

**Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais**

**Faculdade de Odontologia**

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS EM  
LEUCOPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DE BOCA**

**ELIENE MAGDA DE ASSIS**

**Belo Horizonte  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Eliene Magda de Assis**

**Imunolocalização de miofibroblastos em leucoplasia e carcinoma de células escamosas de boca**

Dissertação apresentada à Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Clínicas Odontológicas, ênfase em Estomatologia.

**Orientador: Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta**

BELO HORIZONTE - MG  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUC MINAS  
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

A848i Assis, Eliene Magda de  
Imunolocalização de miofibroblastos em leucoplasia e carcinoma de células  
escamosas de boca / Eliene Magda de Assis. Belo Horizonte, 2008.  
71f. : II.

Orientador: Martinho Campolina Rebello Horta  
Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas  
Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia

1. Fibroblastos. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Leucoplasia. 4.  
Eritroplasia. I. Horta, Martinho Campolina Rebello. II. Pontifícia Universidade  
Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III.  
Título.

CDU: 616.31



**PUC Minas**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
Coordenação do Programa de Mestrado em Odontologia

**IMUNOLocalização de Miofibroblastos em Leucoplasia e  
Carcinoma de Células Escamosas de Boca**

**ELIENE MAGDA DE ASSIS**

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta

**COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:**

- 1- Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann - UNIFAL
- 2- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza - PUC MINAS
- 3- Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta - PUC MINAS

**DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 09 de dezembro de 2008**

**A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora**

Belo Horizonte, 19 de janeiro de 2009

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta  
**Orientador**

Prof. Dr. Roberval de Almeida Cruz  
**Coordenador Geral dos Programas  
de Mestrado em Odontologia**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre, por tudo.

Ao meu orientador Professor Martinho, por todo conhecimento transmitido, pelo incentivo, paciência e disponibilidade sempre. Grande exemplo de profissional e ser humano. Sem a sua ajuda seria impossível a conclusão desse trabalho.

Ao aluno da graduação Luiz Gustavo Pimenta, pela colaboração, empenho e paciência na realização das imunoistoquímicas.

À Maria Reni Gonçalves Moitinha por toda colaboração para que as imunoistoquímicas pudessem ser realizadas.

A toda equipe de professores da disciplina de Estomatologia da PUC Minas, por estarem sempre disponíveis em todos os momentos que precisei.

A todos os funcionários que de alguma forma foram importantes para a conclusão desse trabalho. Em especial à Silvânia e Angélica.

**Em especial:**

A toda minha família, pelo apoio e incentivo sempre.

À Verônica Dimas, que mais uma vez me provou o significado de uma grande amizade. Obrigada por tudo.

À Ruth Soares, segunda mãe que a vida me deu, pelas orações, carinho e incentivo.

O projeto de pesquisa referente a este estudo foi aprovado nos seguintes órgãos de fomento, aos quais agradecemos:

- ✓ CNPq (Projeto 484943/2007-3 - Edital MCT/CNPq 15/2007).
- ✓ FAPEMIG (EDITAL 03/2008 - PROGRAMA PESQUISADOR MINEIRO II).
- ✓ Fundo de Incentivo a Pesquisa da PUC Minas – FIP (FIP 2008/2513-1S).



## SUMÁRIO

LISTA DE ARTIGOS.....	07
RESUMO.....	08
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
OBJETIVOS DO ESTUDO.....	20
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	21
ABSTRACT.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES.....	24
ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA..	28
ANEXO 2 - ARTIGO I.....	29
ANEXO 3 - ARTIGO II.....	53
ANEXO 4 - DADOS DAS AMOSTRAS DE CARCINOMA.....	70
ANEXO 5 - DADOS DAS AMOSTRAS DE LEUCOPLASIA.....	71

## LISTA DE ARTIGOS

Esta dissertação gerou as seguintes propostas de artigos:

1. Desordens potencialmente malignas e carcinoma de células escamosas da mucosa bucal: uma revisão da literatura..... 29  
(A ser submetido ao periódico Revista Odonto Ciência da PUC-RS)
2. Myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma..... 53  
(A ser submetido ao periódico Journal of Oral Pathology & Medicine)

## RESUMO

O carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna mais comum da boca e a leucoplasia é a principal desordem potencialmente maligna da mucosa bucal. Miofibroblastos são fibroblastos diferenciados que desempenham importante papel no processo de invasão tumoral e metástase das neoplasias malignas devido à sua capacidade de degradação da matriz extracelular, fenômeno fundamental neste processo. Apesar da reconhecida importância dos miofibroblastos no processo de invasão tumoral e metástase, poucos estudos avaliaram sua presença no estroma da leucoplasia e do carcinoma de células escamosas de boca. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a presença de miofibroblastos no estroma da leucoplasia e do carcinoma de células escamosas de boca, além de analisar a existência de diferença em relação à densidade de miofibroblastos no estroma entre mucosa bucal normal, leucoplasia e carcinoma de células escamosas de boca. Foram selecionadas 10 amostras de mucosa bucal normal, 30 amostras de leucoplasia e 41 amostras de carcinoma de células escamosas de boca. As amostras foram submetidas à reação imunoistoquímica para o marcador de miofibroblastos alfa actina de músculo liso. Os resultados desta reação foram mensurados qualitativamente e a densidade de miofibroblastos foi classificada como ausente, escassa e densa. O teste estatístico de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a existência de diferenças em relação à densidade de miofibroblastos no estroma entre os grupos. Miofibroblastos não foram detectados nas amostras de mucosa normal utilizadas como controle. Essas células também não foram observadas nas amostras de leucoplasia,

independente da graduação histológica. Das 41 amostras de carcinoma, 30 (73%) apresentaram miofibroblastos. A densidade de miofibroblastos nos carcinomas foi classificada como ausente em 11 amostras (27%), escassa em 15 (36,5%) e densa em 15 (36,5%). A densidade de miofibroblastos foi estatisticamente maior nos carcinomas. O presente estudo demonstrou ausência de miofibroblastos em leucoplasia e presença heterogênea dessas células em carcinoma de células escamosas de boca, sugerindo que miofibroblastos não estão presentes durante o processo de carcinogênese da mucosa bucal e podem desempenhar um papel importante nos processos de invasão e metástase desta neoplasia.

**Palavras-chave:** miofibroblasto, carcinoma células escamosas, leucoplasia.

## INTRODUÇÃO GERAL

O carcinoma de células escamosas, também denominado carcinoma epidermóide ou carcinoma espinocelular, representa mais de 90% das neoplasias malignas que acometem a boca, estando relacionado a altos índices de morbidade e mortalidade (SAPP, EVERSOLE e WYSOCKI, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004; SILVERMAN Jr., EVERSOLE e TRUELOVE, 2004; BARNES *et al.*, 2005).

Os fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia são principalmente tabaco, álcool e radiação solar, este último relacionado ao lábio inferior (SAPP, EVERSOLE e WYSOCKI, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004; BARNES *et al.*, 2005). Estudos realizados na última década sugerem que a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), principalmente pelos subtipos 16 e 18, pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento desta neoplasia (MILLER e JOHNSTONE, 2001; KREIMER *et al.*, 2005).

O carcinoma de células escamosas caracteriza-se por uma apresentação clínica variável, podendo ser observadas lesões exofíticas, endofíticas, leucoplásicas, eritroplásicas ou eritroleucoplásicas (NEVILLE *et al.*, 2004). As regiões da boca mais afetadas são lábio inferior, língua, assoalho bucal, gengiva, palato duro e mucosa jugal (KROLLS e HOFFMAN, 1976; NEVILLE *et al.*, 2004; BARNES *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2007).

A neoplasia acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, entre a quinta e sexta décadas de vida (GERVÁSIO *et al.*, 2001; XAVIER *et al.*, 2007). Entretanto, nas últimas décadas, tem sido observado um aumento no número de pacientes adultos jovens (BARNES *et al.*, 2005).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estimou para 2008 a ocorrência de 14160 novos casos de câncer bucal, sendo 10380 em homens e 3780 em mulheres, o que torna essa doença o quinto tipo de câncer mais comum em homens e o sétimo mais comum em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

O carcinoma de células escamosas origina-se de queratinócitos do epitélio de revestimento da mucosa bucal. Histologicamente, observa-se invasão da lâmina própria por lençóis, ninhos, cordões ou pequenos grupos de células epiteliais, cuja morfologia lembra células da camada espinhosa do epitélio de revestimento. Quando as células mantêm a capacidade de produção de queratina, formam-se coleções desta proteína no interior de ilhotas tumorais, denominadas pérolas de queratina. As células neoplásicas podem apresentar alterações morfológicas caracterizadas por nucléolos proeminentes, hipercromatismo e pleomorfismo nuclear, alteração na relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular, multinucleação, número de mitoses elevado, mitoses atípicas e diskeratose. Alterações no estroma como desmoplasia, angiogênese e infiltrado inflamatório de intensidade variada também podem ser observados (NEVILLE *et al.*, 2004; SILVERMAN Jr., EVERSOLE e TRUELOVE, 2004; BARNES *et al.*, 2005).

Leucoplasia foi definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1978, como “*placa ou mancha branca que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como outra doença*” (KRAMER *et al.*, 1978). Desde então, essa definição vem sofrendo algumas modificações. Em 2005, um grupo de trabalho constituído por especialistas coordenados pela OMS concordou em alterar a definição original, sugerindo que “*o termo leucoplasia*

*deve ser utilizado para reconhecer placas brancas de risco questionável, tendo sido excluídas outras doenças ou desordens conhecidas que não carregam nenhum risco aumentado para câncer*". Cabe ressaltar que o termo leucoplasia é estritamente clínico e que esta lesão não apresenta histologia específica (WARNAKULASURIYA, JOHNSON e VAN DER WAAL , 2007).

Anteriormente, a leucoplasia era classificada como parte do grupo das lesões cancerizáveis, definidas pela OMS como tecido morfológicamente alterado que apresenta maior probabilidade de desenvolver uma neoplasia maligna, em relação à mucosa clinicamente normal. A OMS também definia condições cancerizáveis como doenças associadas a um risco significativamente aumentado para o desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Tendo em vista que a mucosa clinicamente normal em pacientes que apresentam lesão cancerizável já pode exibir alterações moleculares associadas à transformação maligna e que o surgimento da neoplasia maligna nestes pacientes não necessariamente ocorre no sítio da lesão cancerizável, o grupo de trabalho coordenado pela OMS em 2005 sugeriu abolir estes conceitos e passou a considerar todas as entidades clínicas com risco aumentado para desenvolver neoplasia maligna como "*desordens potencialmente malignas*" (WARNAKULASURIYA, JOHNSON e VAN DER WAAL, 2007; VAN DER WAAL, 2008).

