

Michele Gassen Kellermann

**Miofibroblastos são Frequentes no Estroma e no Fronte
Invasivo dos Carcinomas Espinocelulares Orais
Onde Controlam o Comportamento Tumoral por
Estimular a Proliferação Celular e a Atividade da
Metaloproteinase de Matriz 2 das Células Tumorais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

**Piracicaba
2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

K286m	Kellermann, Michele Gassen. Miofibroblastos são freqüentes no estroma e no fronte invasivo dos carcinomas espinocelulares orais onde controlam o comportamento tumoral por estimular a proliferação celular e a atividade da metaloproteinase de matriz 2 das células tumorais. / Michele Gassen Kellermann. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007. Orientador: Ricardo Della Coletta. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Fator transformador de crescimento beta. 2. Boca – Câncer. 3. Fibroblastos. 4. Prognóstico. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: Myofibroblasts are frequent in the stroma and invasive front of oral squamous cell carcinomas where they control the tumoral behavior by stimulating cellular proliferation and matrix metalloproteinase 2 activity of the tumor cells

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Transforming growth factors-beta. 2. Mouth cancer. 3. Fibroblasts. 4. Prognosis

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Ricardo Della Coletta, Glauco Issamu Miyahara, Jacks Jorge Junior

Data da Defesa: 27-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata MICHELE GASSEN KELLERMANN aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ricardo Della Coletta", written over a horizontal line.

PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Glauco Assamu Miyahara", written over a horizontal line.

PROF. DR. GLAUCO ASSAMU MIYAHARA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Jacks Jorge Junior", written over a horizontal line.

PROF. DR. JACKS JORGE JUNIOR

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais **Nerci** e **Francisco**, a quem tudo devo, pelo amor e dedicação, por apoiarem minhas escolhas e possibilitarem a realização de meus sonhos. Obrigada por estarem ao meu lado, mesmo distantes, durante toda essa jornada.

Aos meus irmãos, **Francisco** e **Ramon**, pelo apoio, amizade e carinho nesta etapa de minha vida.

Ao meu namorado **Ricardo**, companheiro de todas as horas, todo o meu amor. Obrigada por estar ao meu lado em cada momento e por sempre acreditar que vai dar tudo certo.

Aos meus avós **Armindo** (in memoriam), **Julieta**, **Leonardo** e **Julita** que sempre estarão olhando por mim e torcendo por meu sucesso.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador **Prof. Ricardo Della Colleta**, pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos e pela paciência e dedicação em todas as etapas deste trabalho.

AGRADEÇO

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Aos Profs. Drs. Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Jacks Jorge Júnior e Oswaldo Di Hipólito Júnior, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio pesquisa concedido (2004/10029-7).

Ao **Prof. Dr. Leo Kraether Neto**, da Universidade de Santa Cruz do Sul, por despertar meu interesse pela Patologia e pela grande contribuição em minha formação.

À **Ana Cristina do Amaral Godoy**, técnica do laboratório de patologia, pela realização das reações imunohistoquímicas deste trabalho.

Aos demais funcionários do laboratório de Patologia, **Adriano Luís Martins**, **João Carlos Gomes da Silva Júnior**, **Rosa Maria Fornasier**, **Valéria Alessandra Prado Defavari Franco**, e a funcionária do Orocentro **Aparecida Conceição Campion**, pela prestatividade e colaboração nos momentos difíceis.

À **Dra. Ynês Nobuko Nishimoto**, pela realização das análises estatísticas deste trabalho.

À **Sabrina Daniela da Silva**, pela valiosa contribuição na coleta de dados.

À **Karina Gottardello Zecchin** pela colaboração nos experimentos realizados no laboratório de Bioenergética da Faculdade de Medicina de Campinas-UNICAMP.

Aos meus queridos amigos, **Guillermo** e **Jorge**, exemplos de dedicação, colaboração e generosidade.

Às minhas amigas que sempre torceram por mim, **Ana Lúcia** e **Michelle**, obrigada pelas dicas conversas e encorajamento.

Às minhas grandes amigas **Lays**, **Sandrine** e **Rebeca** por estarem sempre dispostas a me ajudar e por serem responsáveis por muitos dos momentos que lembrarei no futuro com saudades.

À minha querida amiga **Daiana** pelo carinho, atenção e momentos tão descontraídos que passamos juntas.

Aos demais colegas **Marco**, **Érica**, **Kênia**, **Marcelo**, **Andreinha**, **Patrícia**, **Lucielma**, **Lílian**, **Eduardo**, **Dawton**, **Carol**, **Mário**, **Alan**, **Luís** e **Adriele** pela agradável convivência. Em especial a colega **Fernanda** pela amizade e companheirismo.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e compartilharam desta caminhada, que será para sempre um marco em minha vida pessoal e profissional.

“É preferível arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e gloria mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta dos que não conhecem vitória nem derrota”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Miofibroblastos são caracterizados pela expressão de níveis elevados de fatores de crescimento, proteases e proteínas da matriz extracelular, que podem influenciar a progressão tumoral. Recentes estudos encontraram miofibroblastos no estroma de vários tipos de cânceres humanos, incluindo os de mama, rim, fígado, bexiga, cólon e próstata, sendo a presença dos miofibroblastos freqüentemente associada a um pior prognóstico. Os objetivos deste estudo foram avaliar a presença dos miofibroblastos em amostras de mucosa oral normal, leucoplasias com o diagnóstico histológico de displasia e 2 grupos de carcinomas espinocelulares (CEC) orais e correlacionar à presença destas células com as características clínico-patológicas dos tumores. O primeiro grupo foi formado por lesões exclusivamente de língua, enquanto que o segundo grupo foi composto por 38 CECs de várias localizações da cavidade oral. Adicionalmente, nós determinamos *in vitro* o efeito dos produtos da síntese das células de CEC oral sobre a transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, bem como o efeito dos produtos de síntese dos miofibroblastos sobre a proliferação celular e atividade das metaloproteinases de matriz (MMP) nas linhagens celulares de CEC oral. A análise imunohistoquímica revelou a ausência dos miofibroblastos em amostras de mucosa oral normal e em lesões leucoplásicas com o diagnóstico histológico de displasia. Em contraste, miofibroblastos foram encontrados no estroma e/ou frente invasivo de aproximadamente 60% das amostras de CEC oral. No primeiro grupo, a presença abundante dos miofibroblastos no estroma ou frente invasivo do tumor correlacionou significativamente com o estágio clínico N,

invasão linfática e vascular, presença de metástases histologicamente confirmadas em linfonodos e infiltração extra-capsular de metástases linfonodais. Presença abundante dos miofibroblastos foi também correlacionada com uma menor sobrevida global dos pacientes e com um maior potencial proliferativo das células tumorais. No segundo grupo de CECs orais, a presença abundante dos miofibroblastos correlacionou significativamente com o estágio clínico N, presença de células tumorais nas margens da peça cirúrgica e recorrência regional. Utilizando 4 linhagens celulares de CEC oral e 3 linhagens de fibroblastos de mucosa oral normal, nós demonstramos que as células tumorais induzem a transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos e que este evento é dependente da secreção de fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1) pelas células tumorais. Adicionalmente, nós demonstramos que os miofibroblastos secretam fatores que estimularam significativamente a proliferação celular e a produção de MMP-2 pelas linhagens celulares de CEC oral. Os resultados deste estudo sugerem que durante a progressão tumoral, as células neoplásicas secretam TGF- β 1 que promove a transdiferenciação dos miofibroblastos, e por sua vez, miofibroblastos secretam fatores que induzem a proliferação celular e a produção de MMP-2 pelas células neoplásicas, favorecendo o crescimento e a invasão tumoral.

Palavras chaves: Carcinomas espinocelulares orais, Miofibroblastos, Características clínico-patológicas, Proliferação celular, Metaloproteinases de Matriz.

ABSTRACT

Myofibroblasts are characterized by the expression of elevated amounts of growth factors, proteases and extracellular matrix, which may influence the tumor progression. Recent studies have detected myofibroblasts in the stroma of several tumors, including those of breast, kidney, liver, bladder, colon and prostate, being the presence of those cells associated with a worse prognosis for the patient. The goals of this study were to evaluate the presence of myofibroblasts in samples of normal oral mucosa, pre-malignant leucoplakia, and 2 groups of squamous cell carcinomas (SCC), and to determine whether their presence is associated with clinicopathological features of the tumors. The first group was composed exclusively by tongue lesions, whereas the second group was formed by 38 SCCs of several sites of the oral cavity. We also investigated *in vitro* the mutual paracrine effects of tumor cells and myofibroblasts on fibroblast-myofibroblast transdifferentiation and tumor cell proliferation and production of matrix metalloproteinases (MMP). Immunohistochemical analysis showed the lack of myofibroblasts in the stroma of normal oral mucosa and pre-malignant oral leucoplakias. In contrast, ~60% of the SCCs contained myofibroblasts in the tumor stroma and/or deep invasive front of the tumor. In the first group, the abundant presence of myofibroblasts in the stroma or deep invasive front significantly correlated with N stage, vascular and lymphatic invasion, histopathologically confirmed lymph node metastasis, and extracapsular spread of lymph node metastasis. The abundant presence of myofibroblasts was also correlated with a shorter patient's survival and the proliferative potential of the tumor cells. In the

second group of oral SCCs, the abundant presence of myofibroblasts correlated significantly with N stage, presence of tumor cells at the surgical margins, and regional recurrence. Using 4 oral SCC cell lines and 3 primary oral normal fibroblasts (ONF) from buccal mucosa, we demonstrated that tumor cells induced transdifferentiation of ONFs to myofibroblasts via secretion of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1). Additionally, we demonstrated that transdifferentiated myofibroblasts secreted factors that significantly stimulated the cellular proliferation and production of MMP-2 by the oral SCC cell lines. The results of this study suggest that during tumor invasion SCC-derived TGF- β 1 promote fibroblast to myofibroblast transdifferentiation, and in turn, myofibroblasts synthesize factors that induce cellular proliferation and production of MMP-2 by the tumor cells, favoring tumor growth and invasion.

