



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM ODONTOLOGIA

GABRIELA SOLEDAD MÁRDERO GARCÍA

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE IL-6, TGF- β 1 E Ki-67, DENSIDADE DE
MASTÓCITOS E COLÁGENO EM QUEILITE ACTÍNICA**

FORTALEZA

2018

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE IL-6, TGF- β 1 E Ki-67, DENSIDADE DE
MASTÓCITOS E COLÁGENO EM QUEILITE ACTÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

FORTALEZA

2018

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)

M278a Márdero García, Gabriela Soledad.

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE IL-6, TGF-B1 E Ki-67, DENSIDADE DE
MASTÓCITOS EM QUEILITE ACTÍNICA / Gabriela Soledad Márdero García. – 2018.
72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

1. Queilite Actínica. 2. Imunohistoquímica. 3. Câncer. 4. Progressão Tumoral. I. Título.

CDD 610.73

Dedico este trabajo a mis padres: Arturo y Sol, por apoyarme y acompañarme en una aventura más de este hermoso viaje que se llama vida.

A mis hermanos: Nice y Artur, por creer en mí y siempre alentarme a alcanzar todos mis sueños.

Y a Gustavo por ser mi compañero en esta y muchas otras jornadas.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dr. Ana Paula Negreiros Nunes Alves que me acolheu e guiou. Obrigada pela paciência, dedicação e por me ajudar a conduzir este estudo, agradeço pelos ensinamentos científicos e da vida, além da paciência, sinceridade, generosidade e compreensão nos momentos mais complicados. É realmente uma honra tê-la como orientadora.

A todos os outros professores e colegas da Disciplina de Estomatologia por me proporcionarem tanto conhecimento, além de me ensinarem muito, direta ou indiretamente, através de seus trabalhos científicos. Suas participações foram fundamentais nesta pesquisa, muito obrigada.

Aos meus amigos de dentro e de fora do meio acadêmico, que, cada um à sua maneira, contribuíram para que este trabalho fosse concluído em forma de apoio, compreensão, carinho, paciência e companheirismo

À Universidade Federal do Ceará que me proporcionou toda estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa, dando a oportunidade para minha formação científica.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo durante este trabalho.

À OEA (Organização dos Estados Americanos) pela oportunidade de vir ao Brasil para continuar meu crescimento acadêmico e pessoal.

RESUMO

Queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente maligna oral associada à exposição crônica à radiação ultravioleta com elevado potencial de transformação em câncer de lábio. Foi objetivo desta pesquisa avaliar a imunexpressão de IL-6, TGF- β 1 e ki-67, além da densidade de mastócitos e colágeno em queilites actínicas. Para isso, foram utilizados um total de 50 blocos parafinados, sendo 25 de lesões diagnosticadas como QA e 25 de mucosa normal de lábio a partir de amostras de mucocele arquivados no Laboratório de Patologia Bucal. Foram realizados 5 cortes de cada amostra: 3 para reação de imuno-histoquímica através da técnica da estreptavidina-biotinilada para a detecção de IL-6, TGF- β 1 e Ki-67; 2 cortes para exame histoquímico, sendo 1 corte para a detecção de mastócitos pela coloração de Azul de Toluidina, e 1 corte para a avaliação de colágeno total e com birrefringência amarelo/avermelhada pelo método de *Picrosirius Red*. Para avaliação microscópica foram fotografados 5 campos (400x) para contar as células que apresentavam positividade citoplasmática e/ou nuclear para os anticorpos primários elencados, de mesma forma para contar os mastócitos e medir a porcentagem de colágeno total e com birrefringência amarelo/avermelhada através do software Image J®. Considerou-se a soma dos campos marcados de cada lâmina como unidade amostral, sendo submetida à análise quantitativa. Observou-se maior prevalência de QA no sexo masculino (80%) e média de idade de 54 ± 16 anos com maior ocorrência de displasia leve (68%) do que moderada/severa (32%) além de maior imunomarcagem estatisticamente significativa para todos os anticorpos e do número de mastócitos no grupo QA comparado com o grupo controle ($p=0,05$). IL-6 e Ki-67 mostraram correlação com a disqueratose ($p=0,045$), sendo que este último evidenciou associação no estroma com IL-6 e a porcentagem de colágeno total. O TGF- β 1 mostrou marcação nuclear significativa no grupo controle ($p=0,042$) e correlação com o percentual de colágeno total. Conclui-se que há maior imunexpressão de IL-6, TGF- β 1 e ki-67, bem como maior densidade de mastócitos nas amostras de Queilite actínica, no entanto de forma independente de sua localização de marcação e sem associação com os diferentes graus de displasia.

PALAVRAS CHAVE: Queilite actínica; Imuno-histoquímica; Câncer; Progressão Tumoral

ABSTRACT

Actinic cheilitis (AC) is a potentially malignant oral lesion associated with chronic exposure to ultraviolet radiation with high potential of transformation into lip cancer. The aim of this study was to evaluate the immunoexpression of IL-6, TGF- β 1 and ki-67 in addition to the density of mast cells and collagen in actinic cheilitis. A total of 50 paraffin blocks were used, 25 of which were diagnosed as AC and 25 of normal lip mucosa from mucocele samples, all of them stored in the Oral Pathology Laboratory. Five cuts of each sample were made; 3 for immunohistochemical reaction by the biotinylated streptavidin technique for the detection of IL-6, TGF- β 1 and Ki-67. 2 sections for histochemical examination; 1 cut for the detection of mast cells by Toluidine Blue staining and 1 cut for the evaluation of total collagen and with yellow/red birefringence by the Picrosirius Red method. For microscopic evaluation 5 fields (400x) were used to count cells that present cytoplasmic and/or nuclear positivity in the primary antibodies listed. In order to count the mast cells and to measure the percentage of total collagen and with yellow/red birefringence Image J® software was used. The sum of the marked fields of each slide was considered as sample unit and then, submitted to quantitative analysis. There was a higher prevalence of AC in males (80%) with mean age of 54 ± 16 years and greater occurrence of mild (68%) than moderate (32%) dysplasia, and a higher statistically significant immunostaining for all antibodies and the number of mast cells in the AC group compared with the normal epithelium ($p=0.05$). IL-6 and Ki-67 showed correlation with dyskeratosis ($p=0.045$). Ki-67 also manifested a correlation in the stroma with IL-6 and the percentage of total collagen. TGF- β 1 showed significant nuclear marking in the control group ($p=0.042$) and exhibited correlation with the percentage of total collagen. It is concluded that there is a greater immunoexpression of IL-6, TGF- β 1 and ki-67, as well as higher mast cell density in the actinic cheilite samples, however independently of their marking location and without association with the different degrees of dysplasia.

KEY WORDS: Actinic Cheilitis; Immunohistochemistry; Cancer; Tumor Progression.

LISTA DE TABELAS

Quadro 1- Especificidade, clone, diluição, recuperação antigênica e sítio de marcação dos anticorpos primários propostos.....	27
Tabela 1- Avaliação microscópica das alterações celulares e arquiteturais em queilites actínicas.....	32
Tabela 2- Perfil de imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em queilites actínicas e epitélio normal.....	35
Tabela 3- Influência da gradação histológica da displasia no perfil de imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em queilites actínicas.....	36
Tabela 4- Influência do sexo e da idade no perfil de imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em queilites actínicas.....	37
Tabela 5: Influência das alterações microscópicas celulares e arquiteturais no perfil de imunexpressão para IL-6, TGF- β e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em queilites actínicas.....	39
Tabela 6: Análise de correlação entre a imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em mucosa normal.....	41
Tabela 7: Análise de correlação entre a imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em queilites actínicas.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** : Esquema de análise de correlação de resultados entre a imunoexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em queilites actínicas e no grupo controle..... 43
- Figura 2-** : Painel de imunomarcção dos anticorpos IL-6, TGF- β 1 e Ki-67 em mucosa normal e displasias leve e moderada/severa do grupo Queilite actínica..... 44
- Figura 3-**: Painel de marcação histoquímica para detecção de mastócitos pelo método de azul de toluidina e colágeno pelo método de picrosirius red em mucosa normal e displasias leve e moderada/severa em quelites actínicas..... 45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A^o Ângstrons

B/A Birrefringência Amarelada

CEC Carcinoma de Células Escamosas

DE Displasia Epitelial

DPM Desordens potencialmente malignos

Fase G₀ Intervalo de latência no qual as células se encontram fora do ciclo celular

Fase G₂ Fase da Interfase ciclo celular

Fase S Fase do ciclo celular de duplicação do DNA

Fase M fase do ciclo celular denominada mitose

H/E Hematoxilina e Eosina

INCA Instituto Nacional do Câncer

IL-6 Interleucina 6

Ki-67 Antígeno proliferação celular

MCs Mastócitos

MEC Matriz extracelular

MMP-2 Metaloproteinase 2

OMS Organização Mundial de Saúde

QA Queilite actínica

RUV Radiações ultravioleta

RUVA Radiações ultravioleta A

RUVB Radiações ultravioleta B

RUVC Radiações ultravioleta C

TEM Transição epitélio/mesenquimal

TGF β Fator Transformador de Crescimento beta

TGF β 1 Fator Transformador de Crescimento beta 1

TGF β 2 Fator Transformador de Crescimento beta 2

TGF β 3 Fator Transformador de Crescimento beta 3

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Colágeno.....	17
1.2. Mastócitos.....	19
1.3. IL-6.....	20
1.4. Ki-67.....	21
1.5. TGF- β 1.....	22
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1. Tipo de estudo	24
3.2. Calculo amostral.....	24
3.3. Amostra do estudo.....	25
3.4. Análise Morfológica.....	25
3.5. Análise Histológica.....	26
3.6. Análise Imuno-histoquímica.....	27
3.7. Análise Histoquímica do Picrosirius Red.....	28
3.8. Análise Histoquímica do Azul de Toluidina.....	30
3.9. Análise estatística.....	30
4. ASPECTOS ÉTICOS.....	31
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Análise Histológica.....	32
5.2 Análise Imuno-histoquímica.....	33
5.3 Análise de Picrosirius red.....	34
5.4 Análise da densidade de Mastócitos (Azul de Toluidina).....	34
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	57
9. ANEXO.....	70

1. INTRODUÇÃO

Do grego *Keilos*, que significa lábios, deriva a palavra “Queilite”, ou processo inflamatório dos lábios, já a palavra “Actínica” refere-se à ação de raios ativos quimicamente do espectro eletromagnético (PICCELLI, 2008). A Queilite actínica (QA) representa uma alteração multifatorial com relevante importância clínica por formar parte do grupo de desordens potencialmente malignos (DPM) junto com a eritroplasia e leucoplasia com displasia epitelial. Estas podem permanecer estáveis por um considerável período de tempo antes de evoluir, ou não, para malignidade e invasão. O percentual de DPM que sofre transformação maligna varia de 0,13 a 50% podendo se tornar um carcinoma de células escamosas do lábio (CEC) em um espaço de tempo aproximado de 1 a 20 anos. (AYERS JR, 1923; HUBER, TEREZHALMY, 2006; HEGARTY, HUNTER, 2016).

Clinicamente, apresenta-se de duas formas: aguda e crônica. A QA aguda é caracterizada pela formação de bolhas que desaparecem espontaneamente em poucos dias ou semanas, podendo resultar em ressecamento persistente e descamação, porém na maioria dos casos regridem completamente. (AYERS JR, 1923).

Na QA crônica, o vermelhão apresenta placas de hiperqueratose entremeadas por áreas irregulares de eritema. Descamação persistente e sensação de *secura* podem estar presentes e representarem um problema para o paciente. Há perda da linha de demarcação entre o vermelhão do lábio e a pele. O tecido da pele imediatamente abaixo do lábio se torna espesso resultando na perda da concavidade normal dessa área. Com o tempo esse espessamento se torna mais pronunciado, o eritema se torna mais evidente, a hiperqueratose fica pronunciada e pequenas úlceras podem se formar e tornarem-se lentas na reparação. Alguns pacientes apresentam sensação de formigamento ou queimação (CINTRA, 2013; SANTANA, 2013).

As principais características histológicas dessa lesão são a presença de epitélio escamoso estratificado hiperplásico ou atrófico, onde a hiperqueratose e a acantose são achados universais, com a presença de orto e/ou paraqueratinização, com diferentes tipos de displasia, mostrando desordem na maturação, com vários graus de queratinização, atipias celulares e aumento da atividade mitótica. O tecido conjuntivo geralmente mostra desintegração das fibras colágenas, produto da ação dos raios U.V., degeneração basófila do colágeno pelo acúmulo de substância acelular e elastose (SANTOS *et al.*, 2003). Pode-se encontrar vasodilatação superficial e profunda, além da presença de um infiltrado inflamatório crônico de intensidade variável de leve a intenso, composto, predominantemente, por linfócitos e poucos plasmócitos (MARTINS, 2011).

A QA apresenta uma estreita relação etiopatogênica com a exposição solar prolongada e tem grande importância diante dos aspectos climáticos e socioeconômicos do Brasil, mais especificadamente da região Nordeste. Por apresentar uma economia baseada na agricultura, pecuária e pesca, acaba expondo seus trabalhadores continuamente aos raios solares (SALVADORI *et al.*, 2014). Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2016, 11.140 casos novos de câncer na cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2016). Porém, a probabilidade de malignização pode ser ainda mais elevada quando é associada a outros fatores carcinogênicos, como o álcool, o fumo, predisposição genética, tratamento com imunossuppressores, ocupação, atividades e latitude geográfica de residência (PIRES *et al.*, 2001; CAVALCANTE *et al.*, 2008).

Essa alteração afeta predominantemente homens de pele clara a partir da sexta década de vida, variando na incidência entre os 40-80 anos. Raramente é reconhecida com preocupação em estágios iniciais e, devido a sua evolução lenta, o paciente relaciona o processo como uma decorrência da idade, por isso negligencia-o até alcançar estágios mais avançados, possibilitando a ocorrência de neoplasia (MAIN, PAVONE, 1994).

A QA se manifesta principalmente no lábio inferior em mais de 90% dos casos, afetando-o parcial ou totalmente por permitir uma maior incidência dos raios solares. Os lábios compõem-se de uma semimucosa que apresenta características próprias que fazem com que os processos reacionais não se comportem nem como mucosa nem como pele, estes incluem uma menor espessura de queratina na região, toda a camada epitelial delgada, pouca quantidade de melanina e secreção diminuída de glândulas sebáceas e sudoríparas, ou seja, mecanismos envolvidos normalmente na proteção da pele contra a radiação (KAUGARS, 1999; BENTLEY, 2003). Os lábios ainda são compostos por músculos estriados, que lhes conferem os movimentos, e tecido conjuntivo. Essa disposição anatômica faz com que o vermelhão seja visível, assim como também frequentemente afetado pelo meio ambiente, neste caso, a radiação solar (ZUGERMAN, 1986).