A leucoplasia é a desordem potencialmente maligna mais comum da mucosa bucal (VAN DER WAAL *et al.*, 1997; MITHANI *et al.*, 2007; LODI e PORTER, 2007). Segundo Napier e Speight (2008), após analisarem inúmeros trabalhos sobre leucoplasia realizados em várias partes do mundo, a doença é mais comum em homens, fumantes, entre a 4<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> décadas de vida nos países

desenvolvidos, sendo que nos países em desenvolvimento pode ocorrer de cinco a 10 anos mais cedo. Entretanto, os autores ressaltam que a distribuição por sexo, idade e local acometido é variável, dependendo da população pesquisada e seus hábitos.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de leucoplasia são o uso de tabaco e álcool, radiação ultravioleta e microorganismos como o HPV, principalmente subtipos 16 e 18 (VAN DER WAAL *et al.*, 1997; LONGSHORE e CAMISA, 2002; DIETRICH *et al.*, 2004).

A leucoplasia pode ser classificada clinicamente em homogênea e não homogênea. A homogênea se apresenta como uma placa ou mancha predominantemente branca, uniforme, plana, fina, cuja superfície pode exibir sulcos rasos, ser lisa ou levemente enrugada. A não homogênea apresenta-se como uma placa ou mancha branca exibindo superfície irregular, nodular ou exofítica, além de poder apresentar-se como uma placa ou mancha vermelho e branca (eritroleucoplasia) (AXÉLL *et al.*, 1996). Qualquer local da mucosa bucal pode ser acometido e a leucoplasia pode se apresentar como lesão única ou lesões múltiplas, bem ou mal delimitadas. O assoalho da boca e ventre de língua são os locais com maior predisposição à transformação maligna (VAN DER WAAL *et al.*, 1997; LONGSHORE e CAMISA, 2002).

A classificação da OMS de 2005 reconhece cinco categorias histopatológicas para as então denominadas lesões epiteliais precursoras da mucosa bucal, entre as quais se destaca a leucoplasia: hiperplasia, displasia leve, displasia moderada, displasia severa e carcinoma in situ. Na hiperplasia observa-se aumento no número de células na camada espinhosa (acantose) e/ou na camada basal/parabasal, associado a estratificação regular sem atipia



celular. A displasia leve apresenta alterações arquiteturais limitadas ao terço inferior do epitélio, acompanhadas por mínima atipia celular. Na displasia moderada as alterações arquiteturais e a atipia celular se estendem até o terço médio do epitélio. Entretanto, caso esta atipia celular seja muito marcante, pode-se classificar a displasia como severa. Na displasia severa acima de dois terços do epitélio mostram alterações arquiteturais associadas a atipia celular. No carcinoma in situ, toda ou quase toda espessura epitelial mostra distúrbios arquiteturais acompanhadas por pronunciada atipia celular (BARNES *et al.*, 2005). Entre 10 a 25% das leucoplasias apresentam algum grau de displasia epitelial (LONGSHORE e CAMISA, 2002; BARNES *et al.*, 2005). Deve-se ressaltar também que uma mesma lesão pode exibir diferentes categorias histológicas em áreas distintas (HOLMSTRUP *et al.*, 2007).

A taxa de transformação maligna da leucoplasia reportada na literatura pode variar entre 0,13% e 2,2% ao ano, em função do sítio da boca envolvido, da população estudada e do tipo de estudo realizado (NAPIER e SPEIGHT, 2008). O risco de transformação maligna é maior nas seguintes situações: mulheres, indivíduos idosos, e lesões de longa duração, localizadas no assoalho da boca e ventre da língua, de grande extensão, do tipo não-homogêneo e idiopáticas (VAN DER WAAL *et al.*, 1997; NAPIER e SPEIGHT, 2008). A leucoeritroplasia apresenta maior risco de transformação maligna (VAN DER WAAL *et al.*, 1997; WARNAKULASURIYA, JOHNSON e VAN DER WAAL, 2007; NAPIER e SPEIGHT, 2008). Alguns autores acreditam ainda que o principal fator associado à transformação maligna é a presença de displasia epitelial (VAN DER WAAL *et al.*, 1997; BOUQUOT, SPEIGHT e FARTHING, 2006).

Uma vez observada a presença da mancha ou placa branca, o profissional deve considerar a hipótese de diagnóstico de leucoplasia caso não seja possível estabelecer o diagnóstico de outra doença através do exame clínico. A realização da biópsia é obrigatória. O exame anatomopatológico pode então estabelecer o diagnóstico de outra doença ou, confirmar o diagnóstico clínico de leucoplasia (WARNAKULASURIYA, JOHNSON e VAN DER WAAL, 2007; VAN DER WAAL, 2008). Uma vez estabelecido o diagnóstico de leucoplasia, deve-se considerar a presença ou ausência de displasia epitelial no exame anatomopatológico. Em caso de ausência de displasia epitelial, pode-se optar pela não remoção ou pela remoção da lesão, estabelecendo-se um controle periódico a cada seis meses. Em caso de presença de displasia epitelial, opta-se pela remoção completa da lesão e por um controle periódico a cada três meses (WARNAKULASURIYA, JOHNSON e VAN DER WAAL, 2007; VAN DER WAAL, 2008). Embora não haja evidência científica de que qualquer modalidade de tratamento previna o futuro desenvolvimento de um carcinoma de células escamosas a partir de uma leucoplasia, o principal motivo para tratá-la é tentar prevenir sua transformação maligna (VAN DER WAAL *et al.*, 1997; BRENNAN *et al.*, 2007; VAN DER WAAL, 2008). Várias técnicas têm sido utilizadas ao longo dos anos. A excisão cirúrgica é o tratamento mais utilizado, no entanto as taxas de recorrência variam de 20 a 35%. Outras modalidades incluem criocirurgia, excisão a laser, medicamentos (vitamina A e E, retinóides, beta-caroteno e bleomicina) e terapia fotodinâmica (VAN DER WAAL *et al.*, 1997; LONGSHORE e CAMISA, 2002; BRENNAN *et al.*, 2007; LODI e PORTER, 2007). Independentemente da

modalidade utilizada, recomenda-se acompanhamento periódico durante toda a vida (VAN DER WAAL, 2008).

Miofibroblastos são células originadas a partir de fibroblastos diferenciados e possuem características intermediárias entre os fibroblastos clássicos e células musculares lisas, por expressarem alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (DESMOULIÈRE, GUYOT e GABBIANI, 2004; ABRAHAM *et al.*, 2004).

Os microfilamentos citoplasmáticos de  $\alpha$ -SMA, principal característica dos miofibroblastos, estruturam-se como fibras de estresse e se localizam em diversos planos intracelulares. Os miofibroblastos se interconectam através de uniões intercelulares aderentes tipo Gap, de modo semelhante às células epiteliais. Interagem com a matriz extracelular através de integrinas, com a formação de um complexo de microfilamentos transmembranosos conhecidos como fibronexus, compostos por fibras de estresse altamente contráteis no âmbito intracelular e moléculas de fibronectina da matriz extracelular (TOMASEK *et al.*, 2002; ABRAHAM *et al.*, 2004).

Há várias hipóteses para explicar sua origem: células tronco da medula óssea, células tronco teciduais, células específicas em diferentes tecidos, células musculares lisas, transdiferenciação de fibrócitos sanguíneos e transição local epitélio-mesênquima. Entretanto, a hipótese mais aceita é sua origem através da transdiferenciação de fibroblastos mediante estímulo por TGF- $\beta$ 1 (DESMOULIERE *et al.*, 1993).

São capazes de sintetizar e secretar citocinas como interleucinas e quimiocinas, fatores de crescimento, mediadores químicos fisiológicos, componentes da matriz extracelular, metaloproteinases (MMPs) e inibidores

teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Desempenham papel importante durante a embriogênese, organogênese, inflamação, cicatrização e invasão tumoral (ABRAHAM *et al.*, 2004; DESMOULIÈRE, GUYOT e GABBIANI, 2004; McANULTY, 2007 ).

Segundo Desmoulière, Guyot e Gabbiani (2004), apesar do papel dos miofibroblastos na evolução do câncer não estar ainda completamente esclarecido, sua ação na evolução tumoral pode ser exercida através de três mecanismos: síntese de componentes específicos da matriz extracelular; remodelação mecânica do tecido de granulação com transmissão de tensão para células tumorais e produção de citocinas específicas.

Os miofibroblastos têm sido identificados como a principal célula encontrada em reações desmoplásicas do estroma de diferentes neoplasias epiteliais malignas (VERED *et al.*, 2007). Estão diretamente envolvidos no processo de remodelação da matriz extracelular, tendo em vista sua capacidade de sintetizar componentes da matriz (colágeno, proteoglicanos, fibronectina, tenascina) e de secretar enzimas proteolíticas como as metaloproteinases (MMPs) (KALLURI E ZEISBERG, 2006). As MMPs degradam componentes da membrana basal, principalmente colágeno tipo IV, permitindo que células neoplásicas invadam a lâmina própria e penetrem nos vasos sanguíneos, etapa fundamental no processo de invasão tumoral e metástase (DESMOULIÈRE, GUYOT e GABBIANI, 2004; McANULTY, 2007). São também capazes de estimular a proliferação de células neoplásicas e a angiogênese (ORIMO *et al.*, 2005) contribuindo para a progressão tumoral.

Estudos recentes indicam que a presença dos miofibroblastos está associada a um pior prognóstico de diversas neoplasias malignas. Surowiak *et*

*al.* (2006) observaram que a elevação no número de miofibroblastos no estroma estava associado a pior prognóstico em carcinoma de mama. Tsujino *et al.* (2007) demonstraram que a presença de miofibroblastos no estroma é um fator que piora o prognóstico do câncer colo-retal.

Barth *et al.* (2004) avaliaram a presença de miofibroblastos, através da imunomarcacão para  $\alpha$ -SMA, em 39 amostras de carcinoma de células escamosas de boca e mucosa normal de humanos. Miofibroblastos não foram encontrados em amostras de mucosa normal. Das 39 amostras de carcinoma de células escamosas 31 apresentaram miofibroblastos. Os autores concluíram que a remodelação do estroma induzida por carcinomas invasivos é caracterizada pelo ganho de miofibroblastos.

Vered *et al.* (2007) avaliaram a presença de miofibroblastos em amostras de mucosa normal, mucosa displásica e carcinoma de células escamosas obtidas através da indução química da carcinogênese na língua de ratos pelo carcinógeno 4NQO. Através da realização de técnica imunistoquímica para marcação de  $\alpha$ -SMA, os autores não detectaram a presença de miofibroblastos em amostras de epitélio normal, hiperkeratose ou displasia epitelial leve, moderada ou severa. Entretanto, detectaram a presença de uma quantidade significativa de miofibroblastos no estroma com o desenvolvimento do carcinoma. Estes resultados divergem de outros estudos com outros tipos de carcinoma humano que detectaram a presença de miofibroblastos no estroma de lesões cancerizáveis.