Key words: Oral squamous cell carcinomas, Miofibroblastos, Clinicopathological features, Cellular proliferation, Matrix metalloproteinases.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Carcinoma Espinocelular Oral	3
2.2. Estroma Tumoral	10
2.3. Miofibroblastos	18
3. PROPOSIÇÃO	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Aprovação do Comitê de Ética	29
4.2. Amostras para a Análise Imunohistoquímica	29
4.3. Análise Imunohistoquímica de α -SMA e Ki-67	30
4.4. Cultura de Células	35
4.5. Preparo do Meio de Cultura Condicionado por Células de CEC Oral e Miofibroblastos	37
4.6. Análise de Western Blot	38
4.7. Imunofluorescência	40
4.8. Análise Semi-Quantitativa de RT-PCR	40
4.9. Citometria de Fluxo	42
4.10. Índice de Incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU)	43
4.11. Índice Imunocitoquímico da Expressão de Ki-67	43
4.12. Análise Zimográfica	44
4.13. Caracterização das MMPs por Imunoprecipitação	45
4.14. Análise Densitométrica	45
4.15. Análise Estatística	46

5. RESULTADOS	47
5.1. Avaliação Imunohistoquímica da Presença dos Miofibroblastos no Estroma de CECs Orais	47
5.2. Correlação entre a Presença dos Miofibroblastos e as Características Clínico-Patológicas dos Tumores	48
5.3. Meio Condicionado por Células de CEC Oral Induz a Transdiferenciação dos FMN em Miofibroblastos	57
5.4. Meio Condicionado por Células de CEC oral Induz a Transdiferenciação dos Miofibroblastos Através da Ação de TGF- β 1	58
5.5. Meio Condicionado por Miofibroblastos Estimula a Proliferação das Células de CEC Oral	60
5.6. Meio Condicionado por Miofibroblastos Induz Significativamente a Produção de MMP-2 pelas Células CEC Oral	61
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
9. ANEXO	111

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias são formadas por células tumorais envoltas em um estroma constituído por vasos sangüíneos, matriz extracelular (MEC), células inflamatórias e do sistema imune, fibroblastos e, ocasionalmente, miofibroblastos (POWELL *et al.*, 2005). Embora antigamente o estroma tenha sido considerado apenas como um tecido de suporte para as células neoplásicas, atualmente existem inúmeras evidências que suportam o seu papel na promoção do fenótipo maligno. Alterações no estroma são freqüentes em muitos tipos de neoplasias, incluindo os carcinomas espinocelulares (CEC) orais.

Miofibroblastos são células híbridas que adquirem a capacidade de expressar a isoforma α da actina de musculatura lisa (α -SMA) e são caracterizados pela intensa síntese de proteínas da MEC, fatores de crescimento e proteases (ORIMO & WEINBERG, 2006; DESMOULIÈRE *et al.*, 2004). Estas células estão presentes fisiologicamente no tecido conjuntivo em pequenas populações de quase todos os órgãos, particularmente em locais onde a força mecânica é necessária (DESMOULIÈRE *et al.*, 2004), e patologicamente em condições como cicatrizes hipertróficas, fibromatoses, doenças fibro-contráteis e neoplasias (POWELL *et al.*, 2005; DESMOULIÈRE *et al.*, 2004; GAILIT *et al.*, 2001). A presença dos miofibroblastos em cânceres de mama correlaciona com um prognóstico desfavorável para os pacientes afetados por este tipo de neoplasia (OFFERSEN *et al.*, 2003). Adicionalmente, os miofibroblastos são considerados os principais componentes do estroma dos carcinomas hepáticos, onde podem

influenciar a invasão das células tumorais (DESMOULIÈRE *et al.*, 2004). A presença dos miofibroblastos também foi demonstrada em CECs da região de cabeça e pescoço (KOJC *et al.*, 2005; BARTH *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* demonstraram que os produtos derivados da síntese dos miofibroblastos podem modular inúmeros eventos biológicos associados ao fenótipo maligno, incluindo crescimento, diferenciação, adesão, migração e invasão das células tumorais (BAGLOLE *et al.*, 2006; ORIMO *et al.*, 2005; POWELL *et al.*, 2005; MUKARATIRWA *et al.*, 2005; DE WEVER *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 2004; POURREYRON *et al.*, 2003; KUNZ-SCHUGHART & KNUECHEL *et al.*, 2002). O único estudo que analisou o papel dos miofibroblastos nos CECs orais demonstrou que os miofibroblastos produzem níveis elevados do fator de crescimento de hepatócito/fator de dispersão (HGF/SF) que induz significativamente a migração e invasão das células tumorais no sistema “matrigel/transwell”. Estes autores também demonstraram que os miofibroblastos se concentram nas margens invasivas do tumor.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a presença de miofibroblastos em amostras de mucosa oral normal, leucoplasias orais com diagnóstico histológico de displasia e CECs orais e correlacionar a presença destas células com as características clínico-patológicas dos tumores. Adicionalmente, nós analisamos *in vitro* o papel dos produtos de síntese das células de CEC oral na transdiferenciação dos fibroblastos de mucosa normal em miofibroblastos, bem como o efeito dos produtos de síntese dos miofibroblastos na proliferação celular e produção de MMP-2 e MMP-9 pelas células tumorais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

O carcinoma espinocelular (CEC), também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, é uma neoplasia maligna derivada da camada espinhosa do epitélio pavimentoso estratificado, que representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral (COTRIM *et al.*, 2001). Os CECs são os tumores mais prevalentes não apenas na cavidade oral, mas em todo o organismo. No Brasil, a incidência é considerada uma das mais altas do mundo, estando entre os 7 tipos de câncer mais comuns que acometem os homens e entre os 8 mais comuns que atingem as mulheres (INCA, 2006). De acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2006, a incidência de CEC oral foi de aproximadamente 10.060 casos para homens e de 3.410 para mulheres (INCA, 2006).

Um grande número de fatores contribui para o desenvolvimento do CEC oral, contudo, o consumo de cigarro e álcool encabeçam esta lista. Outro ponto interessante é que existem fortes evidências para uma relação entre dose e tempo de exposição dos carcinógenos encontrados no cigarro e álcool para o desenvolvimento do CEC oral (BSOUL *et al.*, 2005; SCULLY *et al.*, 2000). Todas as formas de fumo estão ligadas à etiologia do CEC oral (REGEZI & SCIUBBA, 2000). A fumaça do tabaco é uma mistura composta por mais de 5 mil elementos diferentes e muitos destes são carcinógenos, capazes de induzir mutações no material genético celular, ou pró-carcinógenos, que durante o seu metabolismo induzem a formação de substâncias nocivas. Entre estas substâncias encontram

se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitrosaminas, aldeídos e aminas aromáticas (SCULLY *et al.*, 2000). O álcool é também considerado um fator de risco a vários tipos de câncer, incluindo o CEC oral. Contudo, o mecanismo pelo qual o álcool atua neste processo ainda é incerto. Embora o álcool seja conhecido por não ser mutagênico, carcinogênico ou clastogênico, os produtos de seu metabolismo, principalmente os acetaldeídos, são potentes produtores de radicais livres, causando mutações no DNA. Para o metabolismo do álcool são necessárias duas enzimas presentes no fígado e na mucosa do trato digestivo superior, incluindo a cavidade oral. A primeira enzima, a álcool desidrogenase oxida o etanol tendo como produto o acetaldeído, uma substância citotóxica que produz radicais livres e mutações no DNA. Em seguida, a enzima aldeído desidrogenase atua transformando o acetaldeído em água e gás carbônico, inócuos a célula (PÖSCHL & SEITZ, 2004; SCULLY *et al.*, 2000). Assim, se as células apresentarem uma deficiência no metabolismo do acetaldeído ou se são submetidas a doses de álcool em quantidades e frequência além de sua capacidade de metabolismo, pode ocorrer acúmulo de acetaldeído nocivo à célula (PÖSCHL & SEITZ, 2004).