O espectro da radiação eletromagnética é dividido em radiação gama, raios x, radiação ultravioleta (UV), luz visível, radiação infravermelha, micro-ondas e rádio. O comprimento de onda da luz visível varia entre 400 a 780nm, já o comprimento de onda da radiação UV está entre 100 a 400nm, sendo que ela chega à superfície da Terra com comprimentos de onda entre 280 a 380nm (OKUNO *et al.*, 2005).

As radiações ultravioletas (RUV) são subdivididas de acordo com o comprimento de onda em radiações ultravioleta A (RUVA) de 315 a 400nm, ultravioleta B (RUVB) de 280 a 315nm e ultravioleta C (RUVC) de 100 a 280nm. As RUVC são basicamente germicidas, pelo fato de serem absorvidas principalmente por aminoácidos e proteínas constituintes das membranas e paredes celulares de micro-organismos (GALLAGHER *et al.*, 2006).

As RUVA penetram profundamente na pele, sendo responsáveis pelo fotoenvelhecimento, têm como principal característica a capacidade de promover o bronzeamento pigmentar imediato pela foto oxidação da melanina pré-formada e a transferência de melanina dos melanócitos para os queratinócitos. As RUVB são

responsáveis pelo bronzeamento pigmentar tardio decorrente do aumento na atividade dos melanócitos, tanto no que diz respeito ao seu número como no tamanho celular, ocasionando assim a produção de melanina. Este tipo de radiação causa alterações patológicas no epitélio e é o principal responsável pelas queimaduras na pele e alterações do DNA (AGAR *et al.*, 2004; HUBER, TEREZHALMY, 2006).

A exposição contínua à radiação solar acumula e agrava os danos moleculares, dependendo das variáveis de tempo, dose, frequência da exposição, além da sensibilidade das células expostas e da capacidade de reparo do DNA, que tem importância vital para a manutenção da integridade genética das células. Esses, dentre muitos outros danos genéticos, podem acarretar na transformação maligna dos epitélios. Sabe-se que a radiação UV pode alterar definitivamente genes responsáveis pela iniciação, promoção e progressão neoplásica (BOOTHMAN *et al.*, 1996; HUSSEIN *et al.*, 2005).

A QA é resultado da expansão clonal de queratinócitos transformados induzidos pela radiação UV-B, esses queratinócitos passam por uma transformação molecular e genética induzida pelos raios UV e tornam-se queratinócitos neoplásicos com alterações que podem causar instabilidade genômica (WOOD *et al.*, 2011). Essa radiação causa danos às fibras elásticas e produz a degeneração do colágeno, o que resulta na formação de fissuras verticais no vermelhão, resultando em edema, espessamento e menor maleabilidade do tecido (MELROSE *et al.*, 1996).

A pele, bem como a semimucosa do lábio, é capaz de iniciar a resposta do sistema imune contra antígenos externos, e um grande número de células dermais e epidermais participam dessas reações. Células de Langerhans e queratinócitos são responsáveis por iniciar a atividade imune, enquanto fibroblastos dermais, células dendríticas, mastócitos e células endoteliais mantêm e mediam a resposta imune. A exposição à radiação UV pode diretamente alterar a função destas células, resultando em supressão da resposta imune (CH'NG *et al.*, 2006).

Os cânceres induzidos por radiação UV são altamente imunogênicos e são rejeitados por um sistema imunológico competente e não comprometido pela radiação. A imunossupressão induzida por radiação, principalmente UVB, impede a destruição imunológica desses tumores (HART *et al.*, 2001).

Estes efeitos deletérios da radiação UV dependem da duração e frequência da exposição, da intensidade da radiação, latitude e das características genéticas do indivíduo, como a cor da pele principalmente, podendo desenvolver neoplasias malignas (JUCHEM, *et al.*, 1998; PARRILHA *et al.*, 2006).

A biologia molecular, juntamente com a expansão do conhecimento do genoma humano, tem ampliado o entendimento da indução de carcinogênese pela radiação ultravioleta. A luz solar age como iniciador e promotor tumoral (ZIEGLER *et al.*, 1994). A transformação maligna está associada às mutações genéticas que promovem alterações no ciclo celular. A carcinogênese ocorre em múltiplos passos, havendo acúmulo de mutações consecutivas em proto-oncogenes e supressores tumorais ou em agentes que regulam sua atuação, propiciando a proliferação desenfreada das células alteradas (HANAHAN, WEINBERG, 2000).

Quando o DNA das células da camada basal é alterado pela radiação ultravioleta, há diminuição da atividade mitótica e da capacidade de produção de queratina, produzindo o aspecto atrófico do epitélio observado na Queilite actínica. A diminuição da espessura do epitélio aumenta sua susceptibilidade ao dano causado pela radiação ultravioleta, que é lesiva e mutagênica para as células epiteliais, induzindo imunossupressão local, acelerando a degeneração senil, tornando a lâmina própria, que apoia o epitélio, acelular e amorfa com menos fibras elásticas e tecido vascular. Assim, essas alterações podem também afetar o sistema enzimático das células epiteliais, deixando-as mais propensas às alterações displásicas (CALÓ, AQUINO, 2005).

O DNA sofre ação dos diferentes tipos de radiação UV porque suas proteínas são cromóforas, ou seja, absorvem a radiação UV e sofrem a sua ação direta. A interferência da exposição solar crônica sobre o metabolismo das células, em especial os ceratinócitos e fibroblastos, gera uma sobrecarga que acaba esgotando os mecanismos celulares de defesa, quando então a célula inicia o processo de senescência. Nesta situação, o estresse oxidativo causa mutações no DNA, defeitos e alterações funcionais nas proteínas e peroxidação dos lipídios das membranas celulares, o que interfere na sua permeabilidade e acarreta em alterações no transporte e nas sinalizações transmembranas (MONTAGNER, COSTA, 2009).

A exposição excessiva à radiação solar também resulta em acúmulo de material elástico que substitui o colágeno normal, gerando elastose (ROJAS *et al.*, 2012). Todos os mecanismos envolvidos nas modificações da matriz extracelular durante fotocarcinogênese ainda não estão esclarecidos, assim como o real papel da elastose no desenvolvimento e progressão tumoral (SGARBI *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2012).

As fibras elásticas da semimucosa danificadas pela UVR sofrem alterações que resultam na acumulação de material elastótico (MIURA *et al.*, 2004). Na elastose solar as fibras do sistema elástico podem ser detectadas através de histoquímica e imuno-histoquímica.

1.1 Colágeno

Embora muitos fatores genéticos e ambientais estejam envolvidos na fotocarcinogênese (AGAR *et al.*, 2004), a evidência sugere que o microambiente do tumor é capaz de influenciar vários processos celulares, tais como crescimento, morte, diferenciação, expressão genética, migração, invasão e acumulação de material elástico em tecidos, a qual substitui o colágeno normal e leva à elastose que começa, frequentemente, na junção das áreas papilar e reticular da mucosa ou derme. Isto é caracterizado pelo acúmulo de massas emaranhadas de fibras elásticas distróficas, tropoelastina desorganizada e fibrilina, aumentando a

quantidade de substância fundamental resultante da degradação do colágeno (HART *et al.*, 2004; HUSSAIN *et al.*, 2007; HUBER *et al.*, 2010).

O tecido conjuntivo consiste em fibras colágenas e elásticas dentro da substância fundamental e todos são formados pelos fibroblastos (LEVER *et al.*, 1991). Os fibroblastos mostram características de uma célula que sintetiza ativamente, pois possuem um retículo endoplasmático rugoso com material amorfo ou granuloso fino que é excretado no espaço extracelular; assim, o material elastótico é formado como resultado de uma função alterada dos fibroblastos, que não são mais capazes de produzir fibras elásticas e colágenas normais. Portanto, esse material não é um produto da degeneração das fibras elásticas pré-existentes (LEVER *et al.*, 1991).

O colágeno, especificamente, é formado por fibrilas e microfibrilas que originam as fibras com diâmetro variável e presentes sob a forma de uma rede delicadamente trançada ou de feixes espessos encontrados na camada papilar da mucosa ou da derme. São birrefringentes, pois são constituídas por moléculas alongadas e paralelas, desse modo, quando examinadas ao microscópio de polarização aparecem brilhantes contra um fundo escuro (JUNQUEIRA *et al.*, 1995).

Vistos através de um microscópio óptico, as fibras de colágeno mostram-se acidófilas com hematoxilina e eosina; eles são de cor azul com a técnica tricrômica de Masson e verde com a técnica tricrômica de Mallory (SAMAR *et al.*, 2004). Mas esses métodos de tingimento não diferenciam os diferentes tipos de colágeno. Por outro lado, a coloração com *Picrosirius red* e sua posterior análise com microscopia de polarização nos permite demonstrar seletivamente diferentes tipos de colágeno (COLEMAN, 2011).

Com a técnica de *Picrosirius red* após polarização, as fibras de colágeno I e III mostram birrefringências diferentes graças às suas unidades submicroscópicas que se orientam em direção ao eixo da fibra (LÓPEZ-MÍNGUEZ *et al.*, 2006).

1.2 Mastócitos

Os mastócitos foram descritos pela primeira vez em 1878 quando Paul Ehrlich, ainda estudante de Medicina, descobriu que algumas células, chamadas plasmócitos pelos histologistas, em determinado momento se enchem de grânulos que se coravam de vermelho quando tratados com um corante azul de anilina básica (MOTA, 1995). Desta forma ficou definida a diferença entre os plasmócitos e as células que se coravam metacromaticamente, a partir daí chamadas de mastócitos (Mastüing). A metacromasia é uma resposta à interação do corante com a heparina ácida, um constituinte dos grânulos dos mastócitos (KRISHNASWAMY *et al.*, 2001). Para evidenciar a metacromasia, utiliza-se a técnica do azul de Toluidina (AT), descrita por Luna (1968).

Os mastócitos (MCs) são células derivadas da medula óssea, reguladores cruciais da inflamação e da resposta imune, por liberar diversas substâncias bioativas que estão presentes próximas a vasos, nervos, áreas de inflamação e locais de desenvolvimento neoplásico, nos quais desempenham papel chave em múltiplos processos fisiológicos, imunológicos e patológicos (CRIVELATTO, 2008). A radiação UV é capaz de induzir os MCs a sintetizar e liberar substâncias capazes de modular, direta ou indiretamente, a produção e degradação de matriz extracelular, além de participarem diretamente da angiogênese, eventos importantes no processo de progressão do Carcinoma de Células Escamosas (CEC) (LEES *et al.*, 1994; KAARSEN *et al.*, 1995; NISHIKORI *et al.*, 1998; CRIVELATTO *et al.*, 2008).

Os mastócitos também sintetizam e liberam um painel de citocinas multifuncionais como a IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, TNF α (Fator de Necrose Tumoral alfa), GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia do Macrófago e Granulócito) e também alguns dos mais poderosos fatores de crescimento como o bFGF (Fator de Crescimento Básico do Fibroblasto), o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e o TGF- β (Fator de Crescimento Transformador beta), além de quimiocinas como MIP-1 α (Proteína Inflamatória do Macrófago 1 alfa), MCP-1

(Proteína Quimiotática do Monócito 1) e RANTES (Regulador da Ativação Normal de Célula T Expressa e Secretada) (AOKI *et al.*, 2003).

Estas citocinas não apenas regulam a produção de IgE e outras respostas imunes, mas também atuam na inflamação, na homeostase, na hematopoiese, na angiogênese, na remodelagem tissular e no desenvolvimento ou resistência a tumores (GALLI, *et al.*, 1995; LICHTENBELD, *et al.*, 1996).

1.3 Interleucina 6

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória secretada e produzida por diferentes tipos de células, sendo os monócitos, fibroblastos e células endoteliais suas principais fontes. Tem capacidade de alterar a morfologia das células e modular a migração celular e epitelial. Está ligada à sobre-regulação de proteases, tais como a cisteína, catepsina e metaloproteinase da matriz que são conhecidas por desempenhar um papel na progressão do câncer. Além disso, promove as vias de sinalização que terminam com a ativação de fatores de transcrição associadas com a sobrevivência e a proliferação das células. Estas ações podem sugerir que a IL-6 seja um importante mediador de acontecimentos envolvidos na invasão de células tumorais (STUDEBAKER *et al.*, 2008).

As citocinas são peptídeos reguladores-chave do processo inflamatório, exercendo funções pró e anti-inflamatórias. São produzidas como uma resposta do hospedeiro ao estresse celular causado tanto por agentes endógenos ou exógenos para controlar e minimizar os danos celulares (LIN, 2007). Esses mediadores são associados, também, a um risco aumentado no desenvolvimento do câncer. Apesar da maioria desses mediadores serem produzidos com a função de ativar o sistema imune contra o tumor, eles podem estimular o crescimento deste. Uma descontrolada e sustentada produção de citocinas pode conduzir ao crescimento celular alterado, diferenciação celular e evasão da apoptose (HUSSAIN, 2007).

Yang *et al.* (2000) relatam que estímulos crônicos e excessivos por meio de citocinas em neoplasias promovem a transformação celular oncogênica.

Acrescenta-se o fato de que a interação de citocinas com seus receptores é importante em diversos processos relacionados a tumores, como crescimento de células tumorais, angiogênese, invasão local e metástases. Mediante a liberação de estímulo à angiogênese e proliferação celular, as citocinas estão diretamente envolvidas na transformação, sobrevivência e crescimento de células tumorais (TANAKA *et al.*, 2005).

1.4 Ki-67

A proliferação celular anormal aparece como fator precursor e pode ser um preditor na origem de tumores malignos. Dentre os marcadores de proliferação celular, o Ki-67 é tido como dos mais promissores (TUMULURI *et al.*, 2002).

O antígeno Ki-67 é utilizado como um marcador nuclear de proliferação celular para prever o estado de crescimento e comportamento agressivo potencialmente maligno em câncer oral. Esta proteína é expressa nas fases do ciclo celular G1, S, G2 e M, e está ausente nas células quiescentes ou em G0 (SALVADORI *et al.*, 2014).

A proteína Ki-67 pode estar exacerbada em células neoplásicas ou em células que perderam a capacidade de autorregulação. A medida do índice de proliferação celular pode revelar um comportamento mais agressivo por parte das neoplasias com implicações prognósticas importantes (SCHOLZEN, GERDES *et al.*, 2000).

Esta proteína está possivelmente associada ao nucléolo e aos componentes fibrilares, e ainda parece desempenhar um papel essencial na síntese de ribossomos durante a divisão celular. Estudos têm demonstrado que a expressão

imuno-histoquímica da proteína ki-67 apresenta correlação com o potencial proliferativo de tumores malignos orais (RAPIDIS *et al.*, 2009)

1.5 TGF- β 1

A família do TGF- β , ou Fator de Crescimento Transformador beta, apresenta três isoformas em mamíferos: o TGF- β 1, o TGF β 2 e o TGF- β 3 (AIGNER, BOGDAHN, 2008). O TGF- β 1 é uma citocina envolvida em muitas fases do câncer, estando relacionada com uma redução da resposta imune à estimulação da angiogênese, aumento da síntese de enzimas proteolíticas e aumento do teor de elastina (POH *et al.*, 2012; SALVADORI *et al.*, 2014).