Finalmente Kellerman *et al.* (2007), avaliaram a presença de miofibroblastos, através da imunomarcacão para  $\alpha$ -SMA, em 18 amostras de mucosa bucal normal, 16 amostras de leucoplasia com displasia epitelial e 83

amostras de carcinoma de células escamosas de língua. Dos carcinomas examinados, aproximadamente 61,4% apresentaram imunomarcção ausente/leve e 38,6% apresentaram imunomarcção densa para miofibroblastos. As amostras de mucosa normal e leucoplasia não apresentaram miofibroblastos. Os autores observaram que amostras de carcinoma com imunomarcção densa para miofibroblastos em todo o tumor estavam associadas a metástases regionais. Observaram também que amostras de carcinoma com imunomarcção densa para miofibroblastos no frente de invasão estavam associadas a metástases regionais e a menor sobrevida dos pacientes. Portanto, concluíram que quanto maior a densidade de miofibroblastos no tumor pior é o prognóstico do carcinoma de células escamosas de boca.

## OBJETIVOS DO ESTUDO

✓ Objetivo geral

Avaliar a presença de miofibroblastos no estroma da leucoplasia e do carcinoma de células escamosas de boca.

✓ Objetivo específico

Avaliar a existência de diferença em relação à densidade de miofibroblastos no estroma entre mucosa bucal normal, leucoplasia e carcinoma de células escamosas de boca.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A propriedade mais importante das neoplasias malignas é a sua capacidade de invasão local e disseminação à distância, originando metástases que são sua principal causa de morbidade e mortalidade. A formação de metástases é um processo complexo que depende de inúmeras interações entre as células malignas e o hospedeiro. Este processo envolve uma seqüência de eventos caracterizada pela invasão da matriz extracelular adjacente ao tumor primário, acesso às vias de disseminação vascular, reconhecimento do órgão alvo, invasão da matriz extracelular neste órgão e estabelecimento do tumor secundário (FIDLER, 2003). Durante a invasão tumoral da matriz extracelular, as células neoplásicas se aderem a componentes desta matriz, secretam ou induzem células mesenquimais a secretarem metaloproteinases que degradam localmente a matriz e posteriormente se locomovem através da região degradada. A repetição cíclica destes passos proporciona o processo de invasão tumoral (LIOTTA, 1986).

Os miofibroblastos estão diretamente envolvidos no processo de remodelação da matriz extracelular das neoplasias, tendo em vista sua capacidade de sintetizar componentes da matriz (colágeno, proteoglicanos, fibronectina, tenascina) e de secretar enzimas proteolíticas como as metaloproteinases (MMPs) (KALLURI E ZEISBERG, 2006). As MMPs degradam componentes da membrana basal, principalmente colágeno tipo IV, permitindo que células neoplásicas invadam a lâmina própria e penetrem nos vasos sanguíneos, etapa fundamental no processo de invasão tumoral e metástase (DESMOULIÈRE, GUYOT e GABBIANI, 2004; McANULTY, 2007).



Estudos recentes indicam que a presença dos miofibroblastos está associada a um pior prognóstico de diversas neoplasias malignas (ORIMO *et al.* 2005; SUROWIAK *et al.* 2006; TSUJINO *et al.* 2007) inclusive do carcinoma de células escamosas de boca (KELLERMANN *et al.* 2007).

Entretanto, apesar da reconhecida importância dos miofibroblastos no processo de invasão tumoral e metástase, poucos estudos avaliaram sua presença no estroma da leucoplasia e do carcinoma de células escamosas de boca. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a presença de miofibroblastos no estroma da leucoplasia e do carcinoma de células escamosas de boca, além de analisar a existência de diferença em relação à densidade de miofibroblastos no estroma entre mucosa bucal normal, leucoplasia com displasia epitelial ausente/leve, leucoplasia com displasia epitelial moderada/severa/carcinoma in situ e carcinoma de células escamosas de boca. Para a detecção de miofibroblastos, as amostras foram submetidas à reação imunoistoquímica para alfa actina de músculo liso, um marcador de miofibroblastos amplamente utilizado na literatura. Apesar de alguns estudos realizarem uma análise quantitativa da imunomarcagem para miofibroblastos, consideramos mais simples e igualmente efetiva a análise qualitativa destes resultados, tendo em vista que os miofibroblastos se associam em GAPs, tornando difícil sua individualização. Nosso estudo, semelhante a outros existentes na literatura, realizou uma análise qualitativa, classificando a densidade de miofibroblastos como ausente, escassa e densa.

## ABSTRACT

Oral leukoplakia (OL) is the most common potentially malignant disorder of the oral mucosa. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common oral malignancy. Myofibroblasts have intermediate characteristics between classic fibroblasts and smooth muscle cells. Due to its ability to modify the extracellular matrix, myofibroblasts play an important role in tumor invasion and metastasis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the presence of myofibroblasts in OL and OSCC. A total of 10 normal oral mucosa used as a control, 30 OL, and 41 OSCC from archival formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were evaluated. Myofibroblasts were identified by immunohistochemical detection of alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma). The myofibroblasts immunostaining was qualitatively classified as negative, scanty, and dense. Differences among the groups were analyzed using the Kruskal Wallis test. No myofibroblasts were observed in normal oral mucosa. OL did not also show the presence of myofibroblasts, whatever the histological grading. The presence of myofibroblasts was observed in 30 of 41 OSCC (73%). The myofibroblasts immunostaining was negative in 11 samples (27%), scanty in 15 samples (36,5%), and dense in 15 samples (36,5%). The myofibroblasts immunostaining was higher in OSCC in relation to normal oral mucosa and OL. The present study demonstrates that myofibroblasts were not detected in OL and are heterogeneously present at OSCC, suggesting that these cells are not significant during oral carcinogenesis but should play an important role in OSCC invasion and metastasis.

Key words : oral cancer, squamous cell carcinoma, leukoplakia, myofibroblast.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

1. ABRAHAM, C.R. *et al.* El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, México, v.17, n.3, p.215-231, july-sept. 2004.
2. AXÉLL, T. *et al.* Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v.25, n.2, p.49-54, February, 1996.
3. BARNES, L. *et al.* **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Head and Neck Tumours.** World Health Organization; 2005. Cap.4: Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx, p. 164-175.
4. BARTH, P.J. *et al.* CD34<sup>+</sup> fibrocytes,  $\alpha$ -smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. **Virchows Archiv**, New York, v.444, n.3, p.231-234, Jan. 2004.
5. BRENNAN, M. *et al.* Management of oral epithelial dysplasia: a review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, St. Louis, v.103, n.3, SUP1(84p.),[Note(s): S19-S24], March. 2007.
6. BOUQUOT, J.E.; SPEIGHT, P.M.; FARTHING, P.M. Epithelial dysplasia of the oral mucosa – diagnostic problems and prognostic features. **Current Diagnostic Pathology**, Canada, v.12, n.1, p.11–21, February. 2006.
7. DESMOULIERE, A. *et al.* Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.122, n.1, p. 103-111, July 1993.
8. DESMOULIÈRE, A.; GUYOT, C.; GABBIANI, G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v.48, n.(5-6), p.509-517, July-aug. 2004.
9. DIETRICH, T.; REICHART, P.A.; SCHEIFELE, C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncology**, Oxford v.40, n.2, p.158–163, February, 2004.
10. FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, London, v.3, n.6, p.453-58, June. 2003.

11. GERVÁSIO, O.L.A.S. *et al.* Oral squamous cell: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. **Brazilian dental journal**, Ribeirão Preto, v.12, n.1, p.57-61, January. 2001.
12. HOLMSTRUP, P. *et al.* Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v.36, n.5, p.262-266, May. 2007.
13. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em <<http://www.inca.org.br>> Acesso em: 14 outubro de 2008.
14. KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, London, v.6, n.5, p.392-401, May. 2006
15. KRAMER, I.R.H. *et al.* WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions, Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, St. Louis, v.46, n.4, p. 518-539, October.1978.
16. KELLERMANN, M.G. *et al.* Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, Oxford, v.51, n.6, p. 849-853, December. 2007.
17. KREIMER, A.R. *et al.* Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v.14, n.2, p.467-475, Feb. 2005.
18. KROLLS, S.O.; HOFFMAN, S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14.235 cases by age, sex, and race of patients. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v.92, n.3, p.571-574, Mar. 1976.
19. LLEWELLYN, C.D.; JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people-a comprehensive literature review. **Oral Oncology**, Oxford, v.37, n.5, p. 401-418, July, 2001.
20. LLEWELLYN, C.D.; LINKLATER, K.; BELL, J. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the south east of England from 1990 to 1997. **Oral Oncology**, Oxford, v.39, n.2, p.106-114, February, 2003.
21. LODI, G.; PORTER S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v.37, n.2, p.63-69, February. 2008.

22. LONGSHORE, S.J.; CAMISA, C. Detection and management of premalignant oral leukoplakia. **Dermatologic Therapy**, Copenhagen, v.15,n.3, p. 229-235, September. 2002.
23. McANULTY, R.J. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v.39, n.4, p.666–671, April. 2007.
24. MILLER, C.S.; JOHNSTONE, B.M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, St. Louis, v.91, n.6, p.622-635, Jun. 2001.
25. MITHANI, S.K. *et al.* Molecular genetics of premalignant oral lesions. **Oral Diseases**, Copenhagen, v.13, n.2, p.126-133, Mar. 2007.
26. NAPIER, S.S; SPEIGHT, P.M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v.37, n.1, p.1-10, September. 2008.
27. NEVILLE, B.W. *et al.* **Patologia Oral & Maxilofacial**. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Cap.10: Patologia Epitelial, p. 325-354.
28. ORIMO, A, *et al.* Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. **Cell**, Cambridge, v.121, n.6, p.335–348, May. 2005.
29. SAPP, J.P.; EVERSOLE, L.R.; WYSOCKI, G.P. **Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology**. Mosby: St. Louis, 1997. Cap.6: Epithelial disorders, p.156-195.
30. SILVERMAN Jr, S.; EVERSOLE, L.R.; TRUELOVE, E.L. **Fundamentos de Medicina Oral**. 2<sup>a</sup> ad. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Cap.20: Lesões Pré-Malignas e Carcinoma de células Escamosas Bucais, p. 185-204.
31. SUROWIAK, P. *et al.* Stromal myofibroblasts in breast cancer: relations between their occurrence, tumor grade and expression of some tumour markers. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Warszawa, v.44, n.2, p.111-116, April-June. 2006.
32. TOMASEK, J.J. *et al.* R.A. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v.3, n.5, p.349-363, May. 2002.