A radiação solar, particularmente os raios ultravioletas, é a principal causa de carcinomas de pele, sendo também responsável pela etiologia dos CECs do lábio, principalmente inferior (BUSICK *et al.*, 2005). Dois mecanismos podem estar envolvidos na indução do câncer de pele e lábio inferior por raios UV: alterações no DNA pela formação de dímeros de pirimidina e supressão imunológica (COTRAN *et al.*, 2005). Pesquisas indicam que a exposição acumulativa e

excessiva ao sol durante os primeiros 10 a 20 anos de vida aumenta muito o risco de câncer de pele, mostrando que a infância é uma fase particularmente vulnerável aos efeitos nocivos do sol sobre este órgão (INCA, 2006). A associação do CEC oral com outros fatores etiológicos, como sífilis (infecção pelo *Treponema pallidum*), infecções virais, estado sistêmico do paciente, incluindo desnutrição e anemia ferropriva e deficiência de algumas vitaminas, tem sido sugerida (PELUCCHI *et al.*, 2003; SCIUBBA, 2001; HERMSEN *et al.*, 2001). A radiação X pode causar cânceres orais, principalmente como efeito colateral após tratamentos radioterápicos, resultando em carcinomas orais ou sarcomas (HASHIBE *et al.*, 2005; FLETCHER *et al.*, 2000). O DNA do vírus papiloma humano (HPV) tem sido freqüentemente encontrado no câncer bucal, contudo não é clara sua relação com a etiologia deste tumor (para revisão ver SYRJANEN, 2005).

Os agentes carcinogênicos ou pró-carcinogênicos atuam na célula epitelial normal, causando mutações no DNA. O acúmulo destas mutações altera grupos de genes que desempenham características específicas na célula, sendo estes os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor, as telomerasas, os genes que regulam o processo de apoptose e os genes do sistema de reparo do DNA (COLETTA *et al.*, 2002). As mais freqüentes aberrações genéticas que têm sido identificadas no CEC oral estão localizadas nos cromossomos 3, 9, 11, 13 e 17 (MASSANO *et al.*, 2006). Mutações no gene *p53* são as alterações genéticas mais comuns em cânceres humanos, incluindo os de boca (ICHWAN *et al.*, 2006). Alterações em proto-oncogenes como *Int*, *ERB-B* e *RAS* também podem ser

encontradas, sendo que mutações em *H-ras* estão presentes em aproximadamente 2/3 dos CECs orais induzidos por carcinógenos químicos como o cigarro (LIU *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 1997). Adicionalmente, também são relatadas mutações em proto-oncogenes reguladores de apoptose, sendo o *bcl-2* o mais estudado em neoplasias de orais (de VICENTE *et al.*, 2006). Para que o tumor seja capaz de invadir os tecidos adjacentes e produzir metástases, suas células devem degradar os componentes da MEC, assim os genes que transcrevem as principais enzimas ligadas a degradação MEC, as MMPs, devem estar ativos (ZHANG *et al.*, 2006).

O CEC oral pode se apresentar clinicamente como uma massa exofítica com ou sem ulceração, uma lesão branca (leucoplásica), avermelhada (eritroplásica) ou eritro-leucoplásica. O lábio inferior representa cerca de 30% dos cânceres da cavidade oral. O CEC de língua é a lesão maligna intrabucal mais comum e representa cerca de 40% dos carcinomas orais. É seguido pelo assoalho bucal, que representa 20% dos sítios do tumor. A gengiva, rebordo alveolar, palato mole e mucosa jugal são os locais com menores frequências de acometimento por CEC oral (COTRIM *et al.*, 2001; REGEZI & SCIUBBA, 2000).

O estadiamento do câncer é baseado no tamanho da lesão primária, em sua dispersão para linfonodos regionais e na presença ou ausência de metástases. O sistema foi desenvolvido pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) e é denominado de sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. A letra T representa o tamanho e as características do tumor primário, N as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que

o tumor se localiza e M presença ou ausência de metástases à distância. O estadiamento TNM varia para cada forma específica de câncer, mas existem princípios gerais aonde estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1. Uma lesão *in situ* é classificada como Tis, e com o aumento no tamanho do tumor a classificação varia de T1 a T4. N0 indica que não há linfonodos afetados, enquanto N1 a N3 indicam um número crescente de linfonodos afetados por metástases. M0 representa a ausência de metástases à distância e M1 a presença de metástases (COTRAN *et al.*, 2005). O símbolo “X” é utilizado, substituindo o número referente a graduação, quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada.

Histologicamente as lesões de CEC oral se caracterizam por uma proliferação epitelial com células espinhosas pleomórficas, com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e figuras mitóticas atípicas. A proliferação epitelial freqüentemente mostra um padrão invasivo ao tecido conjuntivo subjacente, formando ninhos ou ilhas de células epiteliais malignas (REGEZI & SCIUBBA, 2000). Focos de células queratinizadas isoladas ou massas esféricas de queratina em profundidade (pérolas de queratina) podem ser observados. Segundo o grau de diferenciação celular, os CECs orais podem ser classificados em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e indiferenciado (pouco diferenciado). Esta graduação é feita de acordo com os graus de diferenciação, padrão de invasão, pleomorfismo celular, atividade mitótica e presença de processo inflamatório (NEVILLE *et al.*, 2004). O CEC oral também apresenta algumas variantes como o carcinoma escamoso verrucoso, o carcinoma

escamoso papilífero, o carcinoma adenoescamoso, o carcinoma de células fusiformes e o carcinoma basalóide escamoso (para revisão ver COTRIM *et al.*, 2001).

Os carcinomas bem diferenciados representam à maioria dos CECs orais e se assemelham ao tecido epitelial escamoso normal. Estes tumores apresentam freqüentemente um padrão sólido, contendo proporções variadas de células escamosas e basais, com evidente queratinização e poucas figuras de mitoses (ANNEROTH *et al.*, 1987). Geralmente estes carcinomas possuem crescimento lento e são menos invasivos quando comparados aos carcinomas indiferenciados. Apresentam margens definidas sem invasão vascular e com evidente resposta inflamatória linfomonoplasmocitária (ANNEROTH *et al.*, 1987). Metástases regionais e, eventualmente, à distância ocorrem nos casos mais avançados (FLETCHER *et al.*, 2000). O prognóstico do CEC com esta diferenciação é bastante favorável. Os carcinomas moderadamente diferenciados exibem células espinhosas bem evidentes com acentuado pleomorfismo nuclear, grande número de mitoses (incluindo mitoses atípicas), hipercromatismo, nucléolos bem evidentes e poucas pérolas de queratina, embora possa ocorrer queratinização de células individuais (CAWSON *et al.*, 1995). Geralmente são mais invasivos e mostram crescimento mais rápido que os carcinomas bem diferenciados, o que pode tornar o prognóstico pior nos casos não diagnosticados precocemente (FLETCHER *et al.*, 2000). Os carcinomas indiferenciados apresentam pouca ou nenhuma evidência de queratinização e as células neoplásicas mostram alto grau de pleomorfismo e hipercromasia. Apresentam um crescimento difuso com as células

demonstrando elevado potencial mitótico. Os CECs indiferenciados apresentam um comportamento bastante agressivo, caracterizado pela alta capacidade de invasão e de lançar metástases (FLETCHER *et al.*, 2000; ANNEROTH *et al.*, 1987).

Os CECs orais se caracterizam por invasão local, sendo que as metástases ocorrem mais freqüentemente nos linfonodos cervicais ipsilaterais (VARTANIAN *et al.*, 2004). Embora não ocorram no estágio inicial, o atraso na procura por tratamento faz com que 21% dos pacientes apresentem metástases cervicais ao diagnóstico (NEVILLE & DAY, 2002). Devido a capacidade de disseminação local, sintomas como dor, disfagia e sangramentos podem ser encontrados nos estágios mais avançados da doença. Metástases a distância não são freqüentes, mas quando presentes são encontradas principalmente nos pulmões, ossos, fígado e mediastino (SCHWENDER *et al.*, 2002). A taxa de sobrevida em cinco anos para pacientes portadores de CEC oral está entre as mais baixas quando comparada com as outras neoplasias malignas (MARGOTTA & CAPOGRECO, 2003), permanecendo inalterada durante as duas últimas décadas, mesmo com os progressos nos métodos terapêuticos e de diagnóstico que vem ocorrendo na oncologia clínica (MILLER *et al.*, 2006).

O tratamento dos CECs orais depende da localização, estadiamento clínico e condições físicas do paciente, sendo realizado principalmente através de cirurgia e/ou radioterapia. Quimioterapia é utilizada de forma paliativa nos casos avançados (NEVILLE & DAY, 2002). Apesar dos benefícios ao paciente, o tratamento cirúrgico pode provocar seqüelas estéticas e/ou funcionais do aparelho

ortognático, enquanto o tratamento radioterápico pode promover alterações irreversíveis na pele, mucosa, ossos, glândulas salivares e dentes da área irradiada (LOPES *et al.*, 1998). As recidivas local e regional após a terapia dos CECs orais em estágios avançados ainda permanecem um sério problema. Embora o estadiamento e outras variáveis clínico-patológicas forneçam algumas informações sobre o prognóstico, existe uma clara necessidade de se identificar melhores marcadores biológicos, que possam auxiliar na identificação de pacientes de alto risco para o desenvolvimento de recidivas locais, regionais e à distância (HAFFTY, 2005).