Durante a carcinogênese, o TGF- β tem se mostrado um regulador crítico para interação tumor-estroma e invasão tumoral (OYANAGI *et al.*, 2014; CALON *et al.*, 2014). O TGF- β 1 é um potente inibidor da proliferação das células epiteliais, mas usualmente estimula o crescimento das células mesenquimais (FORINO *et al.*, 2006) e o crescimento tumoral e invasão, quando modula o microambiente tumoral e promove a formação de vasos sanguíneos e matriz, além de suprimir a resposta imune (CHEN *et al.*, 2014).

O TGF- β 1 ainda favorece um fenótipo de crescimento tumoral mais invasivo. No entanto, é descrito que nas fases iniciais da neoplasia o TGF- β 1 atua como supressor tumoral, e nos estágios mais avançados promove a progressão tumoral, metástase e transição epitélio/mesenquimal (TEM), via perda de adesão de moléculas ativadoras, angiogênese, ativação de proteinases e supressão imunológica (OYANAGI *et al.*, 2014)

Entender o comportamento biológico da QA a fim de evitar a transformação maligna é um grande desafio para os profissionais da Odontologia. Diversas técnicas foram utilizadas em estudos que se propuseram a avaliar os

padrões celulares das lesões cancerizáveis ou com potencial de transformação maligna, destacando-se a imuno-histoquímica.

A imunoexpressão de marcadores como a IL-6, Ki-67 e TGF- β 1 podem constituir importantes parâmetros no estudo da carcinogênese. Em relação às lesões com elevado potencial de malignização como QA ainda são poucos os trabalhos que fazem este estudo.

Portanto, o objetivo da presente pesquisa é realizar uma análise da expressão dessas proteínas, associando-as com a quantidade e qualidade de colágeno, presença de mastócitos, grau de displasia epitelial e as características histopatológicas de pacientes portadores de QA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a imunoexpressão de IL-6, TGF- β e Ki-67 além da densidade de colágeno e de mastócitos na Queilite actínica.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar microscopicamente as alterações celulares e citoarquiteturais das lesões diagnosticadas como QA com base nos critérios histológicos de displasia leve, displasia moderada e displasia grave ou severa.
2. Avaliar a imunoexpressão de IL-6, TGF- β 1 e Ki-67 em QA com displasia epitelial leve, displasia epitelial moderada e displasia epitelial severa.
3. Analisar a preservação do colágeno total, do colágeno com birrefringência verde/esbranquiçada e colágeno com birrefringência amarelo/avermelhada

em Queilites actínicas, correlacionando com o grau de displasia (leve, moderada e severa) e a imunoeexpressão de IL-6, TGF- β 1 e Ki-67.

4. Avaliar a densidade de mastócitos na Queilite actínica determinando sua associação com os marcadores IL-6, TGF- β 1 e Ki-67 e com o grau de displasia.
5. Correlacionar a expressão dos marcadores IL-6, TGF- β 1 e Ki-67 e densidade de mastócitos e do colágeno nas Queilites actínicas segundo as variáveis de sexo e idade.

3. Metodologia

3.1. Tipo de estudo

Estudo analítico de caráter quantitativo e qualitativo observacional de corte transversal em 50 blocos do acervo do Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2. Cálculo amostral

Com base no estudo de Rojas *et al.* (2004), que utilizou 15 casos de amostras diagnosticadas com QA e 8 amostras com mucosa normal de lábio para analisar a quantidade e distribuição de mastócitos ($P < 0,0001$), e as suas respectivas proteases triptase ($P < 0,05$) e quimase ($P < 0,05$) em comparação com mucosa normal de lábio, estima-se necessária uma amostra de 25 (vinte e cinco) casos de QA e 25 (vinte e cinco) casos de mucosa labial normal a fim de se obter um resultado que represente com 95% de confiança e 80% de poder a hipótese alternativa.

3.3. Amostra do estudo

Foram selecionados 50 blocos parafinados do acervo do Laboratório de Patologia Bucal referentes às Biópsias incisoriais de pacientes atendidos na Clínica de Estomatologia do Curso de Odontologia da UFC de lesões diagnosticadas como QA (n=25) e mucosa normal de lábio provenientes de amostras de mucocele (n=25). Informações de sexo (masculino e feminino) e de idade (considerada abaixo e acima de 55 anos) foram coletadas nos laudos histopatológicos e determinadas para as análises de correlação.

3.4. Análise morfológica

A partir das lâminas histológicas pré-selecionadas do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal – UFC, todos os casos de Queilite actínica foram revistos e submetidos à classificação do grau de displasia segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), através de microscópio óptico:

Displasia leve (grau I): Apresenta proliferação ou hiperplasia das células das camadas basal e parabasal que não se estendem para além do terço inferior do epitélio. A atipia citológica é geralmente leve com pleomorfismo moderado de células ou núcleos. As mitoses não são proeminentes, e quando presentes estão basalmente localizadas e normais, e as alterações de arquitetura são mínimas.

Displasia moderada (grau II): Apresenta uma proliferação de células atípicas que se estendem para terço médio do epitélio. As alterações citológicas são mais graves do que na displasia leve e mudanças como hiperchromatismo e pleomorfismo nuclear podem ser vistos. Aumento do número de mitoses e mitoses atípicas podem estar presentes, mas estas são geralmente localizadas nas camadas basais. Mudanças de arquitetura podem ser vistas na metade inferior do epitélio em que pode haver perda de polaridade basal e levando a hiperplasias bulbosas. No entanto a estratificação e maturação são relativamente normais, muitas vezes com hiperqueratose.

Displasia severa (grau III): Existe proliferação anormal a partir da camada basal ao terço superior do epitélio. Alterações citológicas e de arquitetura podem ser muito proeminentes. Todas as mudanças observadas na displasia leve e moderada são vistas, mas, além disso, o pleomorfismo é marcado muitas vezes com anormais núcleos grandes e nucléolos proeminentes. As mitoses suprabasais são geralmente evidentes e podem ser vistas anormalmente de forma tripolar ou estrelar. Alterações de arquitetura são graves, muitas vezes com perda completa da estratificação. Formas anormais de cristas são usuais, e consideram-se as cristas bulbosas como particularmente significativas no diagnóstico de displasia grave.

3.5. Análise Histológica

Em todos os casos de QA da amostra corados com hematoxilina-eosina foram avaliados histologicamente se há presença ou ausência das seguintes alterações celulares (Sim/Não) e arquiteturais (Sim/Não) de acordo com o grau de displasia (PILATI *et al.*, 2017)

Alterações arquiteturais

- Estratificação irregular do epitélio
- Perda de adesão
- Cristas Bulbosas
- Aumento no número de mitoses
- Mitoses atípicas
- Disceratose
- Pérolas de queratina

Alterações citológicas

- Pleomorfismo celular
- Pleomorfismo nuclear

- Ansiocitose e ansionucleose
- Aumento da relação núcleo citoplasma
- Hiper Cromatismo nuclear

3.6. Análise Imuno-histoquímica

Foram realizados 3 (três) cortes de cada amostra com 3µm de espessura em lâminas silanizadas para reação de imuno-histoquímica através da técnica da estreptavidina-biotinilada. Os anticorpos primários são: Ki-67, TGF-β1 e IL-6, e suas diluições, tipo de recuperação antigênica, sítio de marcação, fabricantes, estão sumarizados no quadro abaixo (Quadro 1). Como controle positivo para Ki-67 foi utilizado espécime de carcinoma de células escamosas orais, para o TGF-β1 e a IL-6, úlceras de mucosa oral de ratos. O cromógeno 3,3'-diamino-benzidina (DAB) foi utilizado para revelação da reação, e as lâminas foram contracoradas usando hematoxilina de Harris (30 segundos), desidratadas em concentrações crescentes de álcool, limpas em xilol, montadas com Entellan® e cobertas por lamínulas. O controle negativo foi feito através da supressão dos anticorpos primários nas suas correspondentes reações.

Quadro 1: Especificidade, clone, diluição, recuperação antigênica e sítio de marcação dos anticorpos primários propostos.

ESPECIFICIDADE	CLONE	DILUIÇÃO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	SÍTIO DE MARCAÇÃO
TGF-β1 (Abcam®)	AB-31013	1:400	Citrato pH 6.0 (30')	Citoplasmática e nuclear
IL-6 (Abcam)	AB-9324	1:300	Citrato pH 6.0 (30')	Citoplasmática e nuclear
Ki-67 (Dako®)	MIB-1	1:50	Citrato pH 6.0 (30')	Nuclear

Utilizando a microscopia de luz, com objetiva de 40 vezes, foram identificados 5 (cinco) campos com áreas de maior marcação nas lâminas correspondentes aos três anticorpos (IL-6, Ki-67 e TGF- β 1). Esses campos foram fotografados (Microscópio Motic BA310 com câmera acoplada Moticam 2000 2.0M Pixel USB 2.0 e programa Motic Plus 2.0), as imagens foram exportadas para o formato .jpeg e analisadas por meio do comando “Cell counter” do software de análise de imagem ImageJ®. Nos campos selecionados realizou-se contagem das células com marcação citoplasmática e nuclear para IL-6 e TGF- β 1 e nuclear para o anticorpo Ki-67 além de células negativas para percentual de células positivas. A soma da contagem dos cinco campos foi considerada como unidade amostral para análise quantitativa de cada marcador (adaptado de ANDRADE *et al.*, 2011).

3.7. Análise Histoquímica do *Picrosirius red*

Cortes de 3 μ m foram dispostos em lâminas de vidro e desparafinizadas em estufa a 60°C por 3h, seguido de três banhos de xilol (5 minutos cada). Após reidratação em série decrescente de álcool, as lâminas foram incubadas em solução de *picrosirius red* (ScyTek®) por 30 minutos e lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contracorados com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com Enhtellan®. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz polarizada (Leica® modelo DM 2000), o que permite visualizar o colágeno com birrefringência amarelo/avermelhada (sugestivo de colágeno tipo I), e o colágeno com birrefringência verde/esbranquiçada (sugestivo de colágeno tipo III).

Para quantificação dos diferentes tipos de colágeno, seis campos em um aumento de 200x foram fotografados através de câmera DFC 295, acoplada ao Microscópio Leica® DM 2000. As fotomicrografias foram avaliadas pelo software de análise de imagem Image J® (RSB), após calibração das imagens pelo comando *Color Thershold (Image > Adjust > Color Thersold)* na função RGB, 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).

Depois da calibração, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (*Image > Type > 8-bit*), binarizadas (*Process > Binary > Make Binary*) e mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em vermelho (*Analyse > Analyse Particles*).

Após a polarização de luz, o mesmo protocolo foi realizado ajustando-se as cores na função RGB para Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32). Após ajuste, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (*Image > Type > 8-bit*), binarizadas (*Process > Binary > Make Binary*), e mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em amarelo-avermelhado (correspondente ao colágeno tipo I). Em seguida, do total da área marcada em vermelho, foi separado um percentual da região ocupada somente pela marcação amarelo-avermelhada.

A área verde-esbranquiçada, relativa ao colágeno tipo III, foi obtida pela subtração da região total marcada em vermelho e o percentual marcado unicamente pela cor amarelo-avermelhada.

3.8. Análise histoquímica de Azul de toluidina

Cortes de 3µm dispostos em lâminas de vidro foram desparafinizados em estufa e em série alcóolica decrescente até lavagem em água corrente para retirada do excesso de álcool. Após lavagem, as lâminas foram incubadas em solução de azul de toluidina 1% por cinco minutos, lavadas rapidamente em água destilada e secas em estufa a 60°C por uma hora. Após secagem as lâminas foram para diafanização com xilol e montagem com Entellan®. (SHAKER *et al.*, 2013).

Utilizando a microscopia de luz, com objetivas de 40 vezes, as lâminas correspondentes a azul de toluidina (coloração de mastócitos) tiveram 5 campos selecionados onde foram identificadas as áreas de maior marcação. Esses campos

foram fotografados (Microscópio Motic BA310 com câmera acoplada Moticam 2000 2.0M Pixel USB 2.0 e programa Motic Plus 2.0), as imagens foram exportadas para o formato .jpeg e analisadas por meio do comando “*Cell counter*” do software de análise de imagem ImageJ®. Nos campos selecionados foram contadas as células com marcação citoplasmática violeta azulado granular (mastócitos). A soma da contagem dos cinco campos foi considerada como unidade amostral para análise quantitativa (adaptado de ANDRADE *et al.*, 2011).

3.9. Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20,0 para Windows, no qual todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95%.

A marcação para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 nas células epiteliais foi analisada na forma de percentual de células marcadas e no estroma a expressão de IL-6 e TGF- β 1 e a contagem de mastócitos foi considerada em forma de média de células por microcampo (400x), assim como a análise do colágeno que considerou o percentual médio de área corada. Em todos os casos, os dados foram expressos em forma de média e erro padrão da média e comparados por meio do teste t de *Student* e correlação linear de Pearson. Adicionalmente, as alterações microscópicas foram expressas em forma de frequência absoluta e percentual e comparado por meio do teste qui-quadrado.

3.10. Poder da amostra

O poder da presente amostra em representar a hipótese alternativa deste estudo com base na marcação para IL-6, TGF- β 1 e azul de toluidina (ver médias e EPM na Tabela 1) é 99,51%, 93,89% e 94,27%, respectivamente.

4. Considerações éticas

De acordo com a Resolução Nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, que regula pesquisas envolvendo seres humanos, a pesquisadora submeteu o projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará. Tendo sido a pesquisa iniciada somente após a aprovação desse mesmo comitê, vide Parecer: 1.817.320 em 11 de novembro de 2016. Os princípios éticos da autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade estiveram presentes em todas as etapas dessa pesquisa. (ANEXO 1)

5. Resultados

Dos 25 pacientes avaliados com Queilite actínica, 5 (20,0%) eram do sexo feminino e 20 (80,0%) do sexo masculino. A idade média dos pacientes foi de 54 ± 16 anos, oscilando entre 25 e 83 anos, havendo 12 (48,0%) dos pacientes abaixo da mediana (55 anos) e 13 (52,0%) pacientes acima da mediana de idade. Com relação à gradação histopatológica a maioria apresentava displasia leve (n=17, 68,0%), sete casos (28,0%) apresentavam displasias moderadas e apenas um caso (4,0%) displasia severa. Este último caso, displasia severa, foi incluído no grupo das displasias moderadas, o qual passou a ser identificado como moderada/severa.

5.1. Análise histológica

Quanto à avaliação microscópica das alterações celulares e arquiteturais nas amostras de Queilites actínicas, os achados foram analisados como presente ou ausente.