33. TSUJINO, T. *et al.* Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, Denville, v.13, n.7, p.2082-90, Apr. 2007.
34. VAN DER WAAL, I. *et al.* Oral Leukoplakia: a Clinicopathological Review. **Oral Oncology**, Oxford, v.33, n.5, p.291-301, September, 1997.
35. VAN DER WAAL, I; AXÉLL, T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. **Oral Oncology**, Oxford, v.38, n.6, p.521-526, Sept. 2002.
36. VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa. **Oral Oncology**, Oxford, 2008. (NO PRELO).
37. VERED, M. *et al.* Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. **Oral Oncology**, Oxford, v.43, n.10, p.999-1006, November. 2007.
38. WARNAKULASURIYA S, JOHNSON NW, VAN DER WAAL I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v.36, n.10, p.575–80, November. 2007.
39. XAVIER, G.M. *et al.* Estudo retrospectivo do carcinoma epidermóide de boca em dois serviços de patologia bucal de Belo Horizonte/MG. **Revista de Pós Graduação**, São Paulo, v.14, n.1, p.20-25, jan-mar. 2007.

**ANEXO 1: CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

Belo Horizonte, 28 de setembro de 2007.

De: Profa. Maria Beatriz Rios Ricci  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Para: Martinho Campolina Rebello Horta  
Faculdade de Odontologia PUC Minas

Prezado(a) pesquisador(a),

O Projeto de Pesquisa CAAE - 0160.0.213.000-07 *“Imunolocalização de miofibroblastos em leucoplasia e carcinoma de células escamosas de boca”* foi **aprovado** no Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas.

Atenciosamente,

Profa. Maria Beatriz Rios Ricci  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – PUC Minas

ANEXO 2 – Artigo de revisão da literatura que será submetido ao periódico  
Revista Odonto Ciência da PUC-RS.



**Desordens potencialmente malignas e carcinoma de células escamosas  
da mucosa bucal: uma revisão da literatura**

**Potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma of the oral  
mucosa: A literature review**

Eliene Magda de Assis<sup>a</sup>, Luiz Gustavo Garcia Santos Pimenta<sup>b</sup>, Hermínia Marques Capistrano<sup>c</sup>, Martinho Campolina Rebello Horta<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Aluna do Curso de Mestrado em Clínicas Odontológicas, ênfase em Estomatologia, da Faculdade de Odontologia da PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>b</sup> Aluno do Curso de Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>c</sup> Professor(a) Doutor(a) das áreas de Estomatologia e Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia da PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Autor correspondente:

Martinho Campolina Rebello Horta

Rua Ceará, 1338, 1101, Funcionários, Belo Horizonte, MG, Brasil

CEP 30150-311

Tel: (31) 33194341

e-mail: martinhhorta@pucminas.br

## Resumo

O carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna mais comum da mucosa bucal e está relacionado a altos índices de mortalidade. Desordens potencialmente malignas da mucosa bucal são entidades clínicas com risco aumentado para desenvolver um carcinoma de células escamosas. Entre estas desordens se destacam a leucoplasia, eritroplasia e a queilite actínica. O cirurgião-dentista é o profissional que apresenta mais oportunidades para realizar o diagnóstico precoce do carcinoma de células escamosas, além da detecção das desordens potencialmente malignas da mucosa bucal. O objetivo desta revisão é abordar a etiopatogenia, as características clínicas, a histopatologia, o diagnóstico, o tratamento e o prognóstico destas lesões.

Palavras chave: câncer de boca, carcinoma de células escamosas, leucoplasia, eritroplasia, queilite

**Abstract**

The squamous cell carcinoma represents the most common malignancy of the oral mucosa and is related to high rates of mortality. Potentially malignant disorders of the oral mucosa are all clinical presentations that carry an increased risk for developing squamous cell carcinoma. Among these disorders are leukoplakia, erythroplakia, and actinic cheilitis. The dentist has more opportunities to achieve early diagnosis of oral squamous cell carcinoma and to detect the potentially malignant disorders of the oral mucosa. The aim of the present study is to review the etiopathogenesis, the clinical features, the histopathology, the treatment and the prognosis of these lesions.

Key words: oral cancer, squamous cell carcinoma, leukoplakia, erythroplasia, cheilitis

## **Introdução**

A mucosa bucal pode ser acometida por diversos processos patológicos de origem traumática, reacional, infecciosa, auto-imune e neoplásica, além de inúmeras manifestações bucais de doenças sistêmicas (1-3). Entre estas doenças, merece destaque o carcinoma de células escamosas, que representa a neoplasia maligna mais comum da mucosa bucal e está relacionado a altos índices de morbidade e mortalidade (1-4). Destacam-se também algumas entidades clínicas que apresentam risco aumentado para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas, denominadas “*desordens potencialmente malignas*” (5,6).

O cirurgião-dentista é o profissional que apresenta mais oportunidades para realizar o diagnóstico precoce do carcinoma de células escamosas, além da detecção das desordens potencialmente malignas da mucosa bucal. Portanto, tendo em vista a importância do conhecimento destas lesões na formação do cirurgião-dentista, o presente estudo tem como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre as principais desordens potencialmente malignas da mucosa bucal e o carcinoma de células escamosas de boca, abordando aspectos relativos a etiopatogenia, características clínicas, histopatologia, diagnóstico e tratamento.

## **Desordens potencialmente malignas da mucosa bucal**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificava os processos patológicos associados a maior risco de transformação maligna da mucosa bucal em dois grupos: lesões cancerizáveis e condições cancerizáveis. Lesão cancerizável era definida pela OMS como um tecido morfológicamente alterado

que apresenta maior probabilidade de desenvolver uma neoplasia maligna, em relação à mucosa clinicamente normal. Por outro lado, as condições cancerizáveis eram definidas como doenças que não necessariamente alteram a morfologia da mucosa bucal, mas que estão associadas a um risco significativamente aumentado para o desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Tendo em vista que a mucosa clinicamente normal em pacientes que apresentam lesão cancerizável já pode exibir alterações moleculares associadas à transformação maligna e que o surgimento da neoplasia maligna nestes pacientes não necessariamente ocorre no sítio da lesão cancerizável, um grupo de trabalho coordenado pela OMS em 2005 sugeriu abolir estes conceitos e passou a considerar todas as entidades clínicas com risco aumentado para desenvolver uma neoplasia maligna como “*desordens potencialmente malignas*” (5,6).

Neste trabalho, serão abordadas as principais desordens potencialmente malignas da mucosa bucal: leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica.

## Leucoplasia

Leucoplasia é a desordem potencialmente maligna mais comum da mucosa bucal (7-9).

Foi definida pela OMS pela primeira vez em 1978 como “*placa ou mancha branca que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como outra doença*” (10) (Fig. 1a). Desde então, essa definição vem sofrendo algumas modificações. Em 2005, um grupo de trabalho constituído por especialistas coordenados pela OMS concordou em alterar a

definição original, sugerindo que “o termo *leucoplasia* deve ser utilizado para reconhecer placas brancas de risco questionável, tendo sido excluídas outras doenças ou desordens conhecidas que não carregam nenhum risco aumentado para câncer”. Cabe ressaltar que o termo leucoplasia é estritamente clínico e que esta lesão não apresenta histologia específica (5).

Napier e Speight (11), após analisarem inúmeros trabalhos sobre leucoplasia realizados em várias partes do mundo, observaram que a doença é mais comum em homens, fumantes, entre a quarta e sétima décadas de vida nos países desenvolvidos, sendo que nos países em desenvolvimento pode ocorrer de cinco a 10 anos mais cedo. Entretanto, os autores ressaltam que a distribuição por sexo, idade e local acometido é variável, dependendo da população pesquisada e seus hábitos.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de leucoplasia são o uso de tabaco e álcool, radiação ultravioleta e microorganismos como o HPV, principalmente subtipos 16 e 18 (7,12,13).

A leucoplasia pode ser classificada clinicamente em homogênea e não homogênea. A homogênea se apresenta como uma placa ou mancha predominantemente branca, uniforme, plana, fina, cuja superfície pode exibir sulcos rasos, ser lisa ou levemente enrugada (Fig 1a). A não homogênea apresenta-se como uma placa ou mancha branca exibindo superfície irregular, nodular ou exofítica além de poder apresentar-se como uma placa ou mancha vermelho e branca (eritroleucoplasia) (14). Qualquer local da mucosa bucal pode ser acometido e a leucoplasia pode se apresentar como lesão única ou lesões múltiplas, bem ou mal delimitadas (7,11).

Os principais diagnósticos diferenciais da leucoplasia são ceratose friccional, líquen plano reticular, reação liquenóide, candidíase hiperplásica, leucoplasia pilosa, estomatite nicotínica, lesão por agente químico, mucosa mordiscada e nevo branco esponjoso (2,5,6).

A classificação da OMS de 2005 reconhece cinco categorias histopatológicas para as então denominadas lesões epiteliais precursoras da mucosa bucal, entre as quais se destaca a leucoplasia: hiperplasia, displasia leve, displasia moderada, displasia severa e carcinoma in situ. Na hiperplasia observa-se aumento no número de células na camada espinhosa (acantose) e/ou na camada basal/parabasal, associado a estratificação regular sem atipia celular. A displasia leve apresenta alterações arquiteturais limitadas ao terço inferior do epitélio, acompanhadas por mínima atipia celular (Fig. 2a). Na displasia moderada as alterações arquiteturais e a atipia celular se estendem até o terço médio do epitélio (Fig. 2b). Entretanto, caso esta atipia celular seja muito marcante, pode-se classificar a displasia como severa. Na displasia severa acima de dois terços do epitélio mostram alterações arquiteturais associadas a atipia celular. No carcinoma in situ, toda ou quase toda espessura epitelial mostra distúrbios arquiteturais acompanhadas por pronunciada atipia celular (3). Holmstrup *et al.* (15) demonstraram que a maioria das leucoplasias homogêneas apresentam ausência de displasia epitelial (43%) ou displasia epitelial leve (33%), enquanto a maioria das leucoplasias heterogêneas apresentam displasia epitelial leve (20%), moderada (32%) ou severa (20%). Estes autores também observaram que uma mesma lesão pode exibir diferentes categorias histológicas em áreas distintas.

A taxa de transformação maligna da leucoplasia reportada na literatura pode variar entre 0,13% e 2,2% ao ano, em função do sítio da boca envolvido, da população estudada e do tipo de estudo realizado (11). O risco de transformação maligna é maior nas seguintes situações: mulheres, indivíduos idosos, e lesões de longa duração, localizadas no assoalho da boca e ventre da língua, de grande extensão, do tipo não-homogêneo e idiopáticas (7,11). A leucoeritroplasia apresenta maior risco de transformação maligna (5,7,11). Alguns autores acreditam ainda que o principal fator associado à transformação maligna é a presença de displasia epitelial (7,16).

