.pdf	01/07/2017 21:40:26		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompleto.pdf	01/07/2017 21:39:26	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	fieldepositario.pdf	01/07/2017 21:36:40	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer.pdf	01/07/2017 21:35:15	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	01/07/2017 21:34:00	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222  
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.430-230  
 UF: CE Município: FORTALEZA  
 Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@icc.org.br



Continuação do Parecer: 2.191.839

Não

FORTALEZA, 28 de Julho de 2017

---

**Assinado por:**  
**Marcelo Gurgel Carlos da Silva**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** PAPI JÚNIOR, 1222  
**Bairro:** RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.430-230  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3288-4653 **Fax:** (85)3228-4653 **E-mail:** eco@icc.org.br

## ANEXO B – DECLARAÇÃO DE CORREÇÃO GRAMATICAL

**DECLARAÇÃO DE REVISÃO TEXTUAL**

Declaro, para os devidos fins, que realizei a revisão da dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS E COMPONENTES ESTRUTURAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR COM PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS DE QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO”**, de *Farah Essgui Orellana Martínez*, consistindo em correção gramatical, adequação do vocabulário, inteligibilidade do texto.

Fortaleza, 07 de maio de 2021.

Sinceramente,



Maria Polyanna Andrade de Alcantara  
Professora da rede estadual de ensino - SEDUC/CE  
Doutoranda em Linguística - PPGL/ UFC  
Mestre em Linguística - PPGL/ UFC (registro 8664)  
Graduada em Letras/ Português - UFC (registro 68325)