As alterações microscópicas significativamente mais observadas na presente amostra foram a estratificação irregular do epitélio, o aumento do número de mitoses, o pleomorfismo nuclear, a anisocitose e anisonucleose e o aumento da

relação núcleo/citoplasma observadas em todas as amostras (100%), seguido pela hipercromasia em 76% dos casos e cristas bulbosas em 60% dos casos ($p < 0,001$). As alterações menos visualizadas foram as mitoses atípicas e disceratose, observadas em 20% dos casos e perda de polaridade vista em 24% da amostra ($p < 0,001$). As pérolas de ceratina não foram observadas em nenhum caso (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação microscópica das alterações celulares e arquiteturas em Queilites actínicas.

	Alteração histológica		p-Valor
	Ausente	Presente	
Alteração arquitetural			
Estratificação irregular do epitélio	0 (0%)	25 (100%)*	<0,001
Perda de polaridade	19 (76%)*	6 (24%)	
Cristas bulbosas	10 (40%)	15 (60%)*	
Aumento do número de mitoses	0 (0%)	25 (100%)*	
Mitoses atípicas	20 (80%)*	5 (20%)	
Disceratose	20 (80%)*	5 (20%)	
Pérolas de ceratina	25 (100%)*	0 (0%)	
Alteração citológica			
Pleomorfismo nuclear	0 (0%)	25 (100%)*	
Anisocitose e anisonucleose	0 (0%)	25 (100%)*	
Aumento da relação núcleo citoplasma	0 (0%)	25 (100%)*	
Hipercromasia	6 (24%)	19 (76%)*	

* $p < 0,05$, teste qui-quadrado. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

5.2. Análise Imuno-histoquímica

Quanto ao perfil de imunexpressão, a IL-6 evidenciou maior percentual de células com marcação citoplasmática no grupo Queilite $26,48 \pm 7,29$ ($p < 0,027$) em

relação ao grupo controle $7,14 \pm 4,00$ (Tabela 2). Ao se avaliar a positividade nuclear e citoplasmática de IL-6 em relação ao grau de displasia leve e moderada/severa não se encontrou associação estatística, como também a expressão nas células estromais (Tabela 3).

Da mesma forma, o marcador TGF β -1 mostrou maior marcação citoplasmática no grupo Queilite $84,06 \pm 3,29$ do que no grupo controle $34,03 \pm 6,21$ com significância estatística ($p < 0,001$), no entanto, a expressão no núcleo foi maior no grupo controle $14,92 \pm 6,09$ do que no grupo Queilite $1,36 \pm 0,52$ com significância estatística de ($p = 0,42$). No estroma o grupo Queilite apresentou maior marcação $28,00 \pm 6,34$ do que no grupo controle $13,59 \pm 2,69$, estatisticamente significativa ($p = 0,47$) (Tabela 2). Porém, quando se relacionou a expressão de TGF β -1, independentemente de sua localização, não foi demonstrada associação com os diferentes graus de displasia (Tabela 3).

O percentual de células com marcação nuclear positiva do Ki-67 mostrou significância estatística ($p = 0,041$) no grupo Queilite $8,12 \pm 2,62$ quando comparado ao controle $3,08 \pm 0,98$ (Tabela 2), no entanto, sem associação com os diferentes graus de displasias (leve e moderada/grave) (Tabela 3).

5.3 Análise do colágeno *PicroSirius Red*

Quanto à análise do colágeno pela reação *PicroSirius Red* após polarização de luz, viu-se que não houve diferença estatística entre a expressão de colágeno com birrefringência amarelada/avermelhada (colágeno tipo I) entre o grupo controle $7,84 \pm 2,08$ e o grupo Queilite $8,48 \pm 1,35$ ($p < 0,800$). No entanto, com relação ao percentual de colágeno total do grupo controle $26,68 \pm 1,33$ e do grupo Queilite $21,98 \pm 1,21$ detectou-se uma diferença com significância estatística ($p = 0,012$) (Tabela 2).

Porém, quando se estratificou os diferentes graus de displasias (leve e moderada/severa) não se verificou nenhuma diferença entre o percentual de colágeno total e de birrefringência amarelada/avermelhada (colágeno tipo I) entre os grupos (Tabela 3).

5.4. Análise da densidade de mastócitos (Azul de toluidina)

Os resultados histoquímicos, provenientes da técnica de Azul de Toluidina, para a coloração de mastócitos mostrou-se com maior percentual de marcação no grupo Queilite $8,12 \pm 2,62$ do que no grupo controle $3,08 \pm 0,98$ com significância estatística de ($p < 0,001$) (Tabela 2).

De igual modo, a coloração de mastócitos não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grau de displasia leve e moderada/severa (Tabela 3).

Tabela 2: Perfil de imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em Queilites actínicas e epitélio normal.

	Controle	Queilite	p-Valor
IL-6			
Núcleo (%)	3,89 \pm 1,39	1,49 \pm 0,40	0,111
Citoplasma (%)	7,14 \pm 4,00	26,48 \pm 7,29	*0,027
Estroma	16,90 \pm 4,30	22,61 \pm 5,34	0,406
TGF-β1			
Núcleo (%)	14,92 \pm 6,09	1,36 \pm 0,52	*0,042
Citoplasma (%)	34,03 \pm 6,21	84,06 \pm 3,29	*<0,001
Estroma	13,59 \pm 2,69	28,00 \pm 6,34	*0,047
Ki-67			
Núcleo (%)	3,08 \pm 0,98	8,12 \pm 2,62	*0,041
Azul de toluidina			
Mastócitos	2,56 \pm 0,45	7,48 \pm 0,96	*<0,001
Picrosirius			
Total (%)	26,68 \pm 1,33	21,98 \pm 1,21	*0,012
Birrefringência amarelada/avermelhada (%)	7,84 \pm 2,08	8,48 \pm 1,35	0,800

*p<0,05, teste t de Student (Média \pm EPM).

Fonte: Acervo do Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia (UFC).

Tabela 3: Influência da gradação histológica da displasia no perfil de imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em Queilites actínicas.

	Grau da displasia		p-Valor
	Leve	Moderada Severa	
IL-6			
Núcleo (%)	1,59 \pm 0,51	1,21 \pm 0,58	0,696
Citoplasma (%)	25,80 \pm 8,78	28,52 \pm 14,10	0,876
Estroma	24,92 \pm 7,27	16,60 \pm 3,36	0,502
TGF-β1			
Núcleo (%)	1,37 \pm 0,64	1,32 \pm 0,95	0,970
Citoplasma (%)	84,00 \pm 3,87	84,25 \pm 6,90	0,975
Estroma	28,21 \pm 7,15	27,40 \pm 14,92	0,957
Ki-67			
Núcleo (%)	6,12 \pm 3,11	12,35 \pm 4,76	0,277
Azul de toluidina			
Mastócitos	7,12 \pm 1,07	8,25 \pm 2,04	0,592
Picrosirius			
Total (%)	23,08 \pm 1,62	19,66 \pm 1,34	0,194
Birrefringência amarelada (%)	9,27 \pm 1,86	6,79 \pm 1,45	0,402

*p<0,05, teste t de Student (Média \pm EPM).

Fonte: Acervo do Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia (UFC).

Em relação à influência do sexo na imunexpressão dos anticorpos estudados, somente a marcação nuclear de IL-6 mostrou significância estatística (p<0,027) quando comparado o sexo masculino (1,99 \pm 0,47) com o feminino (0,70 \pm 0,30) (Tabela 4). Por outro lado, a positividade das células do estroma para TGF β -1 apresentou significância estatística (p<0,001) para o sexo feminino (58,60 \pm 14,47) em relação ao sexo masculino (17,07 \pm 4,20) (Tabela 4).

Não foi demonstrada nenhuma associação estatisticamente significativa com a imunexpressão de IL-6, TGF β -1 e Ki-67 e a idade dos pacientes, como também a densidade de mastócitos e de colágeno total e com birrefringência amarelada/avermelhada (colágeno tipo I) não mostraram relação com idade e com o sexo na amostra avaliada (Tabela 4).

Tabela 4: Influência do sexo e da idade no perfil de imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em Queilites actínicas.

	Idade		p-Valor	Sexo		p-Valor
	Até 55 anos	Mais de 55 anos		Feminino	Masculino	
IL-6						
Núcleo (%)	1,08 \pm 0,40	2,00 \pm 0,74	0,267	0,70 \pm 0,30	1,99 \pm 0,47	*0,027
Citoplasma (%)	28,15 \pm 9,72	24,44 \pm 11,62	0,808	46,30 \pm 19,91	19,87 \pm 6,77	0,119
Estroma	21,00 \pm 4,26	24,63 \pm 11,20	0,747	38,00 \pm 17,26	16,69 \pm 2,68	0,072
TGF-β1						
Núcleo (%)	1,78 \pm 0,92	0,97 \pm 0,57	0,458	2,07 \pm 1,67	1,13 \pm 0,49	0,461
Citoplasma (%)	87,47 \pm 3,66	80,96 \pm 5,33	0,336	84,48 \pm 5,56	83,93 \pm 4,05	0,945
Estroma	32,56 \pm 11,89	23,90 \pm 5,98	0,511	58,60 \pm 14,47	17,07 \pm 4,20	*0,001
Ki-67						
Núcleo (%)	8,97 \pm 3,44	7,32 \pm 4,04	0,761	15,36 \pm 8,64	6,30 \pm 2,46	0,172
Azul de toluidina						
Mastócitos	6,67 \pm 1,56	8,23 \pm 1,17	0,426	5,60 \pm 1,54	7,95 \pm 1,13	0,337
Picrosirius						
Total (%)	21,58 \pm 1,56	22,36 \pm 1,88	0,753	23,06 \pm 2,17	21,72 \pm 1,43	0,666
BA (%)	8,05 \pm 1,46	8,87 \pm 2,27	0,768	10,24 \pm 5,11	8,04 \pm 1,20	0,524

*p<0,05, teste t de Student (Média \pm EPM). BA = Birrefringência Amarelo-Avermelhada.

Fonte: Acervo do Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia (UFC).

Avaliando a influência das alterações microscópicas celulares e arquiteturais em relação a imunexpressão de IL-6, TGF β -1 e Ki-67 foi evidenciada correlação da marcação citoplasmática de IL-6 com a presença de disceratose

($p=0,045$). Já a marcação nuclear do Ki-67 indicou associação com a disceratose ($p=0,009$) (Tabela 5).

Não obstante, na marcação de mastócitos não houve associação estatística com nenhuma das alterações microscópicas celulares e arquiteturais (Tabela 5).

Tabela 5: Influência das alterações microscópicas celulares e arquiteturais no perfil de imunexpressão para IL-6, TGF- β e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em Queilites actínicas.

	IL-6			TGF- β			Ki-67	Azul de	Picrosirius	
	Núcleo (%)	Citoplasma (%)	Estroma	Núcleo (%)	Citoplasma (%)	Estroma	Núcleo (%)	Toluidina Mastócitos	Total (%)	Birrefringência amarelada (%)
Alteração arquitetural										
Perda de polaridade	p=0,872	p=0,593	p=0,819	p=0,385	p=0,398	p=0,313	p=0,667	p=0,643	p=0,487	p=0,654
Cristas bulbosas	p=0,241	p=0,244	p=0,405	p=0,951	p=0,449	p=0,287	p=0,702	p=0,921	p=0,443	p=0,835
Mitoses atípicas	p=0,453	p=0,664	p=0,558	p=0,162	p=0,114	p=0,441	p=0,965	p=0,194	p=0,929	p=0,510
Disceratose	p=0,452	p=0,045^a	p=0,869	p=0,508	p=0,866	p=0,230	p=0,009^b	p=0,516	p=0,753	p=0,377
Alteração arquitetural										
Hipercromasia	p=0,737	p=0,776	p=0,393	p=0,363	p=0,807	p=0,667	p=0,815	p=0,991	p=0,707	p=0,624

*p<0,05, teste t de Student (Média \pm EPM). A avaliação da influência do aumento da relação núcleo citoplasma, hiperkeratose, hiperplasia celular basilar e aumento da relação núcleo citoplasma na imunomarcagem para IL-6, TGF- β e ki-67 e na densidade de mastócitos e colágeno não foi realizada porque todos os casos apresentavam essas alterações. O pleomorfismo celular e o pleomorfismo nuclear também foram visualizados em conjunto na totalidade dos casos analisados de Queilite actínica.

^aAusente (19,28 \pm 7,38) < Presente (55,26 \pm 15,78); ^bAusente (9,95 \pm 3,15) > Presente (0,76 \pm 0,22).

A análise de correlação de Pearson não mostrou associação positiva da imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 em diferentes sítios de marcação (nuclear, citoplasmática) e no estroma, e a densidade de mastócitos e de colágeno em mucosa normal (Tabela 6).

Quanto ao grupo Queilite, a imunexpressão para IL-6 e TGF- β 1 também não evidenciou associação positiva com marcação nuclear, citoplasmática e de estroma e a densidade de mastócitos e de colágeno (Tabela 7). No entanto, o anticorpo ki-67 demonstrou associação positiva com a imunexpressão de IL-6 no estroma ($p < 0,478$ $p < 0,045$) e com a porcentagem de colágeno total ($p < 0,410$ $p < 0,42$) (Tabela 7).

Tabela 6: Análise de correlação entre a imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em mucosa normal.

		IL-6			TGF- β 1			Ki-67	Azul de toluidina	Picosirius	
		Núcleo (%)	Citoplasma (%)	Estroma	Núcleo (%)	Citoplasma (%)	Estroma	Nuclear (%)	Mastócitos	Total (%)	Amarelo (%)
IL-6 núcleo (%)	r	-	-0,057	-0,193	-0,251	0,517	-0,306	-0,102	0,136	0,211	-0,053
	p-Valor	-	0,799	0,415	0,386	0,058	0,267	0,650	0,547	0,346	0,814
IL-6 citoplasma (%)	r	-	-	-0,072	-0,199	-0,091	-0,086	-0,017	0,024	-0,239	-0,066
	p-Valor	-	-	0,764	0,495	0,757	0,761	0,939	0,914	0,285	0,771
IL-6 estroma	r	-	-	-	-0,164	0,225	0,454	0,192	-0,026	-0,229	0,009
	p-Valor	-	-	-	0,611	0,483	0,119	0,417	0,912	0,332	0,968
TGF- β 1 núcleo (%)	r	-	-	-	-	-0,026	0,471	0,141	0,332	0,441	-0,416
	p-Valor	-	-	-	-	0,912	0,066	0,604	0,208	0,088	0,109
TGF- β 1 citoplasma (%)	r	-	-	-	-	-	-0,369	-0,084	-0,229	-0,251	-0,009
	p-Valor	-	-	-	-	-	0,159	0,758	0,332	0,386	0,974
TGF- β 1 estroma	r	-	-	-	-	-	-	0,305	-0,120	-0,078	-0,168
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	0,234	0,647	0,766	0,520
Ki-67 nuclear (%)	R	-	-	-	-	-	-	-	-0,251	-0,302	-0,168
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	0,225	0,142	0,422
Mastócitos	r	-	-	-	-	-	-	-	-	0,404	0,346
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	0,077	0,090
Picosirius Total (%)	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,203
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,330
Picosirius amarelo (%)	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*p<0,05, correlação de Pearson.