Uma vez observada a presença da mancha ou placa branca, o profissional deve considerar a hipótese de diagnóstico de leucoplasia caso não seja possível estabelecer o diagnóstico de outra doença através do exame clínico. A realização da biópsia é obrigatória. O exame anatomopatológico pode então estabelecer o diagnóstico de outra doença ou confirmar o diagnóstico clínico de leucoplasia (5,6). Uma vez estabelecido o diagnóstico de leucoplasia, deve-se considerar a presença ou ausência de displasia epitelial no exame anatomopatológico. Em caso de ausência de displasia epitelial, pode-se optar pela não remoção ou pela remoção da lesão, estabelecendo-se um controle periódico a cada seis meses. Em caso de presença de displasia epitelial, opta-se pela remoção completa da lesão e por um controle periódico a cada três meses (5,6). Embora não haja evidência científica de que qualquer modalidade de tratamento previna o futuro desenvolvimento de um carcinoma de células escamosas a partir de uma leucoplasia, o principal motivo para tratá-la é tentar prevenir sua transformação maligna (6,7,17). Várias técnicas têm sido utilizadas ao longo dos anos. A excisão cirúrgica é o tratamento mais



utilizado, no entanto as taxas de recorrência variam de 20 a 35%. Outras modalidades incluem criocirurgia, excisão a laser, medicamentos (vitamina A e E, retinóides, beta-caroteno e bleomicina) e terapia fotodinâmica (7,9,12,17). Independentemente da modalidade utilizada, recomenda-se acompanhamento periódico durante toda a vida (6).

## Eritroplasia

Eritroplasia foi definida pela OMS em 1978 como *“placa ou mancha vermelha que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como outra doença”* (10) (Fig. 1b). Em 2005, um grupo de trabalho constituído por especialistas coordenados pela OMS concordou em manter esta definição original (5). Trata-se da desordem potencialmente maligna da mucosa bucal que apresenta o maior risco de transformação maligna (5), com taxas variando entre 14,3% a 50% (18).

A eritroplasia é mais freqüente em homens entre a quarta e sétima décadas de vida (19). Apresenta-se como uma mácula ou placa plana, eritematosa, com uma superfície lisa ou granular (18). Qualquer local da mucosa bucal pode ser afetado, mas assoalho da boca, língua e palato mole são os locais mais acometidos (2,18). Usualmente a lesão é única, o que ajuda a diferenciá-la das demais lesões clinicamente semelhantes, que são na grande maioria múltiplas (6).

Os principais diagnósticos diferenciais da eritroplasia são líquen plano erosivo, candidíase eritematosa, reações de hipersensibilidade e lesões vasculares (2,5,6).

A OMS reconhece cinco categorias histopatológicas para a eritroplasia (mesma classificação utilizada para a leucoplasia): hiperplasia, displasia leve, displasia moderada, displasia severa e carcinoma in situ. (3). Deve-se ressaltar que a maioria das eritroplasias apresenta-se histologicamente como displasia moderada, displasia severa ou carcinoma in situ (15).

A conduta para o diagnóstico é semelhante à adotada para a leucoplasia. Diante de uma mancha ou placa vermelha, o profissional deve considerar a hipótese de diagnóstico de eritroplasia caso não seja possível estabelecer o diagnóstico de outra doença através do exame clínico. A biópsia deve obrigatoriamente ser realizada. O exame anatomopatológico pode então estabelecer o diagnóstico de outra doença ou confirmar o diagnóstico clínico de eritroplasia. Uma vez estabelecido o diagnóstico de eritroplasia, deve-se considerar a presença ou ausência de displasia epitelial no exame anatomopatológico. Em caso de ausência de displasia epitelial, pode-se optar pela não remoção ou pela remoção da lesão, estabelecendo-se um controle periódico a cada seis meses. Em caso de presença de displasia epitelial, opta-se pela remoção completa da lesão e por um controle periódico a cada três meses (5,6).

### Queilite actínica

O carcinoma de células escamosas de lábio pode ser precedido por uma desordem potencialmente maligna denominada queilite actínica, causada pela exposição crônica da semimucosa labial à radiação solar (1,2).

É limitada a pessoas de pele clara, raramente com menos de 45 anos de idade e com forte predileção pelo sexo masculino, chegando às vezes a uma proporção 10:1 em alguns estudos (2). Esta lesão caracteriza-se pela presença de atrofia da mucosa e perda do limite entre a semimucosa e a pele adjacente (Fig. 1c). Pode-se observar a presença de descamação epitelial, máculas vermelhas atróficas e placas brancas hiperqueratóticas. Progressivamente, podem surgir ulcerações de evolução crônica em uma ou mais regiões (1,2).

A queilite actínica caracteriza-se histologicamente pela presença de um epitélio de revestimento atrófico que pode exibir vários graus de displasia. Observa-se também a presença de uma alteração basofílica amorfa na lâmina própria, denominada elastose solar, decorrente da ação da radiação ultravioleta sobre fibras colágenas e elásticas (1,2).

Em pacientes com queilite actínica, a proteção dos lábios com filtro solar está indicada (20). Em casos de ulceração persistente a biópsia está indicada (20). Se a biópsia demonstrar a presença de displasia epitelial pode-se optar pela realização de vermelhnectomia. Este procedimento é importante para prevenir sua transformação em carcinoma de células escamosas de lábio (20,21). Outras formas de tratamento incluem a criocirurgia, ablação com laser de CO<sub>2</sub>, eletrodissecação, aplicação tópica do creme fluorouracil 5 ou terapia fotodinâmica (21).

### **Carcinoma de células escamosas**

O carcinoma de células escamosas, também denominado carcinoma epidermóide ou carcinoma espinocelular, representa mais de 90% das

neoplasias malignas que acometem a mucosa bucal e está relacionado a altos índices de morbidade e mortalidade (1-4).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estimou para 2008 a ocorrência de 14160 novos casos de câncer bucal, sendo 10380 em homens e 3780 em mulheres, o que torna essa doença o quinto tipo de câncer mais comum em homens e o sétimo mais comum em mulheres (22).

Dentre os fatores de risco para o seu desenvolvimento destacam-se tabaco, álcool e radiação solar, sendo este último relacionado principalmente ao lábio inferior (1-3). Vários estudos realizados na última década sugerem que a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), principalmente pelos subtipos 16 e 18, pode também ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento desta neoplasia (23,24).

Essa neoplasia acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, entre a quinta e sexta décadas de vida (25,26). Entretanto, nas últimas décadas, tem sido observado um aumento no número de pacientes adultos jovens (3).

As regiões da boca mais afetadas são lábio inferior, língua, assoalho bucal, gengiva, palato duro e mucosa jugal (2,3,26,27). O carcinoma de células escamosas caracteriza-se por uma apresentação clínica variável, podendo ser observadas lesões leucoplásicas (2) (Fig. 1d), eritroplásicas (Fig. 1e), eritroleucoplásicas (Fig. 1f), endofíticas (ulceradas) (Fig. 1g), ou exofíticas (tumerais) (Fig. 1h).

Os principais diagnósticos diferenciais do carcinoma de células escamosas são a paracoccidiodomicose, manifestações bucais da tuberculose, da sífilis e de outras micoses profundas (20), lesões traumáticas

(físicas, químicas e mecânicas), ceratoacantoma e queilite actínica (para lesões de lábio inferior) e sialometaplasia necrosante (para lesões de palato duro) (28). A biópsia incisional envolvendo uma parte da lesão e uma parte de tecido normal adjacente é fundamental para o diagnóstico (28).

O carcinoma de células escamosas origina-se de queratinócitos do epitélio de revestimento da mucosa bucal. Histologicamente observa-se invasão da lâmina própria por lençóis, ninhos, cordões ou pequenos grupos de células epiteliais, cuja morfologia lembra células da camada espinhosa do epitélio de revestimento. As células neoplásicas podem formar pérolas de queratina e apresentar alterações morfológicas caracterizadas por nucléolos proeminentes, hipercromatismo e pleomorfismo nuclear, alteração na relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular, multinucleação, número de mitoses elevado, mitoses atípicas e disceratose. Infiltrado inflamatório de intensidade variada também pode ser observado (2-4) (Fig. 2c e 2d).

O paciente com carcinoma de células escamosas de boca deve ser avaliado por uma equipe multidisciplinar que inclua cirurgião de cabeça e pescoço, radioterapeuta, oncologista, cirurgião-dentista, fonoaudiólogo e enfermeiro especializado. O tratamento de escolha é a cirurgia, que pode variar de uma excisão local com uma margem de segurança de 1 a 2 cm, até uma remoção mais ampla, dependendo da extensão e do estadiamento da doença. A radioterapia é usada no tratamento de lesões iniciais ou quando o paciente não está apto a realizar uma cirurgia. Funciona também como um adjuvante no tratamento, diminuindo as taxas de recorrência local. Em lesões mais avançadas, a combinação de cirurgia e radioterapia trazem melhor chance de cura do que uma ou outra isolada. Convencionalmente a quimioterapia é usada

como um tratamento paliativo para lesões em estágios mais avançados, quando a doença é inoperável ou quando o paciente não está apto para cirurgia. Entretanto, com o desenvolvimento nas últimas décadas de vários agentes citotóxicos como a cisplatina, taxano e 5-fluorouracil e suas combinações, o papel da quimioterapia tem se expandido de paliativo para adjuvante no tratamento do carcinoma de células escamosas bucal. A combinação da radioterapia e quimioterapia simultaneamente tem melhorado ainda mais os resultados do tratamento (29).

Conhecer os fatores prognósticos do carcinoma de células escamosas é fundamental para o planejamento terapêutico adequado e para avaliar a situação real do paciente e as perspectivas para o controle da doença (28). O prognóstico do carcinoma epidermóide está diretamente relacionado ao estadiamento clínico do tumor através do sistema TNM. Este sistema utiliza três parâmetros, onde T indica o tamanho do tumor, N a presença e extensão de metástases para linfonodos regionais e M a presença de metástases à distância. Estes parâmetros são mensurados e reunidos em quatro estágios, numerados de I a IV em ordem crescente de acordo com o grau de disseminação do tumor. Quanto maior o estágio, pior é o prognóstico da neoplasia. A sobrevida de 5 anos é de aproximadamente 85% no estágio I, 66% no estágio II, 41% no estágio III e 9% no estágio IV (2,30).

### **Considerações finais**

O carcinoma de células escamosas da mucosa bucal, apesar de ser facilmente visível e diagnosticado, ainda representa uma importante causa de mortalidade. O papel do cirurgião-dentista na detecção e tratamento das

desordens potencialmente malignas e no diagnóstico precoce do carcinoma de células escamosas da mucosa bucal é extremamente importante. Para isso é fundamental que o profissional conheça bem a etiopatogenia, as características clínicas e histopatológicas, as modalidades de tratamento e o prognóstico tanto das desordens potencialmente malignas quanto do carcinoma de células escamosas. A detecção precoce desta neoplasia depende de uma conduta adequada junto aos pacientes, que se inicia com uma boa anamnese e com o exame físico detalhado da mucosa bucal, passando pelo correto diagnóstico e encaminhamento do paciente para tratamento ainda na fase inicial da doença, o que favorece imensamente o seu prognóstico.