2.2. ESTROMA TUMORAL

As neoplasias benignas e malignas apresentam dois componentes básicos: as células neoplásicas em proliferação e o estroma de sustentação que fornece entre muitas coisas o aporte sangüíneo ao tumor (COTRAN *et al.*, 2005). Existem várias evidências demonstrando que o estroma tumoral exerce um papel importante para o crescimento e progressão tumoral (GALIE *et al.*, 2005; KUNZ-SCHUGHART *et al.*, 2002). Durante a progressão para carcinoma invasivo, as células neoplásicas ativam as células do tecido conjuntivo adjacente, gerando um estroma alterado que pode influenciar as células tumorais (BAGLOLE *et al.*, 2006). O estroma é formado por componentes da MEC, células imunes e inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos e um subtipo específico de fibroblasto, chamado de miofibroblastos (BAGLOLE *et al.*, 2006; ZIGRINO *et al.*, 2005; KYUNG-WHAN *et al.*, 2005; MUELLER *et al.*, 2004). Teoricamente, todos estes componentes

podem influenciar criticamente a carcinogênese e o fenótipo maligno nas múltiplas etapas do tumor. Embora os papéis das células imunológicas, inflamatórias e endoteliais na imunidade e angiogênese associada ao desenvolvimento tumoral estejam bem descritos (para revisão ver WITZ, 2006), os papéis e a origem dos miofibroblastos no câncer não estão completamente elucidados até o presente momento.

Antes considerada apenas como um suporte para as células, a MEC é agora melhor reconhecida como um importante regulador de inúmeras atividades celulares (ZIOBER *et al.*, 2006). A MEC é constituída por diferentes combinações de proteínas fibrosas e substância fundamental. A substância fundamental é um complexo viscoso e altamente hidrofílico de macromoléculas aniônicas (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e glicoproteínas multiadesivas (fibronectina, por exemplo) que se ligam entre si e com os receptores (integrinas) presentes na superfície das células, fornecendo deste modo força tênsil e rigidez à MEC (ZIOBER, *et al.*, 2006; MUELLER *et al.*, 2004). Atuando como ligante para integrinas, as moléculas da MEC têm demonstrado serem importantes para o desenvolvimento tecidual, manutenção do tecido adulto, cicatrização de feridas e oncogênese (ZIOBER *et al.*, 2006). Mudanças na composição da MEC por alterações na expressão e secreção contribuem para o desenvolvimento do crescimento hiperplásico e tumoral (ARIZTIA *et al.*, 2006). Integrinas, colágenos, lamininas e fibronectinas são os principais componentes da MEC associadas ao desenvolvimento e progressão do CEC oral (ZIOBER *et al.*, 2006). Adicionalmente, alterações na expressão de componentes da MEC e em seus

receptores celulares são essenciais para a conversão de lesões malignizáveis orais em cânceres (ZIOBER *et al.*, 2006).

Colágenos constituem uma família de proteínas que exercem principalmente funções estruturais. Os colágenos são produzidos por diferentes tipos celulares e se distinguem pela sua composição química, distribuição e função (LEITINGER & HOHENESTER, 2006). Os colágenos tipo I e III são os principais constituintes do tecido conjuntivo, enquanto os colágenos tipo IV e XVII são encontrados na membrana basal, uma fina camada especializada de MEC que separa o epitélio do tecido conjuntivo. A expressão da maioria destas isoformas tem sido relatada ao CEC oral (ZIOBER *et al.*, 2006). Aumento na expressão de colágeno tipo I tem sido relacionada com a transformação maligna de queratinócitos, sendo encontrada principalmente em CECs orais bem diferenciados (STENBEACK *et al.*, 1997). Adicionalmente, foi demonstrado que a perda da expressão de colágeno tipo XVII representa um passo inicial para a transformação do CEC *in situ* em invasivo (FRANZKE *et al.*, 2003; PARRIKA *et al.*, 2003).

Fibronectina é uma glicoproteína sintetizada principalmente por fibroblastos e células epiteliais. Esta molécula apresenta sítios de ligação para integrinas e proteínas fibrosas e não-fibrosas da MEC, e interações entre fibronectina e estas moléculas mantêm o equilíbrio entre os tecidos epitelial e conjuntivo (HAN *et al.*, 2006). Análises imunohistoquímica e por microarray de amostras de CEC oral têm demonstrado que a fibronectina é super-expressa em CECs de boca, particularmente nas margens invasivas do tumor (ZIOBER *et al.*, 2001; KAPILA *et*

al., 1997). Um estudo recente demonstrou que a fibronectina é capaz de induzir um fenótipo metastático nas linhagens celulares de CEC oral (ZHANG *et al.*, 2004). Interessantemente, superexpressão de fibronectina em CECs orais é associada com a perda de expressão de E-caderina e uma indução de fenótipo invasivo das células tumorais (MARGULIS *et al.*, 2006).

Lamininas são glicoproteínas de alta massa molecular formadas pela oligomerização de 3 subunidades, sendo uma α , uma β e uma γ (SUZUKI *et al.*, 2005). Até o momento, 12 diferentes isoformas de laminina foram descritas (NGUYEN & SENIOR, 2006). Lamininas participam de inúmeros eventos biológicos cruciais, incluindo proliferação, adesão e migração celular e angiogênese (ZIOBER *et al.*, 2006). Está bem estabelecido que entre todas as moléculas da MEC, a laminina exerce um papel fundamental no desenvolvimento e progressão de CEC oral. Entre as várias atividades associadas à oncogênese, a expressão de laminina está intimamente associada a um fenótipo maligno metastático, devido à indução da síntese de proteases e uma redução na adesão entre as células tumorais (ENGBRING & KLEINMAN, 2003).

As integrinas são uma família de receptores transmembrânicos formadas por 2 subunidades heterodiméricas (α e β), ligadas de forma não-covalente (ECKES *et al.*, 2006). As vias de sinalização das integrinas controlam o crescimento, diferenciação e morte celular e alterações no citoesqueleto celular, resultando na regulação da migração e invasão (CHARALABOPOULOS *et al.*, 2005). Está bem estabelecido que a migração e invasão celular não dependem

apenas dos níveis de expressão de integrinas, mas também da afinidade de ligação aos seus ligantes (ZIOBER *et al.*, 2001; HYNES, 1992). O principal receptor encontrado no CEC oral é o $\alpha v \beta 6$ (THOMAS *et al.*, 2006). A constante observação que $\alpha v \beta 6$ não é encontrado em tecidos orais normais, mas é super-expresso em CECs orais, particularmente no fronte invasivo dos tumores, é sugestivo que esta integrina promove a invasão das células tumorais (REGEZI *et al.*, 2002). *In vitro*, Thomas *et al.* (2001) demonstraram que a superexpressão de $\alpha v \beta 6$ em linhagens de CEC oral induz a invasão celular no sistema “matrigel/transwell” via estimulação de MMP-9.

Outros importantes componentes do estroma tumoral são as células inflamatórias e do sistema imune. A abundância de células inflamatórias e do sistema imune no estroma adjacente ao tumor foi relatada por patologistas já na metade do século XIX, ainda que o papel benéfico ou nocivo destas células na progressão tumoral permaneça em discussão (MUELLER & FUSENIG, 2004; BALKWILL & MANTOVANI, 2001). Enquanto é explícito que algumas células apresentam uma intensa atividade anti-tumoral, como por exemplo, as células “natural-killer” (NK), outras, incluindo os monócitos e macrófagos, o papel parece ser dúbio, isto é, podem inibir ou estimular a atividade tumoral (MUELLER & FUSENIG, 2004).

Células do sistema imune adaptativo, incluindo linfócitos B e T, têm demonstrado inibir os estágios mais tardios do desenvolvimento neoplásico, por afetar negativamente o crescimento e a disseminação dos tumores primários

(MUELLER & FUSENIG, 2004). Os estudos que suportam este conceito, também conhecido como teoria da vigilância imune, têm demonstrado que a infiltração do estroma tumoral por subgrupos específicos de linfócitos T pode ser benéfica e retardar o crescimento tumoral (OSHIKIRI *et al.*, 2003; FUNADA *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos que avaliaram as funções das células imunes durante os estágios iniciais do desenvolvimento neoplásico demonstraram que falhas no recrutamento destas células para o ambiente neoplásico local inibem a remodelação tecidual e os eventos angiogênicos necessários para a progressão tumoral (TLSTY & COUSSENS, 2006; VISSER & COUSSENS, 2005). Juntos, estes estudos indicam que cada estágio do desenvolvimento neoplásico é regulado de forma específica, e que enquanto a ativação de células imunes adaptativas em estágios tumorais tardios demonstra ser benéfica por bloquear as células malignas, a ativação durante os estágios iniciais resulta em efeitos contrários. Adicionalmente, é bem estabelecido que inúmeras neoplasias se originam em tecidos contendo um processo inflamatório crônico (THUN *et al.*, 2004; CLEVERS, 2004; COUSSENS & WERB, 2002; SHACTER & WEITZMAN, 2002). Os melhores exemplos da relação entre inflamação crônica e o câncer são as associações entre a infecção pelo *Helicobacter pylori* e o câncer de esôfago (TLSTY & COUSSENS, 2006) e a síndrome inflamatória de Bowel e o câncer de cólon (SHACTER & WEITZMAN, 2002).