Fonte: Acervo do Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia (UFC).

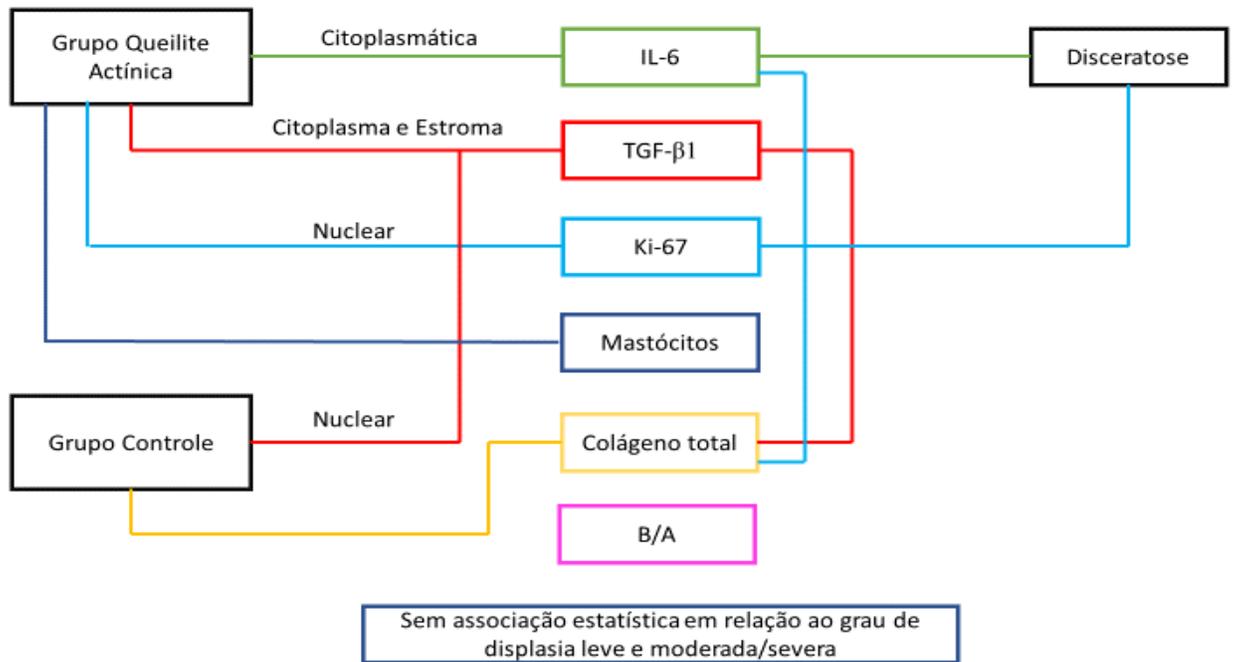
Tabela 7: Análise de correlação entre a imunoposição para IL-6, TGF- β 1 e ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em Queilites actínicas.

		IL-6			TGF- β 1			Ki-67	Azul de toluidina	Picrosirius	
		Núcleo (%)	Citoplasma (%)	Estroma	Núcleo (%)	Citoplasma (%)	Estroma	Nuclear (%)	Mastócitos	Total (%)	Amarelo (%)
IL-6 núcleo (%)	r	-	-0,400	-0,238	-0,228	-0,293	-0,295	-0,025	0,327	-0,059	-0,316
	p-Valor	-	0,081	0,341	0,378	0,254	0,287	0,917	0,159	0,806	0,175
IL-6 citoplasma (%)	r	-	-	-0,149	0,215	0,002	0,079	-0,125	-0,071	0,032	0,404
	p-Valor	-	-	0,555	0,407	0,995	0,778	0,599	0,767	0,895	0,077
IL-6 estroma	r	-	-	-	0,192	0,265	0,422	0,478*	-0,145	-0,055	-0,108
	p-Valor	-	-	-	0,494	0,339	0,151	0,045	0,566	0,829	0,669
TGF- β 1 núcleo (%)	r	-	-	-	-	-0,406	0,242	0,009	-0,025	-0,088	-0,111
	p-Valor	-	-	-	-	0,068	0,318	0,967	0,914	0,705	0,633
TGF- β 1 citoplasma (%)	r	-	-	-	-	-	-0,017	0,178	-0,360	-0,026	0,383
	p-Valor	-	-	-	-	-	0,944	0,441	0,109	0,910	0,087
TGF- β 1 estroma	r	-	-	-	-	-	-	0,291	-0,221	0,013	-0,349
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	0,227	0,363	0,959	0,143
Ki-67 nuclear (%)	R	-	-	-	-	-	-	-	0,000	-0,410*	-0,081
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,042	0,700
Mastócitos	r	-	-	-	-	-	-	-	-	0,167	-0,348
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	0,425	0,088
Picrosirius total (%)	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,079
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,706
Picrosirius amarelo (%)	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*p<0,05, correlação de Pearson.

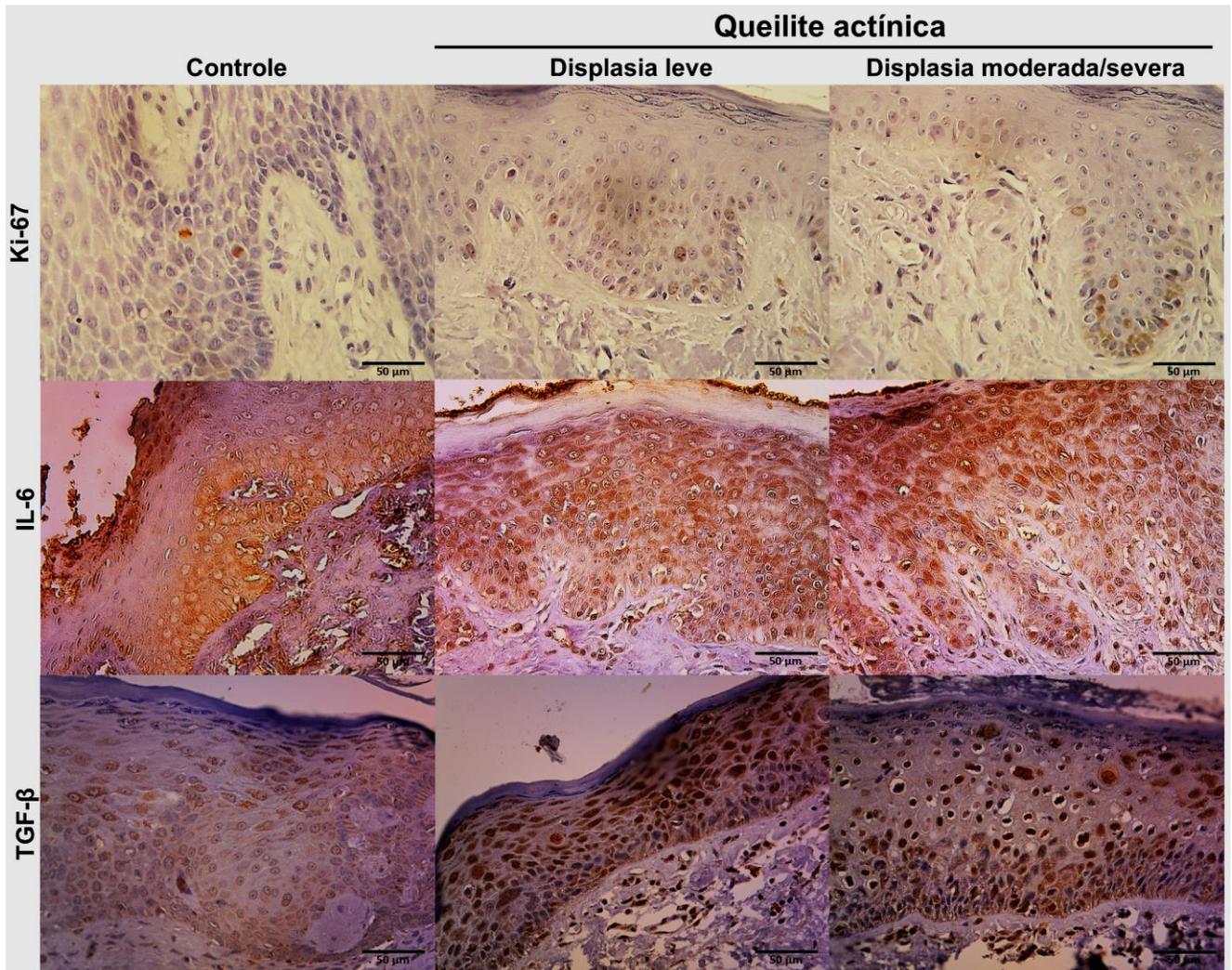
Fonte: Acervo do Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia (UFC).

Figura 1: Esquema de análise de correlação de resultados entre a imunexpressão para IL-6, TGF- β 1 e Ki-67 e densidade de mastócitos e colágeno em Queilites actínicas e no grupo controle. O grupo QA mostrou marcação citoplasmática de IL-6 de forma significativa mostrando relação com a presença de disceratose. A expressão estromal de IL-6 também foi relacionada à expressão de Ki-67 e da disceratose no grupo QA. TGF- β 1 apresentou associação com o percentual de colágeno total e imunexpressão significativa no citoplasma e no estroma dos casos de QA, enquanto que no grupo controle foi, somente, no núcleo. Ki-67, igualmente, revelou associação com colágeno total. Os mastócitos estavam em maior número, de maneira significativa, no grupo QA.



Fonte: Elaborado pela autora

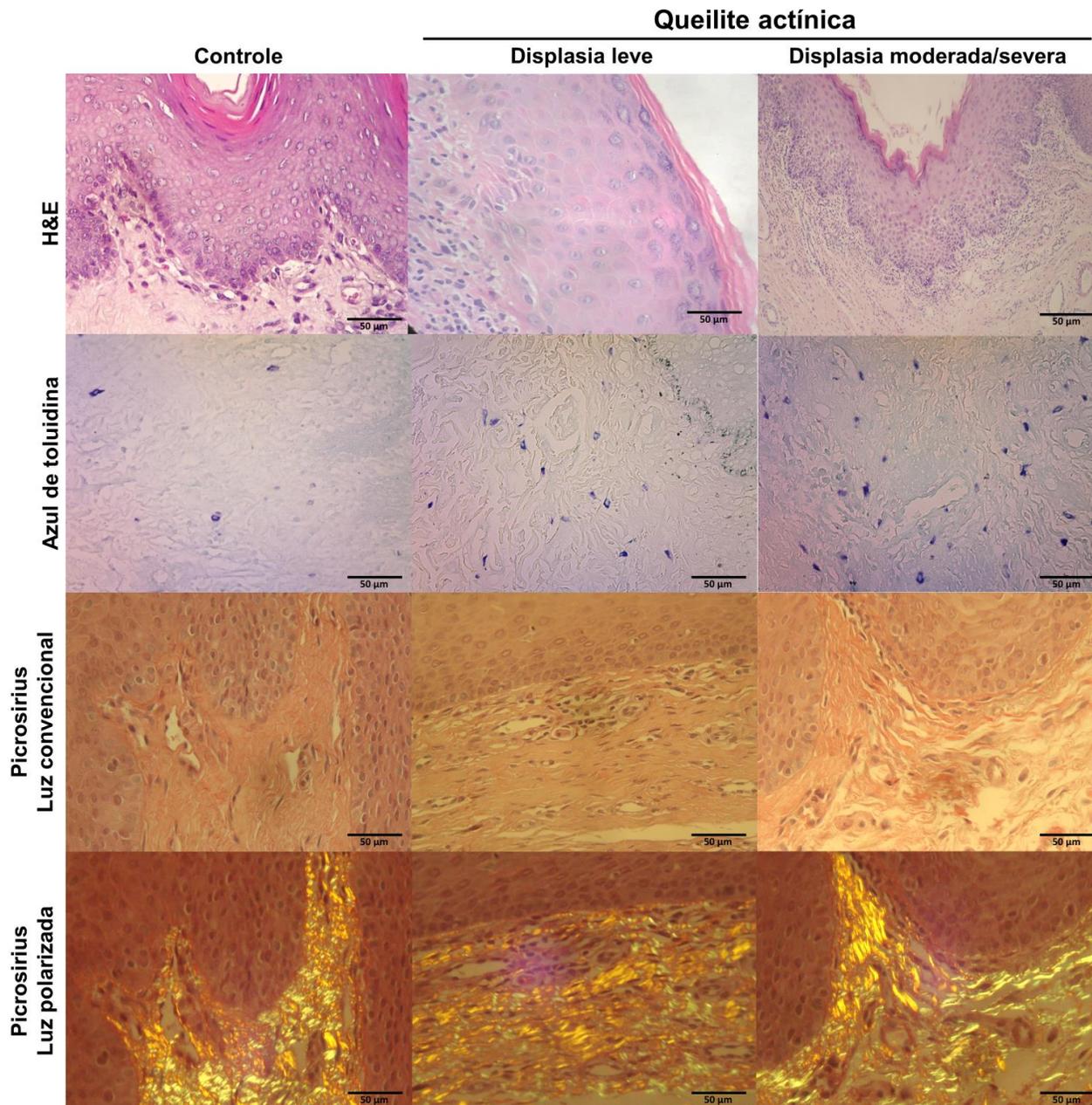
FIGURA 2: - Painel de imunomarcação dos anticorpos IL-6, TGF- β 1 e Ki-67 em mucosa normal e displasias leve e moderada/severa do grupo Queilite actínica.



Marcação de IL-6, TGF- β 1 e Ki-67 em mucosa normal e em displasias leve e moderada/severa em Queilites actínicas. Setas indicam células positivamente marcadas. Aumento de 400x.

Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 3: Painel de marcação histoquímica para detecção de mastócitos pelo método de Azul de toluidina e colágeno pelo método de *Picrosirius red* em mucosa normal e displasias leve e moderada/severa em Queilites actínicas.



Marcação de mastócitos pelo método de azul de toluidina e colágeno total, com luz convencional e colágeno com birrefringência amarelada após polarização de luz pelo método de *Picrosirius red* em mucosa normal e displasias leve e moderada/severa em Queilites actínicas. Setas indicam células positivamente marcadas. Aumento de 400x.

Fonte: Elaborado pela autora.

6. Discussão

As lesões epiteliais com alterações displásicas como a QA possuem maior risco de transformação maligna, a qual levaria a tratamentos cirúrgicos com sério dano estético e comprometimento da qualidade de vida.

O Ceará é um estado brasileiro onde a temperatura média anual é de 32°C, estando muito próximo da Linha do Equador e com incidência verticalizada dos raios solares. Além disso, acrescenta-se o fato de apresentar duas regiões geográficas distintas: um extenso litoral com atividades de pesca e um sertão semiárido onde a população desenvolve atividades laborais na agricultura. Em qualquer das situações há grande exposição ao sol e o aparecimento de Queilites actínicas em lábios, uma semimucosa, onde os processos cicatriciais proliferativos e carcinogênicos se desenvolvem diferentemente do que acontece na mucosa bucal e na epiderme/derme.