## Referências

1. Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology. 1 ed. St. Louis: Mosby; 1997. p.156-195.
2. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral & Maxilofacial. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.325-354.
3. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Head and Neck Tumours. 1ª ed. Lyon: IARC press; 2005. p. 164-175.
4. Silverman Jr. S, Eversole LR, Truelove EL. Fundamentos de Medicina Oral. 2ª ad. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 185-204.
5. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med 2007;36:575–580.
6. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa. Oral Oncol 2008; (NO PRELO).
7. Van der Waal I, Schepman KP, Van der Meij EH, Smeele LE. Oral Leukoplakia: a Clinicopathological Review. Oral Oncol 1997;33:291-301.
8. Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. Oral Dis 2007;13:126-133.
9. Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. J Oral Pathol Med 2008;37:63-69.
10. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin RH. WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions, Definition of leukoplakia and



- related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1978;46:518-539.
11. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008;37:1-10.
  12. Longshore SJ, Camisa C. Detection and management of premalignant oral leukoplakia. *Dermatol Ther* 2002;15:229-235.
  13. Dietrich T, Reichart PA, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol* 2004;40:158–163.
  14. Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, Van der Waal I. An International Collaborative Group on Oral White Lesions. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18–21, 1994. *J Oral Pathol Med* 1996;25:49–54.
  15. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? *J Oral Pathol Med* 2007;36:262-266.
  16. Bouquot JE, Speight PM, Farthing PM. Epithelial dysplasia of the oral mucosa – diagnostic problems and prognostic features. *Curr Diagn Pathol* 2006;12:11–21.
  17. Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, Wray D, Al-Hashimi I, Axéll T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103: SUP1(84p.),S19-S24.
  18. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia—a review. *Oral Oncol* 2005;41:551–561.

19. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Fundamentos de Robbins e Cotran. Patologia. Bases Patológicas das Doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
20. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Patologia Oral Correlações Clinicopatológicas. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
21. Rossi R, Bani Assad G, Buggiani G, Lotti T. Photodynamic therapy: treatment of choice for actinic cheilitis? *Dermatol Ther* 2008;21:412-415.
22. Instituto Nacional do Câncer. [Acesso em 14 outubro de 2008]. Disponível em <http://www.inca.org.br>
23. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622-635.
24. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467-475.
25. Gervásio OLAS, Dutra RA, Tartaglia SMA, Vasconcellos WA, Barbosa AA, Aguiar MCF. Oral squamous cell: a retrospective study of 740 cases in a brazilian population. *Braz Dent J* 2001;12:57-61.
26. Xavier GM, Silveira Jr. JB, Machado VC, Horta MCR, Mesquita RA. Estudo retrospectivo do carcinoma epidermóide de boca em dois serviços de patologia bucal de Belo Horizonte/MG. *RPG* 2007;14:20-25.
27. Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14.235 cases by age, sex, and race of patients. *J Am Dent Assoc* 1976;92:571-574.

28. Parise Jr. O. Câncer de Boca, Aspectos Básicos e Terapêuticos. 1ª ed.

São Paulo: Sarvier, 2000.

29. Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Management of gingivobuccal complex

câncer. Ann R Coll Surg Engl 2008;90:546-553.

30. Jones AS. Prognosis in mouth cancer: tumour factors. Oral Oncol Eur J

Cancer 1994;30B:8-15.

Figura 1. Apresentação clínica de leucoplasia (a), eritroplasia (b), queilite actínica (c) e carcinoma de células escamosas com aspecto leucoplásico (d), eritroplásico (e), leucoeritroplásico (f), endofítico (g) e exofítico (h).

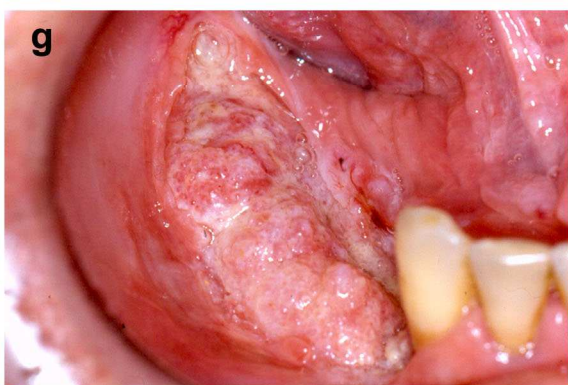
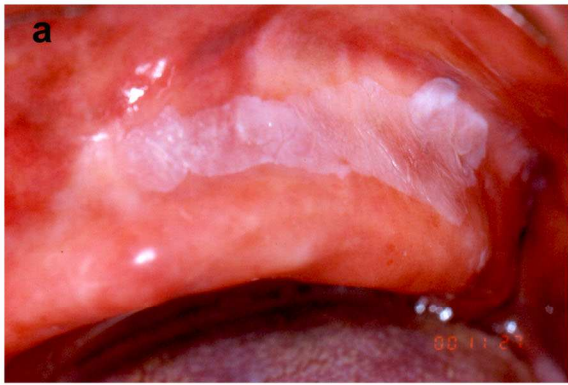
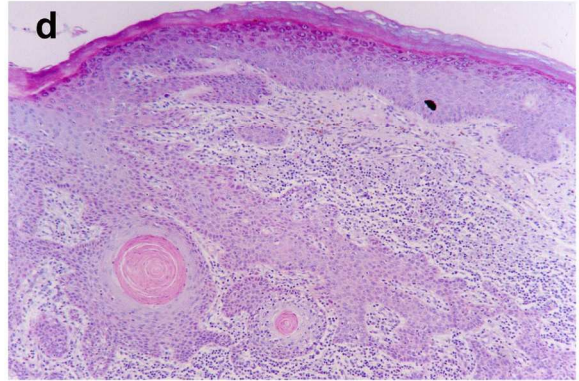
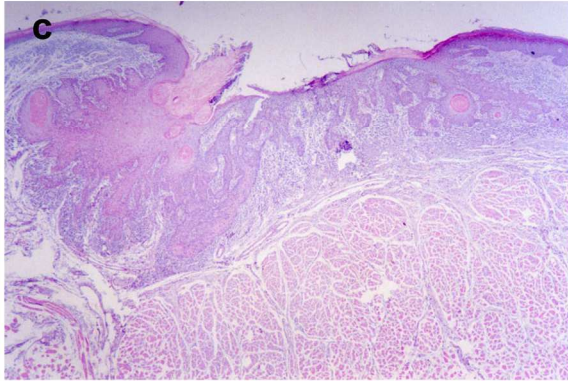
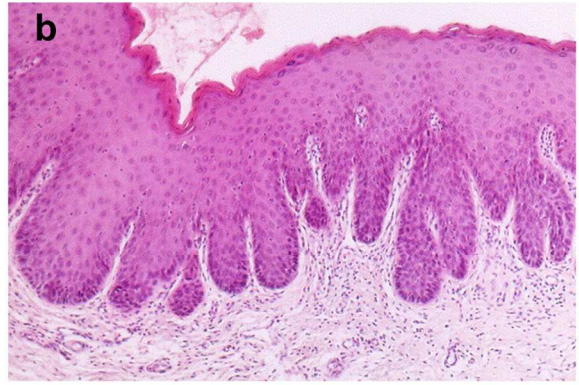


Figura 2. Aspecto histopatológico de leucoplasia com displasia epitelial leve (a, HE – 100X), leucoplasia com displasia epitelial moderada (b, HE – 100X) e carcinoma de células escamosas (c, HE – 40X; d, HE – 100X).





ANEXO 3 – Artigo principal da dissertação que será submetido ao periódico  
Journal of Oral Pathology & Medicine.



**Myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma**

Running title: Myofibroblasts in oral leukoplakia and carcinoma

Key words: leukoplakia, oral cancer, squamous cell carcinoma, myofibroblast

Eliene Magda de Assis

Luiz Gustavo Garcia Santos Pimenta

Martinho Campolina Rebello Horta

Oral Pathology Laboratory, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

**Corresponding author:**

Martinho Campolina Rebello Horta

Rua Ceará, 1338, 1101

Funcionários – Belo Horizonte – MG

Brazil

CEP 30150-311

Phone: (+55) 31 33194341

Fax: (+55) 31 33194166

e-mail: martinhhorta@pucminas.br

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Oral leukoplakia (OL) is the most common potentially malignant disorder of the oral mucosa. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common oral malignancy. Myofibroblasts have intermediate characteristics between classic fibroblasts and smooth muscle cells. Due to its ability to modify the extracellular matrix, myofibroblasts play an important role in tumor invasion and metastasis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the presence of myofibroblasts in OL and OSCC.

**METHODS:** A total of 10 normal oral mucosa used as a control, 30 OL, and 41 OSCC from archival formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were evaluated. Myofibroblasts were identified by immunohistochemical detection of alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma). The myofibroblasts immunostaining was qualitatively classified as negative, scanty, and dense. Differences among the groups were analyzed using the Kruskal Wallis test.

**RESULTS:** No myofibroblasts were observed in normal oral mucosa used as a control. OL did not also show the presence of myofibroblasts, whatever the histological grading. The presence of myofibroblasts was observed in 30 of 41 OSCC (73%). The myofibroblasts immunostaining was negative in 11 samples (27%), scanty in 15 samples (36.5%), and dense in 15 samples (36.5%). The myofibroblasts immunostaining was higher in OSCC in relation to normal oral mucosa and OL ( $p < 0.05$ ).

**CONCLUSIONS:** The present study demonstrates that myofibroblasts were not detected in OL and are heterogeneously present at OSCC, suggesting that these cells are not significant during oral carcinogenesis but should play an important role in OSCC invasion and metastasis.

## Introduction

Leukoplakia is the most common potentially malignant disorder of the oral mucosa, defined as a white plaque of questionable risk having excluded other known diseases or disorders that carry no increased risk for cancer (1). Oral leukoplakia (OL) mainly affects men over 40 years old and tobacco use is its most important pre-disposing factor (2). Leukoplakia is a clinical term (1) and, according to the WHO classification (3), may be histologically categorized as squamous cell hyperplasia, mild dysplasia, moderate dysplasia, severe dysplasia and carcinoma in-situ. The rate of malignant transformation ranges among 0.13% to 2.2% per year (2).

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common malignancies worldwide and represents 90% of the malignant tumors of the oral cavity (3). OSCC also mainly affects men over 40 years old and the most relevant risk factors for its development are tobacco, alcohol, HPV 16 and 18 infection, and ultraviolet radiation (3-6). The tumor may arise in any site of the oral cavity chiefly in lower lip, tongue, floor of mouth, soft palate, and gingival/alveolar ridge (3,7).