Uma ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento, os quais são secretados em processos inflamatórios, estão associados ao desenvolvimento e progressão tumoral (JENG *et al.*, 2003). Interleucina 6 (IL-6) e cicloxigenases 1 e 2

(COX1 e COX2), enzimas que convertem o ácido aracdônico em prostaglandinas, são os principais componentes inflamatórios associados aos CECs orais (JENG *et al.*, 2003). Uma forte e positiva associação entre a expressão de IL-6 e a graduação histológica dos CECs orais foi observada (JABLONSKA *et al.*, 1997). Em CECs orais foi demonstrado que IL-6 controla a proliferação e motilidade das células tumorais, além de contribuir para o desenvolvimento da caquexia em pacientes terminais (JOHN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2002). VAIRACTARIS *et al.* (2006) estudaram a presença de polimorfismo no gene que codifica a IL-6 em amostras de pacientes com CEC oral. Estes autores observaram que o polimorfismo gênico em IL-6 correlacionou significativamente com inúmeros aspectos clínico-patológicos, sugerindo uma forte associação com a oncogênese oral.

Angiogênese é o processo de formação de vasos sangüíneos. Muitos processos normais e patológicos necessitam da angiogênese (DONG *et al.*, 2006). Por exemplo, foi demonstrado que tumores sólidos não crescem mais que 2 a 3 mm de diâmetro sem a presença de um suprimento sangüíneo adequado (FOLKMAN & HANNAHAN, 1991). A angiogênese necessita de muitas etapas, como proliferação, migração e organização das células endoteliais em novos vasos (TANDLE *et al.*, 2004). Estas várias etapas são controladas por um balanço entre os fatores pró- e anti-angiogênicos, que são liberados por células endoteliais, monócitos, células musculares lisas, plaquetas e células tumorais (TANDLE *et al.*, 2004). Em tecidos normais, os vasos sangüíneos são quiescentes e as células geralmente secretam altos níveis de inibidores e baixos níveis de

indutores angiogênicos. Para que as células se tornem malignas, elas devem adquirir a habilidade de induzir angiogênese. Para isto, elas devem aumentar a secreção de fatores pró-angiogênicos e inibir os fatores anti-angiogênicos. O exato mecanismo nesta mudança não está bem estabelecido, contudo a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor devem exercer um importante papel (JIN *et al.*, 2006).

As células tumorais e endoteliais liberam fatores pró-angiogênicos como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento transformante α e β (TGF- α e TGF- β) para mediar a angiogênese (LIU *et al.*, 2006). Estes fatores alteram a homeostase tecidual, agindo de maneira parácrina na estimulação da angiogênese e resposta inflamatória. Estes fatores também podem ativar outras células do estroma (fibroblastos, células musculares lisas, adipócitos e células inflamatórias), levando a secreção adicional de fatores que modulam a angiogênese (MUELLER *et al.*, 2004). A presença de macrófagos no estroma tumoral é um indicador de mau prognóstico em muitos tipos de neoplasias, incluindo melanomas, gliomas e cânceres de mama (HASINA & LINGEN, 2001), devido entre outras coisas a sua capacidade de induzir angiogênese. É bem estabelecido que uma vez presentes no estroma tumoral, os macrófagos passam a secretar vários fatores pró-angiogênicos, incluindo bFGF, VEGF, TNF- α e IL-8 (HASINA & LINGEN., 2001). Da mesma forma, os CECs orais também necessitam induzir direta ou

indiretamente a formação de novos vasos sanguíneos para a expandir e metastizar (HANNEN & RIEDIGER, 2004).

Estudos têm demonstrado que o crescimento tumoral pode ser inibido por uma variedade de agentes que tem em comum a habilidade de inibir a angiogênese (DIAZ-RUBIO, 2006; COONEY *et al.*, 2006). Assim, a terapia anti-angiogênica tem se tornado uma modalidade terapêutica bastante atrativa para o tratamento das neoplasias malignas (DREVS & SCHNEIDER, 2006). Várias drogas têm sido testadas, sendo a inibição da atividade de fatores de crescimento angiogênicos e a administração de indutores de necrose vascular a base da terapia anti-angiogênica (LIU *et al.*, 2006). A terapia gênica anti-angiogênese é outra modalidade de tratamento que tem recebido especial atenção no momento. As principais estratégias usadas para este propósito incluem a utilização de RNA de interferência, oligodesoxinucleotídeos antisense e a expressão de genes inibidores de angiogênese (LIU *et al.*, 2006).

2.3. MIOFIBROBLASTOS

Miofibroblastos são células que adquirem a capacidade de expressar a isoforma α da actina de musculatura lisa (α -SMA) e de sintetizar elevados níveis de colágeno e outros componentes da MEC (POWELL *et al.*, 2005). Estas células demonstram características intermediárias entre fibroblastos e células musculares lisas, mas apresentam morfologia similar a de fibroblastos (POWELL *et al.*, 2005; DESMOULIÈRE *et al.*, 2004; GROTENDORST *et al.*, 2004). Miofibroblastos foram

também denominados de fibroblastos peri-tumorais, fibroblastos associados ao carcinoma e fibroblastos ativos do estroma, mas hoje são mais comumente chamados de miofibroblastos (LEWIS *et al.*, 2004). Eles estão presentes como uma pequena subpopulação celular em quase todos os órgãos e são capazes de expressar e secretar uma extensa quantidade de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, hormônios, neurotransmissores, mediadores inflamatórios, proteínas de adesão e proteínas da MEC (ORIMO & WEINBERG, 2006; DESMOULIÈRE *et al.*, 2004).

Os miofibroblastos são caracterizados morfologicamente como células alongadas, fusiformes ou estreladas com núcleo regular e central (MIKE & ÖSTMAN, 2004). Eles apresentam um proeminente citoplasma de microfilamentos de actina (fibras de estresse), um retículo endoplasmático bem desenvolvido e estão conectados uns aos outros através de aderências e junções do tipo gap (MIKE & ÖSTMAN, 2004; TANG *et al.*, 1996; DARBY *et al.*, 1994). Estas células também estabelecem contatos com os componentes da MEC através de fibronexus, que é um complexo transmembrânico formado por actina, integrina e fibronectina (POWELL *et al.*, 1999; EYDEN *et al.*, 1993).

Miofibroblastos são identificados através da expressão de α -SMA (DESMOULIÈRE *et al.*, 2004). Este marcador citoplasmático é encontrado adicionalmente em outros 2 tipos celulares: células musculares lisas e células mioepiteliais. A presença de outros marcadores como laminina, desmina, calponina, miosina de músculo liso, caldesmonina e proteína de ativação de

fibroblastos tem sido utilizada para caracterizar os miofibroblastos, mas o padrão de expressão é variável e dependente principalmente da origem, localização e condição patológica (MIKE & ÖSTMAN, 2004). Então, α -SMA é o melhor marcador celular para identificação dos miofibroblastos, permitindo monitorar e identificar o comportamento destas células em situações clínicas e patológicas.

Estas células podem ser encontradas em inúmeras situações, participando tanto de processos fisiológicos quanto patológicos. Miofibroblastos contribuem para o crescimento e diferenciação dos tecidos e órgãos, através de interações com células epiteliais (GAILIT *et al.*, 2001). Também desempenham um importante papel no processo de reparo, através da retração do tecido de granulação e da síntese de MEC, incluindo colágeno, fibronectina e proteoglicanos (GAILIT *et al.*, 2001). Contudo, se estas células persistem, uma quantidade excessiva de colágeno é produzida, resultando em desordens fibróticas, como quelóide e fibroses hepáticas (DESMOULIÈRE *et al.*, 2003; VAQUERO *et al.*, 1999; GUNHAN *et al.*, 1995). Recentemente, nós demonstramos que os miofibroblastos podem estar associados à etiologia dos aumentos gengivais fibróticos observado em pacientes portadores de fibromatose gengival hereditária (BITU *et al.*, 2006).

Os miofibroblastos podem se originar de células tronco-progenitoras da medula óssea ou do tecido mesenquimal, de células da crista neural, de células musculares lisas presentes nos tecidos vascular, uterino e intestinal, ou simplesmente se originar da transdiferenciação dos fibroblastos (POWELL *et al.*, 2005; DESMOULIÈRE *et al.*, 2004). Também existem fortes evidências de que a

transição epitélio-mesênquima represente uma fonte alternativa de miofibroblastos em fibroses renais (DESMOULIÈRE *et al.*, 2004). Membros da família TGF- β , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II) e IL-4 demonstraram ser os principais fatores envolvidos na transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos (POWELL *et al.*, 2005; DESMOULIÈRE *et al.*, 2004).

TGF- β 1 é um peptídeo multifuncional que regula várias atividades celulares, incluindo crescimento e diferenciação celular e expressão e metabolismo de macromoléculas da MEC (HUANG & LEE, 2003). Os efeitos de TGF- β 1 na homeostasia do tecido conjuntivo parecem ser mediados pela ativação dos receptores citoplasmáticos Smads e do fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) (TABIBZADEH, 2002). TGF- β 1 é secretado na MEC como um complexo latente e sua ativação é regulada por proteases, incluindo plasmina, catepsina, MMP-2, MMP-9, entre outras (ANNES *et al.*, 2003). Este peptídeo desempenha um papel fundamental na transdiferenciação dos fibroblastos para miofibroblastos, como revelado pela sua capacidade de super-regular a expressão de colágeno e α -SMA em modelos *in vivo* e *in vitro* (LEWIS *et al.*, 2004). No tecido tumoral, TGF- β 1 pode ser derivado de células epiteliais, células inflamatórias ou dos próprios miofibroblastos (GALLIHER *et al.*, 2006). TUXHORN *et al.* (2002) demonstraram *in vivo* e *in vitro* a participação de TGF- β 1 na conversão dos fibroblastos em miofibroblastos. No modelo *in vitro* de cobaias com câncer de cólon, os autores demonstraram através de imunohistoquímica que as áreas que continham a

presença de miofibroblastos apresentavam uma forte expressão de TGF- β 1. Adicionalmente, em ensaios *in vitro* com anticorpos neutralizantes anti-TGF- β 1 revelaram que a inibição de TGF- β 1 foi acompanhada por uma inibição na proliferação dos fibroblastos intestinais e uma significativa indução na transdiferenciação em miofibroblastos (TUXHORN *et al.*, 2002). Interessantemente, UNTERGASSER *et al.* (2005) demonstraram que fibroblastos de próstata tratados com TGF- β 1 transdiferenciaram em miofibroblastos, como revelado pela aquisição de densos feixes de fibras no citoesqueleto e um aumento na expressão de α -SMA, calponina, e tenascina.