Em lesões actínicas de pele existe relação entre displasia e intensidade do processo inflamatório (BERHANE, 2002). Há evidências de que o risco aumentado para transformação maligna em determinados tecidos tem relação com a inflamação associada a danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) e a alteração na arquitetura do tecido pela ativação de células e componentes do estroma capazes de influenciar a sobrevivência, crescimento, proliferação e diferenciação celular (MOGNETTI, 2006). Na QA, frequentemente ocorre inflamação crônica provocada pelos raios ultravioleta que induzem a diminuição da reação imunológica local com alterações antigênicas; essas condições poderiam estar implicadas no processo de salinização da lesão (CALÓ, AQUINO, 2005).

O perfil demográfico clássico de pacientes com alto risco de QA relatado na literatura são homens com mais de 50 anos de idade, pele clara e com elevado tempo de exposição solar (JADOTTE, 2011; SANTANA, 2013; CINTRA, 2013). Neste estudo, os resultados estão de acordo com esse perfil. A maioria dos casos, foi observada a prevalência de pacientes homens (80%), com idade acima de 55 anos (52,0%) (média 54±16 anos).

Cavalcante *et al.*, 2008 e Cintra *et al.*, 2013 afirmam que as mulheres podem ter menor probabilidade de sofrer QA devido ao uso de batom ou produtos cosméticos, o que pode parcialmente proteger os lábios do sol. Os autores também especulam que a prevalência em homens pode ser mais comum por conta da atividade ao ar livre, em média por períodos muito maiores quando comparado ao das mulheres.

Segundo o estudo de Sarmiento *et al.*, 2013 e CAVALCANTE *et al.*, 2008, não existe associação estatisticamente significativa entre o grau de displasia epitelial de QA e o gênero, a idade, a etnia e a exposição ocupacional à luz solar, sugerindo que essas características sociodemográficas não estão relacionadas com o grau de displasia em QA. Os achados da presente pesquisa também não mostraram associação da idade com nenhum dos parâmetros estudados. No entanto, o sexo masculino apresentou, de forma significativa, maior percentual de marcação nuclear para o anticorpo IL-6 em relação ao sexo feminino. Porém, o percentual de marcação celular no estroma do marcador TGF- β 1 foi maior e significativo no sexo feminino.

Quanto à avaliação histopatológica das amostras, neste trabalho, cada caso foi classificado de acordo com o grau de displasia epitelial (DE), utilizando-se a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), por ser um critério atual que caracteriza as lesões quanto a suas alterações citológicas (atipia) e arquiteturais, além de ser utilizado em estudos recentes (PIMENTEL *et al.*, 2006; NICO *et al.*, 2007). Este sistema de gradação nos permite classificar os casos de Queilite exibindo displasia leve, moderada e intensa ou severa.

Na amostra estudada, observou-se maior ocorrência de displasia leve (n= 17 68,0%), moderada (n=7 28%) e apenas um caso (4,0%) de displasia severa. Este último caso, displasia severa, foi incluído no grupo das displasias moderadas, o qual passou a ser identificado como moderada/severa. Concordando com os resultados de estudos de vários autores (KAUGARS *et al.*, 1999; MARKOPOULOS *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2010) que observaram de igual forma maior prevalência de casos com displasia leve e ainda afirmaram que algum grau de displasia epitelial

existente, mesmo que seja leve, indica aumento no risco e subsequente desenvolvimento para o câncer.

Do mesmo modo, procurou-se achar alguma associação entre a influência dos diferentes graus de displasia com o perfil de imunexpressão para os marcadores IL-6, TGF- β 1 e ki-67, bem como a densidade de mastócitos e colágeno nas amostras de Queilites actínicas. Não foi possível observar alguma significância estatística quando se relacionou a expressão dos marcadores, independentemente de sua localização.

A análise das alterações arquiteturais e citológicas em tecido epitelial são aspectos a serem considerados para gradação histológica de displasias epiteliais. Os graus de displasia epitelial (DE) são utilizados para direcionar o tratamento das desordens potencialmente malignas (DPM), já que podem estar associados a uma maior probabilidade de transformação maligna (KUJAN *et al.*, 2007; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008).

Outro sistema de classificação dos graus de DE foi proposto por Kujan *et al.*, 2006, denominando sistema binário. Este sistema divide as lesões em baixo e alto risco de transformação maligna, utilizando como critério de avaliação as mesmas alterações citadas pela Organização Mundial de Saúde. Segundo os autores, esse sistema considera como lesão de alto risco aquelas que apresentam mais de 4 alterações estruturais e 5 alterações citológicas, e lesões de baixo risco aquelas que apresentam menos de 4 alterações estruturais e menos de 5 alterações citológicas (LIU *et al.*, 2011; PILATI *et al.*, 2017).

Kujan *et al.*, 2006 e Pilati *et al.*, 2017 ressaltam que, mesmo com a busca por uma classificação dos graus de DE, o prognóstico e tratamento dessas lesões ainda é impreciso, visto que a evolução é contínua e as alterações moleculares fogem ao diagnóstico puramente histológico. Esses autores, em seu estudo, também testaram o novo sistema binário, a forma proposta pelo referido centro, e

comprovaram que de fato há uma diminuição da subjetividade, porém sugerem que estudos longitudinais explorem o valor preditivo de transformação maligna desse sistema.

Os achados histopatológicos das lesões de QA do presente estudo se enquadram naqueles que definem a QA (SANTOS *et al.*, 2003; MARKOPOULOS *et al.*, 2004; NICO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2008). A maioria das lesões apresentou epitélio exibindo graus variáveis de displasia, em cuja lâmina própria era comum a presença de degeneração basofílica (elastose) em maior ou menor extensão.

Outras alterações encontradas em todas as amostras de QA referentes à atipia foram: aumento do número de mitoses, o pleomorfismo nuclear, a anisocitose e anisonucleose e o aumento da relação núcleo-citoplasma. Em menor frequência também foram observadas mitoses atípicas e disceratose.

Segundo Câmara *et al.*, (2016), a perda de polaridade da camada basal foi associada com a severidade do grau da DE na gradação da OMS. Anisonucleose, pleomorfismo nuclear, exocitoses, pleomorfismo celular, perda de relação núcleo/citoplasma, aumento do tamanho do núcleo, aumento das figuras de mitose e disceratose foram associadas com a severidade da DE no sistema binário. Os nossos resultados também mostraram presença destas características histológicas, as quais, contribuíram para a gradação do grau de severidade das displasias epiteliais. No entanto, a única alteração que mostrou associação com os marcadores utilizados foi a disceratose, com a expressão citoplasmática de interleucina 6 (IL-6) e com a positividade para Ki-67.

A IL-6 é descrita como um marcador já relacionado ao risco de transformação neoplásica do lábio (WU, *et al.*, 2016). Na presente pesquisa, verificou-se marcação citoplasmática aumentada nas amostras de Queilite actínica quando comparada com epitélio normal, além de relação, como supracitado, com a presença de disceratose.

Esta é uma citocina sintetizada por vários tipos celulares: macrófagos (principalmente), linfócitos T e B, fibroblastos, células do estroma da medula óssea, células epiteliais e endoteliais. Estimula a proliferação de células T, a ativação do mecanismo natural de morte celular e a citotoxicidade (POH, *et al.*, 2012). Estudos também mostram que a IL-6 pode ser sintetizada e secretada por células tumorais (LEE, *et al.*, 2006; WANG, *et al.*, 2010). Quando desregulada, IL-6 pode exercer função importante no desenvolvimento de neoplasias malignas (CULIG, 2013), como carcinomas de próstata (HUANG *et al.*, 2016), mama (SA-NGUANRAKSA *et al.*, 2016), endométrio e ovário (SO *et al.*, 2015), além de carcinomas de cabeça e pescoço (WU *et al.*, 2016).

Altos níveis séricos e teciduais de IL-6 têm sido associados ao mau prognóstico em carcinomas de cabeça e pescoço, sendo relacionados à baixa sobrevida, recidiva tumoral e surgimento de segundos tumores primários (CULIG, 2013). Os níveis salivares de IL-6 podem estar aumentados mesmo em estágios iniciais da carcinogênese, sendo um possível fator prognóstico em desordens potencialmente malignas orais (RHODUS *et al.*, 2005).

Por ser um fator de crescimento, a IL-6 exerce papel na regulação da proliferação, metabolismo e sobrevivência celular, podendo interferir na diferenciação celular e progressão tumoral (POH, GAN, TAN, 2012). Pilati *et al.* (2017) observaram que a presença de disceratose e pérolas de ceratina está fortemente associada à QA classificada como displasia severa, e que estas alterações podem ser consideradas características representativas de proximidade entre as QAs mais severas ou o Carcinoma de células escamosas(CCE). No entanto, seu envolvimento na carcinogênese é bastante duvidosa, pois a IL-6 pode desempenhar ambos os papéis, supressores ou progressivos do tumor, dependendo do tipo de câncer envolvido (CÂMARA *et al.*, 2016). Na presente pesquisa, a associação entre disceratose e expressão citoplasmática de IL-6 não foi encontrada na estratificação entre os graus de severidade das QAs, talvez em virtude de a amostra analisada ter sido constituída, em sua grande maioria, por displasias leves (n=17/25).

Ki-67 é conhecido por ser um importante marcador de proliferação celular. O fato de a proteína Ki-67 não ser expressar em células em repouso (fase G0), mas sim durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), torna-a um excelente biomarcador para determinar a fração de células que estão proliferando em um determinado tumor (OLIVEIRA, 2011). Alguns trabalhos na literatura têm tentado utilizar o Ki-67 como um preditor prognóstico nos CCEs em boca, porém, ainda é difícil utilizá-lo devido à variedade de resultados que são encontrados (JOHANNES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2009).

Por exemplo, neste estudo, o Ki-67 apresentou-se aumentado de maneira significativa nas amostras de Queilite actínica quando comparado com epitélio normal e evidenciou correlação com a imunexpressão de IL-6 e com a presença de disqueratose.

Num estudo sobre a expressão da proteína Ki-67 na mucosa normal, displasia epitelial e CCE, os valores do índice de proliferação foram significantes entre os três grupos, com esse resultado os autores concluíram que a expressão de Ki-67 poderia ser considerada como marcador inicial da progressão de tumores orais (SALVADORI *et al.*, 2014). Apesar de não termos encontrado associação da expressão de Ki-67 com a severidade da displasia, talvez a relação com a imunexpressão de IL-6 e com a presença de disqueratose possa contribuir para a creditação da aumentada expressão de Ki-67 nas QAs como fator preditor.

Por outro lado, foi reportado que a positividade do Ki-67 guarda fraca correlação direta com a gradação histológica de malignidade, e isto se deve à instabilidade da imunexpressão deste anticorpo, de modo que o Ki-67 permite inferir sobre o momento de vida de uma determinada célula, informando apenas se ela está no ciclo celular. Por isso, é possível que determinada neoplasia tenha alta taxa de proliferação e baixo percentual de células positivas para tal anticorpo (CORREA *et al.*, 2009).

Durante a transformação maligna, os queratinócitos adquirem várias características incluindo perda de diferenciação, comportamento infiltrativo e

proliferativo associado às modificações de Ki-67 e também do TGF- β 1. Segundo vários autores, os queratinócitos humanos tratados com TGF- β 1 não proliferam mas diferenciam-se através da matriz extracelular. (SHUKLA *et al.*, 2016).

O TGF- β 1 é uma citocina envolvida em muitos estágios do câncer e tem sido relacionada à redução da resposta imune, estímulo da angiogênese, aumento da síntese de enzimas proteolíticas, bem como transição epitélio/mesênquima (AIGNER *et al.*, 2008). Shukla *et al.* (2016) relataram que a sinalização mediada por TGF- β 1 regula numerosas atividades celulares incluindo crescimento, diferenciação, apoptose, adesão e motilidade, sendo essas atividades associadas à cascata de sinalização da membrana para o núcleo.

Na presente pesquisa, foi visto um aumento da expressão da proteína TGF- β 1 nas amostras de Queilite actínica tanto no citoplasma como no estroma, quando comparado com o epitélio normal e de forma significativa. Porém, a avaliação da marcação nuclear do TGF- β 1 mostrou que a percentagem de células positivas foi superior no grupo controle (epitélio normal), sugerindo uma possível translocação de sítio de marcação dependendo do grau de alterações citológicas e arquiteturais das células.

Contudo, em uma pesquisa realizada em 29 casos de QA e 53 casos de CCE, Salvadori *et al.* (2014) identificaram positividade em todos os casos estudados para essa proteína. Nas QAs houve correlação inversa entre a positividade do TGF- β 1 nos queratinócitos e o grau de displasia. Igualmente, no CCE de alto grau de malignidade houve menor imunomarcagem para TGF- β 1, tanto no parênquima como no estroma. Os autores concluíram que as alterações inversas da expressão desta proteína contribuem para a carcinogênese do lábio inferior. Estes dados são discordantes dos encontrados no presente trabalho, no entanto, é importante ressaltar que foi comparado mucosa labial normal com mucosa labial displásica, e a amostra de Salvadori *et al.* (2014) foi de QA e CEC.

O TGF- β 1 também apresentou influência com a percentagem de colágeno total, achado que pode se relacionar com a modulação de inflamação que

este anticorpo possui, as quais podem ser ações pró-inflamatórias e/ou imunossupressoras.

Em geral, células imaturas em repouso são estimuladas por TGF- β , enquanto que estas mesmas células, já ativadas, podem ser inibidas por TGF- β , que por este motivo pode ser considerado uma "anticitocina", ou seja, faz uma regulação negativa da resposta imune. Sua ação pró-inflamatória inclui quimiotaxia para macrófagos, e em menor escala para fibroblastos, aumento de expressão de moléculas de adesão e autoindução de TGF- β . Possui ação angiogênica, promove a proliferação de colágeno e de novos vasos. Esses achados sugerem que a superprodução de TGF- β pode levar a cicatrização e implica num mecanismo patogênico da fibrose (ALVES, RIBEIRO, 2004).

Estudo realizado por Zhang *et al.* (1999), com fibrose pulmonar idiopática, mostrou que, em condições normais, o reparo progressivo de danos ao tecido e remoção das células apoptóticas é orquestrada por uma cascata de citocinas e fatores de crescimento de transformação beta (TGF- β).

Shukla *et al.* (2010) reportaram que, enquanto a sinalização de componentes da família TGF- β exercem importantes papéis na supressão de cânceres de origem epitelial, em certos contextos, e dependendo do estágio do câncer, o TGF- β 1 age estimulando a progressão tumoral por aumentar a invasão e metástases das células tumorais. Um importante aspecto para a atividade pró-tumoral do TGF- β é sua contribuição em preparar o estroma para o crescimento e invasão tumoral.