Myofibroblasts are differentiated fibroblasts that express alpha smooth muscle actin and have intermediate characteristics between classic fibroblasts and smooth muscle cells (8,9). Its most referred origin is the fibroblast transdifferentiation stimulated by cytokines as TGF- $\beta$ 1 (8-11). Due to its ability to modify the extracellular matrix, myofibroblasts play an important role in tumor invasion and metastasis (8,10,12,13). Several studies have indicated that the presence of myofibroblasts in the stroma is associated with a worse prognosis of different malignant tumors (14,15), including OSCC (16).

Despite its relevance in tumor behavior, few studies have evaluated myofibroblasts in potentially malignant disorders of the oral mucosa (16) and OSCC (16-19). Therefore, the aim of this study is to evaluate the presence of myofibroblasts in OL and OSCC.

## **Material and Methods**

### Tissues and samples

This study was approved by the local ethics committee.

A total of 30 OL and 41 OSCC from archival formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were evaluated. 10 samples of normal oral mucosa were used as a control.

OL samples were previously histologically classified according the WHO classification system (3) and categorized in two groups: 1) 13 OL classified as squamous cell hyperplasia (absence of dysplasia) or mild dysplasia; 2) 17 OL classified as moderate dysplasia, severe dysplasia or carcinoma *in-situ*.

### Immunohistochemistry

Myofibroblasts were identified by immunohistochemical detection of alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma), a marker for myofibroblasts. Four  $\mu$ m sections from the paraffin-embedded samples were used. Tissue sections were dewaxed with xylene, hydrated using graded alcohols, and treated with 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to eliminate endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval was conducted by heating in a 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) for 30 minutes. Subsequently, the anti- $\alpha$ -sma monoclonal antibody was used (clone 1A4,

diluted 1:100; Dako Corporation, Carpinteria, USA). The LSAB+ kit (Dako Corporation, Carpinteria, USA) was used for application of the biotinylated link antibody and peroxidase-labeled streptavidin, according to the manufacturer's instructions. The reactive products were visualized by immersing the sections for 3 min in 0.03% diaminobenzidine solution, containing 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The sections were then counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted. Normal vessel's smooth muscle immunoreactivity was used as a positive control. Negative control was determined by omission of the primary antibody.

#### Scoring of immunostaining results

A light microscopy was used to evaluate the immunohistochemical reactions. Alpha smooth muscle actin positive stromal cells, showing cytoplasmatic immunostaining, were considered as myofibroblasts. Myofibroblasts immunostaining was qualitatively classified as negative (0), scanty (1), and dense (2).

#### Statistical analysis

The data were analyzed by means of BioEstat 5.0 software (Optical Digital Technology, Belém, Brazil). Differences among the groups were analyzed using the Kruskal Wallis test. Tests were considered significant when their *P*-values were <0.05.

## Results

No myofibroblasts were observed in normal oral mucosa used as a control (Table 1). OL did not also show the presence of myofibroblasts, whatever the histological grading (Fig. 1a and b) (Table 1).

The presence of myofibroblasts was observed in 30 of 41 OSCC (73%). The myofibroblasts immunostaining was classified as negative in 11 samples (27%) (Fig. 1c and d), scanty in 15 samples (36.5%) (Fig. 1e and f), and dense in 15 samples (36.5%) (Fig. 1g and h) (Table 1).

The myofibroblasts immunostaining was higher in OSCC in relation to normal oral mucosa and OL ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

## Discussion

Myofibroblasts are differentiated fibroblasts that express alpha smooth muscle actin (8,9). These cells synthesize and secrete cytokines, growth factors, inflammatory mediators, extracellular matrix proteins, metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases. Therefore, myofibroblasts play an important role during embryogenesis, organogenesis, inflammation, and wound healing (8,9,11).

Due to its ability to modify the extracellular matrix, myofibroblasts also participate in tumor invasion and metastasis (8,10,11). Metastasis is a complex process that depends on many interactions among tumor cells and the microenvironment. It involves a sequence of events characterized by tumor growth and angiogenesis, detachment between the tumor cells, invasion of the extracellular matrix (ECM), vascular dissemination, extravasation in target

organs, and establishment of secondary tumor. During the ECM invasion, the tumor cell must adhere to its components, promote its degradation by metalloproteinases, and then move through the degraded ECM. The cyclic repetition of these steps provides the invasion of the ECM (20,21).

Myofibroblasts have been identified in the reactive stroma of breast (14), gastric (22), liver (23), prostate (24), and colorectal (15) cancer. However, few studies have evaluated myofibroblasts in potentially malignant disorders of the oral mucosa (16) and OSCC (16-19).

In the present study, no myofibroblasts were observed in OL, no matter what the histological grading (Table 1). Similar results from prior literature have been observed as regards OL (16) and dysplastic epithelium in rat tongue carcinogenesis model (19). These results suggest that myofibroblasts are not present in the stroma during oral carcinogenesis, even in its advanced stages. These results also reinforce the hypothesis that, in this process, the appearance of myofibroblasts is entirely dependent on the OSCC development (19) and contact among OSCC cells and the stroma is needed to induce myofibroblast transdifferentiation (16). Nevertheless, myofibroblasts were in fact demonstrated in premalignant lesions of breast (25), uterine cervix (26), and intestinal mucosa (27).

Our results showed the presence of myofibroblasts in 73% of the OSCC samples (Table 1). These findings are in accordance with previous reports evaluating oral squamous cell carcinoma (16-19). These results suggest that stromal remodeling induced by OSCC is characterized by gain of myofibroblasts, as originally reported by Lewis et al. (18) and Barth *et al.* (17). The myofibroblast is a key cell in the stromatogenesis, a dynamic process in

ECM remodeling, induced by tumor cells, that creates a permissive environment for tumor growth, local invasion and metastasis (8,10,12,13). Kellermann *et al.* (16) demonstrated that OSCC showing abundant presence of myofibroblasts are associated to higher proliferative activity of tumor cells, regional metastasis and survival, in relation to OSCC with negative and scanty myofibroblasts. Moreover, the presence of myofibroblasts in the stroma was associated with a worse prognosis in other malignancies as breast (15) and colorectal cancer (14).

The myofibroblasts immunostaining was negative in 27%, scanty in 36.5%, and dense in 36.5% of the OSCC samples (Table 1). This heterogeneous presence of myofibroblasts in OSCC has been related in previous reports (16-19). It was also reported that OSCC cell lines induce oral fibroblast transdifferentiation into myofibroblasts *in vitro*, through secretion of TGF- $\beta$ 1 (18,28). As this paracrine interaction may also occur *in vivo*, the heterogeneous presence of myofibroblasts in OSCC should be explained by differences in TGF- $\beta$ 1 secretion by OSCC cells.

In conclusion, myofibroblasts were not detected in OL and are heterogeneously present at OSCC, suggesting that these cells are not significant during oral carcinogenesis but should play an important role in OSCC invasion and metastasis.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (484943/2007-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (CDS-PPM-00119-08), and Fundo de Incentivo à Pesquisa da PUC Minas - FIP (2008/2513-1S), Brazil.

The authors wish to thank the invaluable technical assistance provided by Mrs. Maria Reni Gonçalves Moitinha.

## References

1. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; **36**: 575–580.
2. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008;**37**:1-10.
3. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, et al. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Head and Neck Tumours*. 1<sup>a</sup> ed. Lion: IARC press; 2005.
4. De Vissher JGAM, Van Der Waal I. Etiology of cancer of the lip: a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; **27**:199–203.
5. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; **91**: 622-635.
6. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**: 467-475.
7. Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14.235 cases by age, sex, and race of patients. *J Am Dent Assoc* 1976; **92**: 571-574.
8. Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004; **48**:509-517.

9. Abraham CR, Berrocal CB, Cisneros-Lira JG, et al. El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004;**17**:215-231.
10. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;**6**:392-401.
11. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**:666–671.
12. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;**432**:332-337.
13. Beacham DA, Cukierman E. Stromatogenesis: The changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2005;**15**:329-341.
14. Surowiak P, Suchocki S, Györfy B, et al. Stromal myofibroblasts in breast cancer: relations between their occurrence, tumor grade and expression of some tumour markers. *Folia Histochem Cytobiol* 2006;**44**:111-116.
15. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007;**13**:2082-2090.
16. Kellermann, MG, Sobral LM, da Silva SD, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. *Histopathology* 2007;**51**:849-853
17. Barth PJ, Schweinsberg TSZ, Ramaswamy A, et al. CD34<sup>+</sup> fibrocytes,  $\alpha$ -smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression

- in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. *Virchows Archiv* 2004; **444**:231-234.
18. Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, et al. Tumor-derived TGF- $\beta$ 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Br J Cancer* 2004; **90**:822-832.
19. Vered M, Allon I, Buchner A, et al. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncol* 2007; **43**:999-1006.
20. Liotta LA. Tumor invasion and metastases: role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 1986; **46**:1-7.
21. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**:453-58.
22. Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, et al.  $\alpha$  Smooth muscle actin positive stromal cells in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 2002; **55**:741-744.
23. Nhieu JTV, Brochériou I, Préaux AM, et al. Myofibroblasts and hepatocellular carcinoma: an *in vivo* and *in vitro* study. *J Hepatol* 1998; **29**:120–128.
24. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, et al. Reactive Stroma in Human Prostate Cancer: Induction of Myofibroblast Phenotype and Extracellular Matrix Remodeling. *Clin Cancer Res* 2002; **8**:2912-2923.
25. Sappino AP, Skalli O, Jackson B, et al. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer* 1988; **41**:707-712.

26. Cintonino M, Bellizzi de Marco E, Leoncini P, et al. Expression of alpha-smooth-muscle actin in stromal cells of the uterine cervix during epithelial neoplastic changes. *Int J Cancer* 1991;**47**:843-846.
27. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, et al. Epithelial Cells and their neighbors. I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;**289**:G2-G7.
28. Kellermann, MG, Sobral LM, da Silva SD, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: Induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol* 2008;**44**:509-517.

**Table 1** Myofibroblasts presence in normal oral mucosa, oral leukoplakia (OL) and oral squamous cell carcinoma (OSCC).