Os achados *in vivo* de que TGF- β 1 induz a transdiferenciação dos miofibroblastos foram confirmados por modelos *in vitro*. *In vitro* foi demonstrado que para ocorrer a conversão dos fibroblastos em miofibroblastos dois fatores são necessários: a ausência de contato entre as células e a presença de TGF- β 1 (ARORA & McCULLOCH, 1994). Quando fibroblastos derivados do intestino, mama, pele, fígado ou próstata em cultura são tratados com TGF- β 1, passam a expressar α -SMA e expandem o retículo endoplasmático rugoso adquirindo morfologia de miofibroblasto (POWELL *et al.*, 2005; DESMOULIÈRE *et al.*, 2004; KUNZ-SCHUGHART & KNUECHEL, 2002). Por outro lado, o tratamento com interferon α ou γ reduz a expressão de α -SMA pelos miofibroblastos (GU *et al.*, 2004). Co-culturas de fibroblastos e células tumorais de diferentes órgãos demonstraram induzir a proliferação celular e a emergência de miofibroblastos (CHEN *et al.*, 2005). Em geral, os miofibroblastos adjacentes aos ninhos de

células neoplásicas expressam grandes quantidades de α -SMA como observado nos carcinomas de mama (SAPPINO *et al.*, 1988), melanoma metastático (TSUKAMOTO *et al.*, 1992) e CEC oral (LEWIS *et al.*, 2004). Apenas uma pequena fração dos miofibroblastos adjacentes ao estroma tumoral expressam desmina e miosina de músculo liso, demonstrando que estas células se originam principalmente da transdiferenciação dos fibroblastos (DESMOULIÈRE *et al.*, 2004).

O papel dos miofibroblastos na evolução do câncer não está completamente compreendido. Inúmeros eventos relacionados à oncogênese, incluindo proliferação, adesão, invasão e migração celular, podem ser regulados pelos produtos da síntese dos miofibroblastos (BAGLOLE *et al.*, 2006; ORIMO *et al.*, 2005; WEVER *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 2004). ORIMO *et al.* (2005) demonstraram que miofibroblastos são capazes de estimular a proliferação das células tumorais em carcinomas invasivos de mama via produção de níveis elevados do fator de crescimento derivado do estroma 1 (SDF-1). Este fator, de forma parácrina, estimula a via do receptor CXCR 4 de indução da proliferação celular. Em adição, o fator SDF-1 estimula a angiogênese nos carcinomas de mama, através do recrutamento de células progenitoras endoteliais. A liberação de PDGF e do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) por miofibroblastos também foram demonstrados estarem associados a uma indução na proliferação das células tumorais (MASS-SZABOWSKI *et al.*, 2001; BRADBURY, 1998; GOKE *et al.*, 1998; SKOBE & FUSENING, 1998). LEWIS e colaboradores (2004)

demonstraram que miofibroblastos secretam níveis elevados de HGF/SF que significativamente estimulam a migração e invasão das células de CEC oral no sistema “matrigel/transwell”. Indiretamente, a secreção de HGF/SF pelos miofibroblastos pode promover a invasão neoplásica através da inibição de E-caderinas (TRUSOLINO *et al.*, 2002). Os miofibroblastos podem também estimular a angiogênese e linfangiogênese através da expressão de fatores pró-angiogênicos como VEGF (ORLANDINI & OLIVEIRO, 2001). Adicionalmente, os miofibroblastos possuem a capacidade de proteger a células malignas da resposta imune do hospedeiro (DE WEVER & MAREEL, 2003). Experimentos *in vitro* com géis de colágeno contendo fibroblastos e miofibroblastos demonstraram que as propriedades de contração e síntese de MEC pelos miofibroblastos dificultam a infiltração das células do sistema imune e inflamatório para dentro do tumor (WEVER & MAREEL, 2003; LIEUBEAU *et al.*, 1999). Então, os miofibroblastos podem prevenir o contato físico entre as células malignas e as células do sistema imune, um fenômeno essencial para a destruição das células tumorais (WEVER & MAREEL, 2003). Achados histológicos de diferentes tipos de neoplasias malignas demonstraram que os tumores que estão associados a uma baixa presença de miofibroblastos apresentaram uma maior reação inflamatória, ao contrário de tumores associados a uma alta presença de miofibroblastos, em que as reações imune e inflamatória foram escassas ou ausentes (OPDENAKKER *et al.*, 1992).

O importante papel dos miofibroblastos no desenvolvimento e promoção dos tumores malignos sugere que a modulação destas células e, conseqüentemente, da reação do estroma possa representar um alvo terapêutico

inexplorado para vários tipos de câncer. Contudo, um melhor entendimento dos mecanismos associados à participação dos miofibroblastos na progressão do câncer é necessário para a criação de estratégias terapêuticas.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

1. Avaliar através de ensaios imunohistoquímicos a frequência de miofibroblastos em mucosa oral normal, leucoplasias orais com o diagnóstico histopatológico de displasia e CECs orais e correlacionar a presença destas células com as características clínico-patológicas dos tumores.
2. Determinar o efeito do meio condicionado por linhagens celulares de CEC oral na transdiferenciação de culturas primárias de fibroblastos de mucosa oral normal em miofibroblastos.
3. Determinar o efeito do meio condicionado por miofibroblastos de mucosa oral na proliferação celular e na produção de MMP-2 e MMP-9 pelas linhagens celulares de CECs orais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aprovação do Comitê de Ética

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos, deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP (processo número 141/2006) (Anexo).

4.2. Amostras para a Análise Imunohistoquímica

Dois grupos de amostras de CEC oral foram utilizados para este propósito. O primeiro grupo foi composto por 83 amostras de CEC de língua, enquanto que o segundo grupo foi formado por 38 lesões provenientes de várias localizações da cavidade oral. As principais características clínico-patológicas destes dois grupos são descritas nas Tabelas 1 e 2. O segundo grupo de carcinomas foi previamente utilizado para análise das correlações entre as características clínico-patológicas dos tumores e as atividades tumorais das enzimas MMP-2 e MMP-9 (YORIOKA *et al.*, 2002). Adicionalmente, foram utilizadas 18 amostras de tecido oral normal e 14 amostras de leucoplasias orais com o diagnóstico histológico de displasia, provenientes do Orocentro.

O estadiamento clínico dos pacientes portadores de CEC oral foi realizado pelo sistema TNM e todos os pacientes foram classificados como M0 no momento do diagnóstico. O tratamento destes pacientes foi realizado no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo. Um fragmento representativo da peça cirúrgica foi

histologicamente processado para colorações de hematoxilina&eosina (H&E) e imunohistoquímica. Os tumores foram histologicamente graduados como descrito previamente por ANNEROTH *et al.* (1987), levando em consideração o grau de queratinização, polimorfismo nuclear, número de mitoses por campo, padrão de invasão, estágio de invasão (profundidade do tumor) e presença de infiltrado inflamatório linfomonoplasmocitário. As presenças de infiltração vascular, linfática e perineural também foram avaliadas. Todos os linfonodos removidos durante o tratamento cirúrgico foram histologicamente avaliados para presença de células tumorais e integridade capsular.

Todos os pacientes foram acompanhados mensalmente após o tratamento e as recorrências foram confirmadas histologicamente. Período livre de doença foi avaliado a partir da data do início do tratamento até a data do diagnóstico da recorrência ou a data da última visita de acompanhamento.

4.3. Análise Imunohistoquímica de α -SMA e Ki-67

As reações de imunohistoquímica para α -SMA e Ki-67 foram realizadas em cortes histológicos de 3 μ m. Os cortes foram diafanizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool, tratados com peróxido de hidrogênio a 3%, seguido por incubação com 10 mM ácido cítrico pH 6.0 no microondas (2 ciclos de 12 min). Depois de lavados com salina tamponada com fosfato (PBS), os cortes foram tratados com 1% albumina sérica bovina (BSA) em PBS por 1 h e incubados com anticorpo monoclonal anti- α -SMA humano (clone 1A4, Dako Corp.,

Carpinteria, CA, EUA) na concentração de 1/400 ou com o anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (clone MIB-1, Dako Corp.) na concentração de 1/200, seguidos pelo método ABC (StrepABC Complex/HRP Duet Kit, Dako Corp.). As reações foram reveladas com solução de 0,06 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB, Sigma, St. Louis, MO, EUA) acrescida de 1% de H₂O₂ e 1% de DMSO. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Carazzi. Controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário.