Segundo Morgana *et al.*, 2013, os danos actínicos à derme e mucosa fotoenvelhecida seriam evidenciados histologicamente por infiltrado inflamatório na derme e aumento de fibroblastos, alongados e achatados, porém capazes de produzir colágeno, indicando que alterações na síntese de colágeno não pareciam ser a causa da diminuição dos colágenos I e III (RABE *et al.*, 2006).

Essas alterações levariam à diminuição da síntese dos colágenos I e III, reduzindo a adesão entre células e fibras de colágeno com menor nível de estimulação mecânica (VARANI *et al.*, 2006). Isso, somado às alterações

direcionais e funcionais do colágeno dérmico, seriam mais acentuadas a partir da sexta década de vida, pois os fibroblastos velhos mantêm a capacidade de produzir colágeno (MORAGAS *et al.*, 1998). Porém, a quantidade dos diferentes tipos de colágeno diminui com o avanço da idade e com a exposição solar cumulativa, quanto maior o tempo de exposição solar, maiores serão os danos ao colágeno, bem como maiores serão as alterações das propriedades mecânicas da derme e da mucosa (FISHER *et al.*, 1997).

Neste estudo, quando essas fibras foram analisadas histoquimicamente utilizando o método de *Picrosirius red*, observou-se material elastótico em continuidade com o córion. Porém, o percentual de colágeno total foi maior no grupo controle visto que na mucosa normal, não havia elastose solar em consequência da exposição excessiva às radiações ultravioletas. Ch'ng *et al.* (2006) relataram que a radiação ultravioleta pode provocar danos às fibras elásticas através do aumento da substância fundamental amorfa. Este achado poderia justificar a diminuição do percentual de colágeno no grupo QA, encontrado na presente pesquisa. Por outro lado, não houve diferença estatística entre a expressão de colágeno com birrefringência amarelada/avermelhada (colágeno tipo I) entre os dois grupos de estudo. Seria importante investigar se a alta expressão de TGF- β não teria contribuído para a manutenção dos dois tipos de colágenos estudados no grupo QA.

Em relação ao comportamento dos mastócitos, verificou-se nesta pesquisa um aumento de marcação de mastócitos (MCs) nas QAs, visualizada através do método de Azul de Toluidina. Estes dados são concordantes com os de Gomes *et al.* (2008) que demonstrou um aumento na quantidade de mastócitos ao se comparar lesões de QA e de CCE com o tecido normal, sugerindo uma possível participação da inflamação no processo de malignização. Resultado que comparte junto com outros autores que também afirmaram que os mecanismos de malignização da QA de lábio podem sofrer interferências dos componentes do processo inflamatório (ROJAS, 2004; DAWICKI, 2007).

Além disso, Rojas *et al.* (2004) avaliaram a densidade de MCs triptase e quimase positivos, em casos de QA e de lábios normais. O número destas células estava aumentado e apareciam degranuladas, especialmente ao redor das áreas elastóticas nos casos de QA. Os MCs contendo triptase distribuíam-se na junção epitélio-conjuntivo e no tecido conjuntivo nos casos de QA, enquanto que nos lábios normais foram encontrados no tecido conjuntivo e nas regiões submucosas. Esses dados mostraram que a densidade de MCs aumentada pode contribuir para a elastose na QA e que alterações na distribuição de MCs contendo triptase podem favorecer a malignização da lesão.

Desde que os MCs foram observados em tumores, especialmente carcinomas, pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de esclarecer a verdadeira participação dessas células no desenvolvimento e progressão de neoplasias. Estas células também têm sido reconhecidas como células efetoras importantes, participando dos efeitos deletérios da radiação UV sobre a derme e mucosa (GONZALEZ *et al.*, 1999; HART *et al.*, 2001).

A presente pesquisa mostrou nas QAs um aumento da expressão citoplasmática de IL-6 relacionada com a expressão do marcador de proliferação nuclear (Ki-67) e com a disceratose, esta última já descrita como alteração citológica de proximidade com a transformação maligna. A imunexpressão de TGF- β 1 apresentou associação com o percentual de colágeno total, no entanto nos sítios de localização citoplasmático e estromal nas QAs, diferentemente do grupo controle. Finalmente, os mastócitos estiveram em maior número, de maneira significativa, no grupo QA.

No entanto, não foi demonstrada relação com o grau de severidade das displasias, sugerindo que, na população estudada, o risco de transformação maligna está presente a partir das displasias leves e moderadas. Mais investigações são necessárias, com um maior número de casos de QA como também a inclusão do CCE de lábio, para elucidar o valor prognóstico dos marcadores estudados.

7. Conclusão

- Houve maior imunoexpressão de IL-6, TGF- β 1 e ki-67, bem como a densidade de mastócitos nas amostras de Queilite actínica do que em mucosa normal, independentemente de sua localização de marcação, no entanto não foi demonstrada associação entre os marcadores e os diferentes graus de displasia.
- A IL-6 e o anticorpo Ki67 evidenciaram associação com a disceratose nas amostras de Queilites actínicas.
- O TGF- β 1, com expressão citoplasmática e estromal, mostrou correlação com a percentual de colágeno total.

8. Referências

ABREU MA, SILVA OM, NETO PIMENTEL DR, HIRATA CH, WECKX LL, ALCHORNE MM, et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Braz J Otorhinolaryngol.*2006;72(6):767–71.

AGAR NS, HALLIDAY GM, BARNETSON RS, ANANTHASWAMY HN, WHEELER M, JONES AM. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; April 6; 101(14): 4954-4959.

AIGNER L, BOGDAHN U. TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* v 331, n 1, p 225-41, 2008.

ALVES, A. L.; RIBEIRO, F. DE A. Q. O papel das citocinas no colesteatoma adquirido da orelha média: revisão da literatura. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 70, n. 6, p. 813–818, dez. 2004.

ANDRADE, L. F. Avaliação da ação do medicamento M1 sobre o melanoma murino “*in vivo*”. Universidade Federal do Paraná. 2011; Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, 64p.

AOKI, M., PAWANKAR, R., NIIMI, Y. and KAWANA, S. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2003 Mar; 130 (3):216- 23.

ARAÚJO CP, XAVIER FCA, GURGEL CAS et al. (2012) Elastin Accumulation in Actinic Cheilitis with Different Degrees of Epithelial Dysplasia. *Int. J. Morphol* 30:627-633
Coleman, R. Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochem.*, 113:231-3, 2011.

ARAÚJO, C. P., GURGEL, C. A. S., RAMOS, E. A. G., FREITAS, V. S., JÚNIOR, A. D. A. B., RAMALHO, L. M. P., & DOS SANTOS, J. N. (2010). Accumulation of CD1a-positive Langerhans cells and mast cells in actinic cheilitis. *Journal of molecular histology*, 41(6), 357-365.

ARNAUD, R.R.; SOARES, M.S.M.; PAIVA, M.A.F.; FIGUEREDO, C.R.L.V.; SANTOS, M.G.C.; LIRA, C.C. Queiliteactínica: avaliação histopatológica de 44 casos.

AYERS JR S, Crhonic actinic cheilitis. JAMA, 1923; 81(14):1183-1186.

BARNES, L.; EVESON, JW.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon: IARC Press; 2005.

BENTLEY, J. M.; BARANKIN, B.; LAUZON, G. J. Paying more than lip service to lip lesions. Can Fam Phsician, v. 49, p. 1111-6, Sept. 2003.

BERHANE, T. *et al.* Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. *Br J Dermatol*, v. 146, n. 5, p. 810-5, 2002.

BOOTHMAN DA, MEYERS M, ODEGAARD E, WANG M. Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. *Mutat Res.* 1996 Nov 4;358(2):143-53.

BRASIL, Câncer, IN, Silva, JAG. Estimativa 2016, Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Inca, 2016 118p, 2016.

CALÓ, F.; AQUINO, D. ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO DA p63 EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE LÁBIO. 2005.

CALON, A; TAURIELLO, DVF; BATLLE, E. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* v 25, p 15–22, 2014.

CÂMARA, P. R., DUTRA, S. N., TAKAHAMA JÚNIOR, A., FONTES, K. B. F. C., & AZEVEDO, R. S. (2016). A comparative study using WHO and binary oral epithelial dysplasia grading systems in actinic cheilitis. *Oral diseases*.

CAVALCANTE AS, ANBINDER AL, CARVALHO YR. Actinic Cheilitis: Clinical and Histological Features. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66(3):498-503.

CINTRA JS, TORRES SCM, SILVA MBF, MANHÃES JÚNIOR LRC, SILVA FILHO JP, JUNQUEIRA JLC. Queilite actínica: estudo epidemiológico entre trabalhadores rurais do município de Piracaia - SP. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2013; 67(2): 118-21

CH'NG S, WALLIS A R, YUAN L, DAVIS FP, TAN T S. Mast cell and cutaneous malignancies. *Modern Pathology*. 2006;19:149-59.

CORREA MPD, FERREIRA AP, GOLLNER AM, RODRIGUES MF, GUERRA MCS. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol*. 2009.84(6):606-14.

CHEN, K; WEI, H; LING, S; YI, C. Expression and significance of transforming growth factor- β 1 in epithelial ovarian cancer and its extracellular matrix. *Oncol Lett*. v 8, n 5, p 2171-2174, 2014.

COSTA, N. L., OTON-LEITE, A. F., CHEIM-JÚNIOR, A. P., ALENCAR, R. D. C. G., BITTAR, G. O. J., SILVA, T. A., & BATISTA, A. C. (2009). Density and migration of mast cells in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. *Histology and histopathology*, 24(4), 457.

CRIVELLATO E, NICO B, RIBATTI D. Mast cells and tumor angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. *Cancer Lett*. (2008), doi 10.1016/j.canlet.2008.03.031

CULIG, Z. Interleukin-6 as a therapy target in oral squamous carcinoma. *Expert opinion on therapeutic targets*, v. 17, n. 1, p. 53–9, jan. 2013.

DAWICKI, W.; MARSHALL, J. New and emerging roles for mast cells in host defense. *Curr Opin Immunol*, v. 19, n. 1, p. 31-8, 2007.

DE SANTANA SARMENTO DJ, DA COSTA MIGUEL MC, QUEIROZ LM, GODOY GP, DA SILVEIRA EJ. Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. *Int J Dermatol*. 2014; 53(4): 466-72.; published online December 10, 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/ijd.12332>. PMID:24320079

DE SOUZA LUCENA EE, COSTA DC, DA SILVEIRA EJ, LIMA KC. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. *Oral Dis.* 2012;18(6):575–9.

FISHER GJ, WANG ZQ, DATTA SC, VARANI J, KANG S, VOORHEES JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med.* 1997;337(20):1419-28.

FORINO M, TORREGROSSA R, CEOL M et al. TGFbeta-1 induces epithelialmesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture. *Int J Exp Pathol.* v 87, p 197- 208, 2006.

FREITAS, M. D. C. A. D., RAMALHO, L. M. P., XAVIER, F. C. A., MOREIRA, A. L. G., & REIS, S. R. A. (2008). p53 and MDM2 protein expression in actinic cheilitis. *Journal of Applied Oral Science*, 16(6), 414-419.

GALLAGHER RP, LEE TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006 Sep;92(1):119-31.

GALLI, S.J., TSAI, M., WERSHIL, B.K., TAM, S.Y., COSTA, J.J. Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor. *Int. arch. Allergy Immunol.* 1995; 107: 51-53.

GONZALEZ-MOLES MA, RUIZ-AVILA I, GIL-MONTOYA JA, ESTEBAN F, BRAVO M. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol.* 2010;46: 525–30.

GOMES, A. P. N. *et al.* Comparative analysis of the mast cell density in normal oral mucosa, actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Braz Dent J*, v. 19, n. 3, p. 186-9, 2008.

GONZALEZ S, MORAN M, KOCHEVAR IE. Chronic photodamage in skin of mast cell-deficient mice. *Photochem Photobiol.* 1999;70:248-53.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HART PH, GRIMBALDESTON MA, FINLAY-JONES JJ. Sunlight, immunosuppression and skin cancer: role of histamine and mast cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(1):1-8.

HEGARTY, A. M.; HUNTER, K. D. Oral malignancy and premalignancy. *British Journal of Hospital Medicine*, v. 77, n. 4, p. 232–239, abr. 2016.

HUANG, W. J. et al. Interleukin-6 -572G/C polymorphism and prostate cancer susceptibility. *Genetics and molecular research : GMR*, v. 15, n. 3, 16 set. 2016.

HUBER MA. White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28:262–8.

HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *International Journal of Câncer, Inglaterra*, v. 121, n. 11, p. 2373-2380, 2007.

HUSSEIN MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol*. 2005 Mar;32(3):191-205.

JADOTTE YT, SCHWARTZ RA. Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66(2): 173-84, quiz 185-6.

JOHANNES, D. et al. Prognostic Markers in Stage I Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *The American Laryngological, Rhinological and Otological Society, Inc.* v.123, p. 2435- 2441, 2013.

JUCHEM PP, HOCHBERG J, WINOGRON A, ARDENGHY M, ENGLISH R. Riscos à saúde da radiação ultravioleta. *Soc Bras Cir Plas*. 1998; 13: (2).

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara; 1995. p.63-9

JUNQUEIRA JL, BÖNECKERM, FURUSE C, MORAIS PDE C, FLÓRIO FM, CURY PR, et al. Actinic cheilitis among agricultural workers in Campinas, Brazil. *Community Dent Health*. 2011;28(1):60–3.

KAARSEN LL, POULSEN TD, DE FINE OLIVARIUS F, WULF HC. Mast cells and elastosis in ultraviolet-irradiated hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1995;11:1-5.

KAUGARS GE, ABBEY LM, PAGE DG, SVIRSKY JA, BURNS JC, PILLION T. Prevention and detection of lip cancer—the dentist's role. *J Calif Dent Assoc*. 1999 Apr; 27(4): 318-23.

KUJAN, O., KHATTAB, A.; OLIVER, R.J.; ROBERTS, S.A.; THAKKER, N.; SLOAN, P. et al. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: Na attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol*, v.43, n.3, p.224-32, 2007.

KRISHNASWAMY, G., KELLEY, J., JOHNSON, D., YOUNGBERG, G., STONE, W., HUANG, S-K., BIEBER, J. and CHI, D.S. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Frontiers in Bioscience*, 2001 Sept.; 1; 6: 1109-27.

LA RIVIERE, W.; PICKETT, A. B. Clinical criteria in diagnosis of early squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Am Dent Assoc*, v. 99, n. 6, p. 972-7, Dec. 1979

LEE, J. J. et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: Prevalence and risk factors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 93 101, n. 4, p. 472–480, 2006.

LEES M, TAYLOR DJ, WOOLEY DE. Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B. *Eur J Biochem*. 1994;223:171-7.

LEVER WF. *Histopatologia da pele* 7ª ed. São Paulo: Editora Manole; 1991. p. 27.

LICHTENBELD, H.H. et al. Tumour angiogenesis: pathophysiology and clinical significance. *Neth. J. Med*. 1996 Jul; 49(1):42-51.

LIN, W.W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v.117, n.5, p. 1175-1183, 2007.