	Negative	Scanty	Dense	P-value <sup>1</sup>
Normal oral mucosa	10 (100%)	0	0	n.s. <sup>a</sup>
OL	30 (100%)	0	0	<0.05 <sup>b</sup>
OSCC	11 (27%)	15 (36.5%)	15 (36.5%)	<0.05 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> P-values were obtained through the Kruskal Wallis test

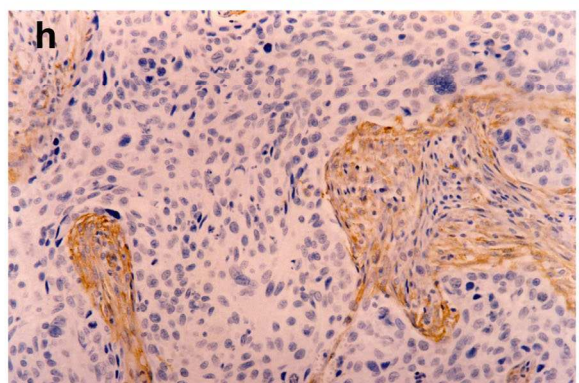
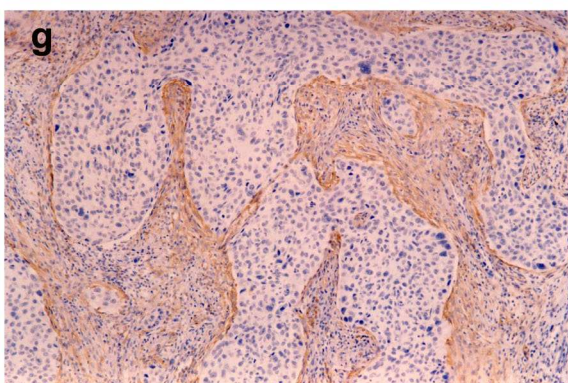
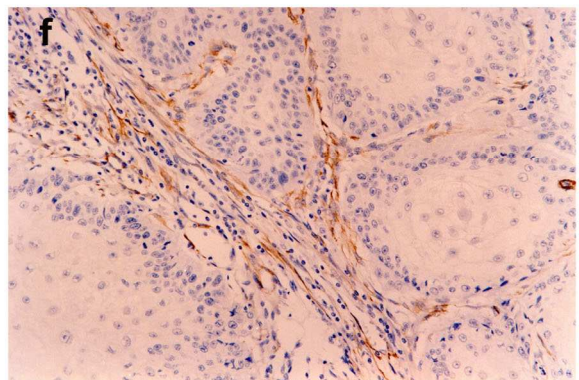
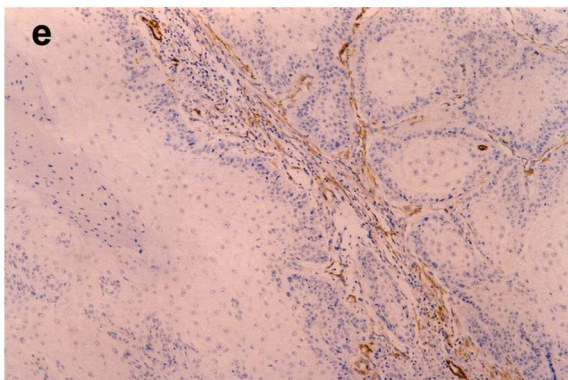
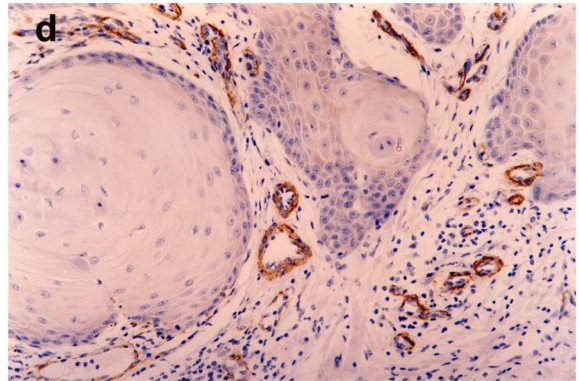
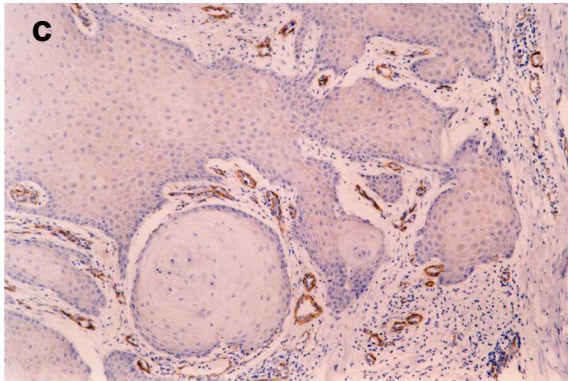
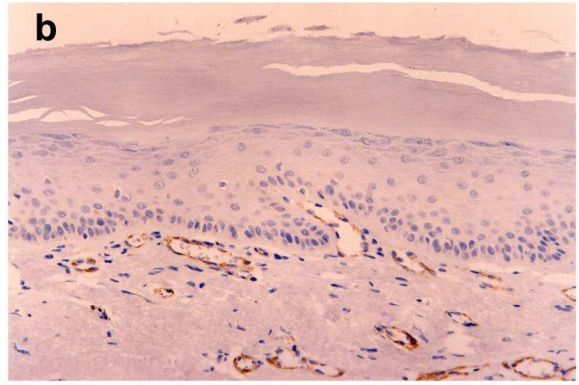
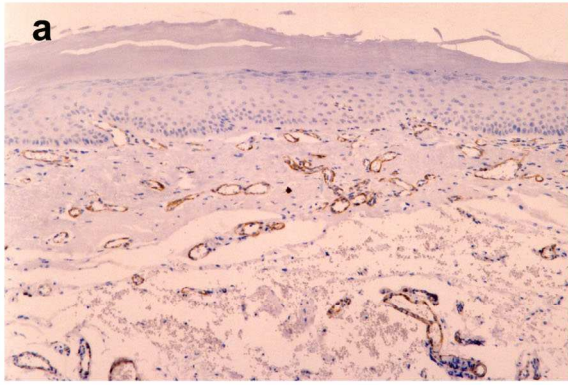
<sup>a</sup> normal oral mucosa vs. OL

<sup>b</sup> normal oral mucosa vs. OSCC

<sup>c</sup> OL vs. OSCC

n.s., not significant

**Figure 1** - Immunohistochemical reactivity for alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma) in oral leukoplakia (OL) and oral squamous cell carcinoma (OSCC).  $\alpha$ -sma positive stromal cells, showing cytoplasmatic immunostaining, were considered as myofibroblasts. Normal vessel's smooth muscle immunoreactivity was used as a positive control. No myofibroblasts were observed in OL [a and b; original magnification: x100(a) and x200(b)]. In OSCC, the presence of myofibroblasts was negative [c and d; original magnification: x100(c) and x200(d)], scanty [e and f; original magnification: x100(e) and x200(f)] or dense [g and h; original magnification: x100(g) and x200(h)].





## ANEXO 4

Sexo e idade dos pacientes, localização da lesão e densidade de miofibroblastos dos casos de carcinoma de células escamosas do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUC Minas utilizados nesse trabalho.

Amostra	Sexo	Idade	Localização da Lesão	Imunomarcção
1	F	56	Trígono, orofaringe, língua	Ausente
2	M	72	Lábio inferior	Ausente
3	M	61	Trígono, orofaringe, língua	Ausente
4	F	62	Lábio inferior	Ausente
5	M	59	Palato	Ausente
6	F	62	Rebordo inferior bilateral	Ausente
7	M	70	Assoalho bucal, língua	Ausente
8	M	53	Assoalho Bucal	Ausente
9	M	78	Lábio inferior	Ausente
10	F	65	Lábio inferior	Ausente
11	M	69	Lábio inferior	Ausente
12	M	71	Lábio inferior	Leve
13	M	57	Trígono	Leve
14	M	51	Assoalho bucal, língua	Leve
15	M	59	Rebordo alveolar	Leve
16	F	...	Palatos mole e duro, rebordo	Leve
17	M	72	Assoalho bucal, língua	Leve
18	M	59	Língua	Leve
19	M	58	Lábio inferior	Leve
20	M	42	Mucosa jugal	Leve
21	M	81	Assoalho bucal, rebordo alveolar	Leve
22	M	50	Mucosa, palato, língua, rebordo	Leve
23	F	57	Rebordo inferior posterior	Leve
24	F	47	Assoalho Bucal	Leve
25	M	54	Lábio inferior	Leve
26	M	73	Lábio inferior	Leve
27	F	55	Língua ( látero-posterior )	Intensa
28	M	...	Assoalho bucal, língua	Intensa
29	M	55	Palato mole	Intensa
30	M	58	Trígono, orofaringe, língua	Intensa
31	M	57	Língua	Intensa
32	M	70	Lábio inferior	Intensa
33	M	49	Assoalho bucal, ventre língua	Intensa
34	M	...	Língua (região posterior)	Intensa
35	M	54	Palato mole,	Intensa
36	M	41	Língua, orofaringe	Intensa
37	F	70	Palato mole, língua	Intensa
38	M	42	Corpo mandibular, orofaringe	Intensa
39	F	27	Lábio inferior	Intensa
40	F	77	Lábio inferior	Intensa
41	M	57	Lábio inferior	Intensa

## ANEXO 5

Gradação histológica, sexo e idade dos pacientes, localização da lesão e densidade de miofibroblastos dos casos de leucoplasia do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUC Minas utilizados nesse trabalho.

<b>Amostra</b>	<b>Gradação</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Localização da lesão</b>	<b>Imunomarcção</b>
1	A/L	M	42	Rebordo alveolar	Ausente
2	A/L	M	34	Mucosa jugal	Ausente
3	A/L	F	...	Rebordo alveolar	Ausente
4	A/L	M	47	Mucosa jugal	Ausente
5	A/L	M	37	Lábio inferior	Ausente
6	A/L	F	48	Mucosa jugal	Ausente
7	A/L	M	47	Rebordo alveolar	Ausente
8	A/L	F	...	Fundo vestibulo	Ausente
9	A/L	M	64	Rebordo alveolar	Ausente
10	A/L	M	62	Lábio inferior	Ausente
11	A/L	M	50	Rebordo alveolar	Ausente
12	A/L	M	...	Lábio inferior	Ausente
13	A/L	M	79	Rebordo alveolar	Ausente
14	M/S/C	F	80	Rebordo e trígono	Ausente
15	M/S/C	F	46	Assoalho bucal	Ausente
16	M/S/C	M	63	Palato duro	Ausente
17	M/S/C	F	52	Língua	Ausente
18	M/S/C	M	55	Rebordo inferior	Ausente
19	M/S/C	M	...	Palato duro	Ausente
20	M/S/C	F	35	Palato mole	Ausente
21	M/S/C	F	37	Palato duro	Ausente
22	M/S/C	F	42	Mucosa jugal	Ausente
23	M/S/C	F	33	Língua	Ausente
24	M/S/C	M	...	Trígono	Ausente
25	M/S/C	M	62	Assoalho bucal	Ausente
26	M/S/C	F	34	Assoalho bucal	Ausente
27	M/S/C	F	62	Palato mole	Ausente
28	M/S/C	F	78	Língua	Ausente
29	M/S/C	M	81	Língua	Ausente
30	M/S/C	M	49	Lábio inferior	Ausente

A/L – displasia ausente / leve

M/S/C – displasia moderada / severa / carcinoma in situ

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)