A porcentagem de células positivas para Ki-67 foi determinada pela contagem de 1.000 células para cada amostra, utilizando o sistema de análise de imagem KONTRON 400 (Carl Zeiss, Germany), enquanto que a porcentagem de células positivas para α -SMA foi determinada de forma qualitativa, por 3 indivíduos, em microscopia de luz e classificada como: negativa, quando até 5% das células do estroma foram positivas, escassa, quando menos de 50% das células foram positivas, e abundante, quando mais de 50% das células do estroma foram positivas para α -SMA. Casos com discordância na classificação foram discutidos individualmente pelos 3 indivíduos. Duas áreas do tumor foram analisadas: o estroma do tumor, o qual representou a área de tecido conjuntivo que permeava as células tumorais, e o fronte invasivo do tumor, que representou uma faixa de tecido conjuntivo entre as células tumorais mais invasivas e o tecido normal adjacente.

Tabela 1. Características clínico-patológicas das amostras de CECs de língua (primeiro grupo) utilizadas neste estudo.

Variáveis	Número de Pacientes (%) (n=83)
Idade	
Variação: 31-95 anos	
Media: 59,31±13,5 anos	
Mediana: 58 anos	
Gênero	
Masculino	64 (77,11)
Feminino	19 (22,89)
Hábito de fumar	
Não	9 (10,85)
Sim	74 (89,15)
Hábito de beber	
Não	14 (16,87)
Sim	69 (83,13)
Estádio T	
T1	16 (19,27)
T2	27 (32,53)
T3	29 (34,94)
T4	11 (13,26)
Estádio N	
N0	57 (68,67)
N1	15 (18,07)
N2	7 (8,42)
N3	1 (1,21)
Nx	3 (3,63)

Graduação histológica		
Bem diferenciado		42 (50,59)
Moderadamente diferenciado		37 (44,57)
Pobremente diferenciado		3 (3,63)
Indiferenciado		1 (1,21)
Tratamento		
Cirurgia		40 (48,19)
Radioterapia		2 (2,41)
Cirurgia+Radioterapia		34 (40,95)
Cirurgia+Radioterapia+Quimioterapia		3 (3,63)
Radioterapia+Cirurgia		4 (4,82)
Recorrência		
Não		58 (69,87)
Sim		25 (30,13)
Status atual		
Vivo		25 (30,13)
Morto		58 (69,87)

Tabela 2. Características clínico-patológicas das amostras de CECs orais (segundo grupo) utilizadas neste estudo.

Variáveis	Número de Pacientes (%)
Idade	
Variação: 22-89 anos	
Media: 61,1±12,93 anos	
Mediana: 62 anos	
Gênero	
Masculino	34 (89,47)
Feminino	4 (10,53)
Hábito de fumar	
Não	7 (18,42)
Sim	31 (81,58)
Hábito de beber	
Não	19 (50)
Sim	19 (50)
Estádio T	
T1	5 (13,16)
T2	13 (34,21)
T3	11 (28,95)
T4	9 (23,68)
Estádio N	
N0	5 (60,52)
N1	13 (18,42)
N2	11 (13,17)
N3	9 (7,8)

Localização		
Língua		14 (36,84)
Assoalho bucal		7 (18,42)
Palato		7 (18,42)
Mucosa jugal		5 (13,17)
Gengiva		3 (7,8)
Lábio		2 (5,26)
Graduação histológica		
Bem diferenciado		14 (36,84)
Moderadamente diferenciado		18 (47,36)
Pobrememente diferenciado		3 (7,8)
Indiferenciado		3 (7,8)
Tratamento		
Cirurgia		5 (13,17)
Radioterapia		4 (10,52)
Cirurgia+Radioterapia		26 (68,42)
Cirurgia+Radioterapia+Quimioterapia		2 (5,26)
Radioterapia+Quimioterapia		1 (2,63)
Recorrência		
Não		20 (52,63)
Sim		18 (47,37)
Status atual		
Vivo		12 (31,58)
Morto		26 (68,42)

4.4. Cultura de Células

Este estudo utilizou dois tipos celulares: linhagens celulares de CEC oral e culturas primárias de fibroblastos de mucosa oral normal (designadas como FMN1, FMN2 e FMN3). As linhagens celulares de CEC oral, SCC4, SCC9, SCC15

e SCC25, foram adquiridas da “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, VA, EUA) e cultivadas como recomendado pelo fornecedor. Em essência, estas células foram descongeladas e mantidas em frascos de cultura de 75 cm² em meio de cultura formado por partes iguais de meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) e do meio de cultura F12 (DMEM/F-12; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab Ltda, Campinas-SP), 400 ng/ml de hidrocortisona (Sigma), 100 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

As linhagens de FMN foram obtidas de fragmentos de mucosa labial de 3 indivíduos clinicamente saudáveis, que foram submetidos ao tratamento cirúrgico para remoção de mucocele no Orocentro da FOP-UNICAMP. À margem do leito cirúrgico foi realizada uma biopsia com “punch” para obtenção de um fragmento de 0,5 cm², que foi imediatamente lavado, imerso em meio de cultura DMEM (Invitrogen) acrescido de 10% FBS (Cultilab), 100 µg/ml de penicilina e 120 µg/ml de sulfato de kanamicina a 4°C e levado imediatamente à geladeira, onde foi mantido por 16 h. Transcorrido este período, os fragmentos foram lavados 3 vezes na mesma solução, cortados em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para frascos de cultura de 25 cm², que foram mantidos a temperatura de 37°C, atmosfera úmida contendo 5% CO₂. O crescimento celular foi monitorado diariamente e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

Após atingirem a subconfluência, os fibroblastos foram subcultivados. Para isto, as células foram lavadas com PBS e incubadas a 37°C com uma solução de 2% tripsina em PBS. Após um período médio de 2 min, as células se separaram do assoalho do frasco de cultura (o que foi determinado por observação em microscópio de contraste de fase), sendo então a ação da tripsina interrompida pela adição de meio de cultura contendo 10% de FBS. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning Inc, Corning, NY, EUA) e estes centrifugados a 3000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas e plaqueadas em meio de cultura. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade e os fibroblastos foram descartados após 10 passagens.

4.5. Preparo do Meio de Cultura Condicionado por Células de CEC Oral e Miofibroblastos

Para obtenção do meio condicionado por células de CEC oral, as linhagens celulares foram plaqueadas em uma condição de subconfluência (2.500 cm²) e cultivadas por 48 h em meio DMEM-F/12 contendo 10% de FBS. Após este período, o meio condicionado de cada linhagem foi coletado, centrifugado para remoção dos restos celulares e imediatamente incubado com as linhagens FMN. Meio de cultura fresco foi utilizado como controle.

O meio de cultura condicionado por miofibroblastos foi obtido através do tratamento das linhagens FMN1 e FMN3 com TGF- β 1. Resumidamente, células

plaqueadas em condição de subconfluência foram lavadas 2 vezes com PBS e uma vez com DMEM livre de soro e, em seguida, foram incubadas com meio de cultura contendo 0,1% FBS e 10 ng/ml de TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Após 72 h de tratamento, as células foram lavadas e mantidas em 0,1% FBS-DMEM (sem TGF- β 1) por um período adicional de 24 h, obtendo-se assim o meio condicionado por miofibroblastos. Os meios condicionados foram purificados por centrifugação, aliquotados e armazenados a -80°C até o uso. O meio controle (condicionado por fibroblastos) foi obtido do mesmo modo, mas sem a utilização de TGF- β 1. O efeito de TGF- β 1 na transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos foi confirmado através dos ensaios de western blot, transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), citometria de fluxo e imunofluorescência.

4.6. Análise de Western Blot

A técnica de western blot foi utilizada para dois propósitos neste estudo: confirmar o efeito de TGF- β 1 na transdiferenciação dos fibroblastos para miofibroblastos e determinar o efeito do meio condicionado pelas linhagens celulares de CEC oral na indução da transdiferenciação dos FMN. Para o segundo propósito, linhagens celulares de FMN foram incubadas por 3 dias com meio de cultura condicionado por células de CEC oral ou meio de cultura fresco como controle. Em paralelo, a linhagem FMN1 foi incubada com meio de cultura

condicionado acrescido de 10 µg/ml de anticorpos neutralizantes anti-TGF-β1 (R&D Systems).

Células foram coletadas, lavadas com PBS e incubadas com tampão de lise RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio, 0.5% sódio dodecil sulfato (SDS), 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSP), 1 mM N-etilmaleimida, 1 mM ditioneitol (DTT), 10 mg/ml inibidor de tripsina, 1 mg/ml leupeptina e 1 mg/ml aprotinina). Após centrifugação e determinação da dosagem protéica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), 30 µg de proteína total de cada amostra foi misturada com tampão de amostra redutor (2% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol e 20% DTT), fervida por 10 min e separada eletroforicamente em gel a 10% SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). O material eletroforizado foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (poro de 0,45 µm; Invitrogen). As membranas foram tratadas por 16 h a 4°C com TBS acrescido de 10% de leite desnatado e, posteriormente, incubadas com anticorpos anti-α-SMA (Dako Corp.) por 2 h. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase e reveladas com kit de quimioluminescência seguindo normas do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, EUA). A membrana foi então envolta por plástico e exposta ao filme radiográfico.