LÓPEZ-MÍNGUEZ, J. R.; CLIMENT, V.; YEN-HO, S.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; NOGALES-ASENSIO, J. M. & SÁNCHEZ-QUINTANA, D. Características estructurales de los senos de Valsalva y porción proximal de las arterias coronarias. Su relevancia durante la disección retrógrada aortocoronaria. *Rev. Esp. Cardiol.*, 59:696-702, 2006.

LUNA, L. *Manual of Histologic Staining Methods from the AFIP*. McGraw-Hill, NY, 3rd ed, 1968. pp 162-163.

NICO MMS, RIVITTI EA, LOURENÇO SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol* 2007;34(4):309-14.

NISHIKORI Y, KAKIZOE E, KOBAYASHI Y, SHIMOURA K, OKUNISHI H, DEKIO S. Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: relevance of chymase. *Arch Dermatol Res*. 1998;290:553-60

MAIN, J. H. P.; PAVONE, M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc*, v. 60, n. 2, p. 113- 1146, 1994.

MANTOVA NI, A. *et al.* Cancer-related inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 43-4, 2008.

MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAV IS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis*, v. 10, n. 4, p. 212-6, 2004.

MARTINS MT. Queilite actínica: avaliação das alterações teciduais e graduação histological em 458 casos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

MELROSE RJ. Premalignant oral mucosal diseases. *J Calif Dent Assoc*. 2001

Aug;29(8):593-600.

MIURA Y, FUJIMOTO N, KOMATSU T, TAJIMA S, KAWADA A, SAITO T, *et al.* Immunohistochemical study of chronological and photo-induced aging skins using the antibody raised against d-aspartyl residue-containing peptide. *J Cutan Pathol* 2004;31:51-6.

MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G. N. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol*, v. 42, n. 5, p. 448-60, 2006.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Molecular basis of photoaging. *Ann Bras Dermatol.*, v.84, n.3, p.26-39,2009.

MORGANA CLÁUDIA *et al.* Influência do envelhecimento na qualidade da pele de mulheres brancas: o papel do colágeno, da densidade de material elástico e da vascularização. *Rev Bras Cir Plást*, v. 28, n. 1, p. 41–8, 2013.

MORAGAS A, GARCÍA-BONAFÉ M, SANS M, TORÁN N, HUGUET P, MARTÍN-PLATA C. Image analysis of dermal collagen changes during skin aging. *Anal Quant Cytol Histol*. 1998;20(6):493-9

MOTA, I. The mast cell revisited. *Braz. Jour. Med. Biol. Res.* 1995; 28:895-901.

OKUNO EV. Radiação ultravioleta: características e efeitos. São Paulo: Editora Livraria da Física; 2005.

OLIVEIRA, L.R.; SILVA, A.R. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v.40, p. 298-307, 2011.

OYANAGI J, KOJIMA N, SATO H, HIGASHI S, KIKUCHI K, SAKAI K, MATSUMOTO K, MIYAZAK K. Inhibition of transforming growth factor- β signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. *Experimental Cell Research*. v 326, p 267–279, 2014.

PARRILHA, J. et al. UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO. 2006. PICCELLI, Hilton Rinaldo Salles. Avaliação clínica, histopatológica e imuno-histoquímica de 48 casos de queilite actínica. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Humanas) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GOIÂNIA, 2008.

PIMENTEL DRN, MICHALANY N, ALCHORNE M, ABREU M, BORRA RC, WECKX L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. J Cutan Pathol 2006;33(8):539-44.

PLAPER, H. A study of actinic cheilitis treatment by two low morbidity CO2 laser vaporization onepass protocols. Lasers Med Sci., v.24, n.3, p.375-85, 2009.

POH, Y. W.; GAN, S. Y.; TAN, E. L. EFFECTS OF IL-6, IL-10 AND TGF- β ON THE EXPRESSION OF SURVIVIN AND APOPTOSIS IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA TW01 CELLS. Experimental Oncology, v. 34, p. 85–89, 2012.

RINALDO SALLES PICCELLI ORIENTADORA, H.; APARECIDA SADDI, V. Avaliação clínica, histopatológica e imuno- histoquímica de 48 casos de queilite actínica Goiânia-GO. 2008.

RODRIGUES, A. A. et al. PROCESSOS INFLAMATÓRIOS DO SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO. [s.d.].

REV ODONTOL UNESP., v.43, n.6, p.384-389, 2014. AWDE, J. D.; KOGON, S. L.; MORIN, R. J. Lip cancer: a review. J Can Dent Assoc, v. 62, n. 8, p. 634-6, Aug. 1996.

RABE JH, MAMELAK AJ, MCELGUNN PJ, MORISON WL, SAUDER DN. Photoaging: mechanisms and repair. J Am Acad Dermatol. 2006;55(1):1-19.

RAPIDIS AD, GULLANE P, LANGDON JD, LEFEBVRE JL, SCULLY C, SHAH JP. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. Oral Oncol. 2009;45(4-5):299-300.

RINALDO SALLES PICCELLI ORIENTADORA, H.; APARECIDA SADDI, V.

Avaliação clínica, histopatológica e imuno- histoquímica de 48 casos de queilite actínica Goiânia-GO. 2008.

RODRIGUES, A. A. et al. PROCESSOS INFLAMATÓRIOS DO SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO. [s.d.].

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 & Medicine*, 41(1), 27-33.

ROJAS IG, SPENCER ML, MARTINEZ A, MAURELIA MA. Characterization of mast cell subpopulations in lip cancer. *J Oral Pathol Med*. 2005;34:268–73.

ROJAS IG, MARTINEZ A, PINEDA A, SPENCER ML, JIMÉNEZ M, RUDOLPH MI. Increased mast cell density and protease content in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(9):567-73

SALVADORI, G., DOS SANTOS, J. N., MARTINS, M. A. T., VASCONCELOS, A. C., MEURER, L., RADOS, P. V., ... & MARTINS, M. D. (2014). Ki-67, TGF- β 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. *Tumor Biology*, 35(8), 7635-7644.

SANTOS JN, DE SOUSA SO, NUNES FD, SOTTO MN, DE ARAÚJO VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol* 2003;30(4):237-41.

SAMAR, M. E.; AVILA, R. E. & ESTEBAN RUIZ, F. Técnicas histológicas. Fundamentos y aplicaciones. Córdoba. Ed. SeisC, 2004.

SGARBI FC, BERTINI F, TERA TDE M et al. (2010) Morphology of collagen fibers and elastic system fibers in actinic cheilitis. *Indian J Dent Res* 21:518-522.

SHAKER, O.; GHALLAB, N. A.; HAMDY, E.; SAYED, S. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in gingival tissues of chronic periodontitis with and without diabetes:

79 immunohistochemistry and RT-PCR study. *Archives of oral biology*, v. 58, n. 10, p. 1397- 1346, 2013.

SHUKLA A, YANG Y, MADANIKIA S, HO Y, LI M, SANCHEZ V, CATAISSON C, HUANG J, YUSPA SH. Elevating CLIC4 in multiple cell types reveals a TGF-dependent induction of a dominant negative Smad7 splice variant. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161410.

SILVA, S.D. et al. Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*. v.45, p.134–139, 2009.

SILVA TA, COELHO G, LORENZETTI BA, FIGUEIREDO CNF. Expression of apoptotic, cell proliferation regulatory, and structural proteins in actinic keratosis and their association with dermal elastosis. *J Cutan Pathol* 2007;34(4):315-23.

SA-NGUANRAKSA, D. et al. Association of Estrogen Receptor Alpha and Interleukin 6 Polymorphisms with Lymphovascular Invasion, Extranodal Extension, and Lower Disease-Free Survival in Thai Breast Cancer Patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 17, n. 6, p. 2935–40, 2016.

SO, K. A. et al. Interleukin-6 expression by interactions between gynecologic cancer cells and human mesenchymal stem cells promotes epithelial-mesenchymal transition. *International journal of oncology*, v. 47, n. 4, p. 1451–9, out. 2015.

STUDEBAKER, A. W., STORCI, G., WERBECK, J. L., SANSONE, P., SASSER, A. K., TAVOLARI, S., ... & BONAFÉ, M. (2008). Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6–dependent manner. *Cancer research*, 68(21), 9087-9095.

TANAKA T, BAI Z, SRINOULPRASERT Y, YANG BG, HAYASAKA H, MIYASAKA M. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci* 2005;96(6):317-22.

TUMULURI, V., THOMAS, G. A. AND FRASER, I. S. (2002), Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 31: 598–604. doi:10.1034/j.1600-0714.2002.00042.x

VARANI J, DAME MK, RITTIE L, FLIGIEL SE, KANG S, FISHER GJ, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblasts function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol*. 2006;168(6):1861-8.

WANG, Y. et al. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer letters*, v. 295, n. 1, p. 110–23, set. 2010.

WARNAKULASURIYA S, REIBEL J, BOUQUOT E, DABELSTEEN. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008 Mar;37(3):127-33.

WOOD NH, KHAMMISSA R, MEYEROV R, LEMMER J, FELLER L. Actinic cheilitis: a case report and a review of the literature. *Eur J Dent*. 2011 Jan;5(1):101-6.

WU, D. et al. p70S6K promotes IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, v. 7, n. 24, p. 36539– 36550, 2016.

YANG TY, CHEN SC, LEACH MW, MANFRA D, HOMEY B, WIEKOWSKI M, et al. Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2000;191(3):445-54.

ZHANG, H. Y., AND S. H. PHAN. 1999. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 21:658–665.

ZIEGLER, A. et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, v. 32, n. 22/29, p. 773-776, 1994.

ZUGERMAN, C. The lips: anatomy and differential diagnosis. *Cutis*, v. 38, n. 2, p. 116-20, Aug. 1986

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE IL-6, TGF- β 1 E Ki-67, DENSIDADE DE MASTÓCITOS E COLÁGENO EM QUEILÍTE ACTÍNICA

Pesquisador: Gabriela Soledad Márdero García

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61097116.9.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.817.320

Apresentação do Projeto:

Queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente maligna oral associada com a exposição crônica à radiação ultravioleta com elevado potencial de transformação em câncer de lábio. É objetivo desta pesquisa avaliar a relação entre a imunopressão de IL-6, TGF- β 1 e Ki-67 com a densidade de mastócitos e colágeno em queilite actínica. Para isso, serão utilizados 52 blocos parafinados de lesões diagnosticadas como QA(n=26) e amostras de mucosa normal de lábio (n=26) arquivados no Laboratório de Patologia Bucal, poder da amostra de 95%. Dados sociodemográficos serão retirados dos laudos anatomopatológicos dos pacientes. Serão realizados cinco cortes de cada amostra com 3m de espessura; 3 (três) para reação de imunohistoquímica através da técnica da estreptavidina-biotinilada para a detecção de IL-6, TGF- β 1 e Ki-67. Dois cortes para exame histoquímico; dos quais, 1 (um) corte para a detecção de mastócitos pela coloração de Azul de Toluidina e 1 (um) corte para a avaliação de colágeno tipo I e tipo III pelo método de Picrosirius Red. Em todas as reações serão utilizadas controles negativo e positivo. Para avaliação microscópica serão fotografados 5 campos (400x) para contar as células que apresentarem positividade citoplasmática e/ou nuclear para os anticorpos primários elencados através do software Image J®. Considerar-se-á a soma dos campos marcados de cada lâmina como unidade amostral, sendo submetida à análise quantitativa. Esperase detectar marcadores moleculares que contribuam para a avaliação do prognóstico dos indivíduos portadores de queilite actínica, além de uma associação entre a densidade de

mastócitos e a fibroplasia com os marcadores do dano foto labial.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Analisar a imunexpressão de IL-6, TGF- β e Ki-67 e sua associação com a densidade de colágeno e mastócitos em amostras de Queilíte Actínica.

Objetivo Secundário: Avaliar as amostras diagnosticadas com QA em base aos critérios histológicos para o diagnóstico e classificação histológica de displasia epitelial definido pela Organização Mundial de Saúde em displasia leve, displasia moderada e displasia grave ou severa.2. Correlacionar a expressão dos marcadores IL-6, TGF- β 1 e Ki-67 com o grau de displasia (leve, moderada e severa) nas Queilites Actínicas segundo as variáveis de sexo, idade e localização anatômica.3. Avaliar a densidade de mastócitos na Queilite actínica determinando sua associação com os marcadores IL-6, TGF- β 1 e Ki-67.4. Analisar a preservação do colágeno total e dos colágenos tipo I e III em Queilites actínicas, correlacionando com o grau de displasia (leve, moderada e severa) e a imunexpressão de IL-6, TGF- β 1 e Ki-67.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A pesquisa é de baixo risco para a equipe executora visto que será utilizada metodologia da rotina laboratorial. O uso de equipamentos individuais no manuseio da parafina e de reagentes já é uma regra do laboratório. Quanto aos pacientes, os riscos são inexistentes já que a amostra foi coletada do acervo de blocos parafinados do laboratório de patologia bucal da Universidade Federal do Ceará.

Benefícios: Destaca-que as lesões epiteliais com alterações displásicas em lábio possuem maior risco de transformação maligna, a qual levaria a tratamentos cirúrgicos com sério dano estético e comprometimento da qualidade de vida. O Ceará é um estado do Brasil localizado próximo à Linha do Equador, com incidência verticalizada dos raios solares e alta incidência de queilite actínica. O estudo de marcadores moleculares como também as alterações no estroma destas lesões potencialmente malignas podem contribuir para o entendimento do comportamento biológico como também, para o prognóstico e estimativa do risco de malignização.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância para a área de Odontologia, especialmente para a área de Patologia Oral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos solicitados foram apresentados, inclusive o termo de fiel depositário e a dispensa do TCLE. A pesquisadora assinou orçamento e informou quem irá assumir as despesas e incluiu o cronograma.

Recomendações: Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_797348.pdf	01/11/2016 13:20:10		Aceito
Orçamento	orcamento.jpeg	01/11/2016 13:18:16	Gabriela Soledad Márdero García	Aceito
Declaração do Patrocinador	encaminhamentodoprojetodepesquisa.jpeg	17/10/2016 18:01:09	Gabriela Soledad Márdero García	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termedefieldepositorio.jpeg	17/10/2016 17:58:32	Gabriela Soledad Márdero García	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizaçãodoslocaisondeserarealizadaapesquisa.jpeg	17/10/2016 17:57:30	Gabriela Soledad Márdero García	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termoconsentimentolivre.pdf	17/10/2016 17:56:19	Gabriela Soledad Márdero García	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaodospesquisadores.jpeg	17/10/2016 17:55:21	Gabriela Soledad Márdero García	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPESQUISAQUEILITEACTINICA.docx	27/09/2016 14:03:15	Gabriela Soledad Márdero García	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostrog.pdf	27/09/2016 13:40:04	Gabriela Soledad Márdero García	Aceito

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP: Não

Continuação do Parecer: 1.817.320

FORTALEZA, 11 de Novembro de 2016

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO
FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br