4.7. Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi utilizado com os mesmos propósitos da técnica de western blot. Células foram plaqueadas em lâmina de cultura de células (Lab Tek, Nunc, Naperville, IL, EUA) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 h. Seguindo-se incubação por 3 dias em meio de cultura contendo 0,1% de FBS e 10 ng/ml de TGF-β1 ou em meio contendo os produtos da síntese das linhagens de CEC oral, as células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol a 70% por 15 min. Após bloqueio com 3% BSA em PBS por 1 h para prevenir ligações inespecíficas, as células foram incubadas com anticorpos anti-α-SMA (Dako Corp.) em uma diluição de 1:100 por 1 h, seguindo então a incubação com o anticorpo anti-IgG conjugado com fluoresceína (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA) em uma diluição de 1:250. A lâmina foi montada com Vectashield contendo DAPI (Vector Labs), e examinada em um fotomicroscópio equipado com epifluorescência (DMR Microscope, Leica Microsystem, Nussloch, Germany). Para a geração das imagens fluorescentes, as células foram estimuladas com feixe de luz a 480/40nm e foram coletadas com filtro de passagem em banda de 527/30. Células não tratadas com o anticorpo primário foram usadas como controle negativo da reação.

4.8. Análise Semi-Quantitativa de RT-PCR

RNA total foi isolado das linhagens FMN1 e FMN3 incubadas com TGF-β1 através dos métodos de CHOME CZYNSKI e SACCHI (1987). Em essência,

células foram lavadas com PBS e incubadas com TRIZOL (Invitrogen) por 5 min. Após lise celular, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno (livres de RNase e DNase) e 0,2 ml de clorofórmio por mililitro de solução desnaturante foi adicionado. Após centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos limpos e foi adicionado 0,5 ml de álcool isopropano por mililitro de solução desnaturante. A concentração e a pureza das amostras de RNA foram determinadas analisando-se a absorbância espectrofotometricamente a 260/280 nm de comprimento de onda (Espectrofotômetro Genesys 2, Spectronic Inst., Rochester, NY, EUA), enquanto que a integridade foi verificada em gel de agarose/MOPS/formaldeído.

Três μ g de RNA total foram transcritos reversamente a cDNA adicionando a mistura contendo 1 μ l de Oligo-dT (0,5 mg/ml), 4 μ l de 5x tampão de síntese (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1 μ l da mistura de dNTPs, 2 μ l de 0,1M DTT, 1 μ l RNase OUT (Invitrogen) e 1 μ l de Superscript II RT (200 U/ μ l; Invitrogen). A mistura foi incubada por 50 min a 42°C e posterior 15 min a 70°C. O cDNA resultante foi amplificado por PCR (Termociclador modelo 9600, Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA) em uma reação composta por 1 μ M de cada primer, 2 mM $MgCl_2$, 0,8 mM dNTPs e 0,025 U/ μ l Taq DNA polimerase (Invitrogen). As seqüências dos primers, condições da amplificação e os tamanhos dos produtos de PCR para α -SMA e GAPDH são descritos na Tabela 3. Os produtos de PCR foram corados com brometo de etídeo e separados eletroforéticamente em gel de 1% agarose/TAE (tampão Tris-ácido acético-EDTA). A documentação dos ensaios

de RT-PCR foram realizadas no sistema de fotodocumentação Kodak Digital Science™ equipado com a câmera digital DC40 e com o programa 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA).

Tabela 3. Primers usados nos ensaios de RT-PCR.

Gene	Seqüência (5'→3')	Anelamento (°C)	Ciclos	Produto (pb)
α -SMA	GCTCACGGAGGCACCCCTGA GTCATAGGACATTGTTAGCAT	61	40	589
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC GAAGATGGTGATGGGATTTC	55	30	226

4.9. Citometria de Fluxo

Suspensões celulares foram fixadas com etanol a 70% e incubadas com anticorpos anti- α -SMA e anti-IgG conjugado a fluoresceína como descrito acima. As células foram lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas no Citômetro de Fluxo FACScalibur equipado com laser de argônio (Becton Dickison, San Jose, CA, EUA). Um número mínimo de 10.000 eventos foi captado para cada amostra e apenas as células com características de dispersão ortogonal e adiante, similar a fibroblastos intactos, foram incluídas na análise. A porcentagem de células positivas foi calculada com o auxílio do software CellQuest (Becton Dickison). É importante ressaltar que os experimentos de citometria de fluxo foram realizados em nosso laboratório em Piracicaba, mas analisados no citômetro de fluxo do

laboratório do Dr. Aníbal Vercesi, na Faculdade de Medicina-UNICAMP, em Campinas.

4.10. Índice de Incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU)

Linhagens de CEC oral foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células por poço em lâminas de cultura e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24 h de cultivo em níveis reduzidos de FBS (0,1%) para indução do sincronismo celular, os meios de cultura condicionados por fibroblastos ou por miofibroblastos foram adicionados às células. Transcorrido 24 h de indução da proliferação celular, as células foram lavadas e meio de cultura fresco acrescido de BrdU na diluição de 1:1000 foi adicionado. Após 1 h de incorporação, as células foram lavadas e fixadas em 70% de etanol por 15 min. A incorporação de BrdU nas células em proliferação foi revelada através da análise imunohistoquímica utilizando protocolos descritos pelo fabricante (Kit de proliferação celular, Amersham Pharmacia Biotech). O índice de incorporação expresso como a porcentagem de células positivas para BrdU foi determinado pela contagem de 1000 células de cada linhagem de CEC oral utilizando o sistema de imagem KONTROM 400 (Zeiss).

4.11. Índice Imunocitoquímico da Expressão de Ki-67

Para confirmar o efeito do meio condicionado por miofibroblastos no potencial proliferativo das linhagens de CEC oral foi determinado o índice imunocitoquímico da expressão de Ki-67. Linhagens de CEC oral foram cultivadas

em meio de cultura condicionado por fibroblastos ou miofibroblastos como descrito acima, seguida por fixação em 70% etanol. Após a inibição da peroxidase endógena, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti-Ki-67 na concentração de 1/200 por 1 h. Em seqüência as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a biotina (Strept ABC Complex/HRP Duet kit, Dako Corp.) por 30 min a 37°C, diluído a 1:500 e complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako Corp.) por mais 30 min. As reações foram reveladas com solução 0,6 mg/ml de DAB (Sigma) acrescida de 1% de H₂O₂ e 1% de DMSO e contra-coradas com hematoxilina de Carazzi.

4.12. Análise Zimográfica

Linhagens celulares de CEC oral foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 células por poço em placas de 24-poços (Nunc). Após 24 h, células foram lavadas e incubadas com meio de cultura condicionado por fibroblastos ou miofibroblastos por 24 h para induzir a síntese de MMPs. Sobrenadantes foram coletados, incubados com tampão de amostra não redutor e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 1,6 mg/ml de gelatina (Bio Rad, Hercules, CA, EUA), como substrato. O número de células de cada poço foi determinado pela contagem no contador automático de células (Coulter Electronics, Beckman, England). Após eletroforese, os geis foram lavados 2 vezes por 30 min em solução aquosa de 2% Triton X-100 e incubados em tampão de ativação composto por 10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 5 mM CaCl₂ por 16 h a 37°C. A seguir, os geis foram corados com Coomassie blue R250 (Bio Rad). As proteínas

com atividades gelatinolíticas foram observadas como bandas negativas. Para confirmar se as proteínas eram pertencentes à família das MMPs, 1 mM de 1,10-fenantrolina (Sigma) foi adicionado diretamente ao tampão de ativação de uma das amostras.

4.13. Caracterização das MMPs por Imunoprecipitação

Sobrenadante de uma das amostras deste estudo foi submetido à reações de imunoprecipitação com anticorpos monoclonais anti-MMP-2 e anti-MMP-9 humanas (The Binding Site, England) na diluição de 1/50. Os imunocomplexos foram precipitados pela adição de 50 μ l de proteína A-Sepharose (Sigma) por 1 h a temperatura de 4°C. Depois de lavar 3 vezes o material não-específico adsorvido pela Sepharose com PBS acrescido de 1% Tween-20, o material imunoprecipitado foi eluído em tampão de amostra não redutor e analisado por zimografia como descrito previamente.

4.14. Análise Densitométrica

Para quantificação das bandas dos ensaios de western blot e zimografia, os filmes e géis foram escaneados no Scanner Model GS-700 Imaging Densitometer (Bio Rad) e as bandas analisadas com auxílio do programa Molecular Analyst™ (Bio Rad). O valor da densidade óptica foi calculado levado em consideração à área e a intensidade de cada banda. No ensaio de western blot, a normalização foi realizada dividindo o valor da densidade óptica da banda de α -SMA pelo valor da

banda de β -actina, enquanto que para os ensaios zimográficos, o valor da densidade óptica das bandas correspondendo a MMP-2 e MMP-9 foi dividido pelo número de células. Os resultados finais dos experimentos são mostrados como a porcentagem de estimulação frente ao controle negativo.

4.15. Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados, pelo menos, 2 vezes. Os resultados utilizados na comparação estatística representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 repetições independentes. Para determinar a correlação entre a presença dos miofibroblastos e dados clínico-patológicos, nós utilizamos o teste Exato de Fisher e o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para variáveis contínuas e descontínuas, respectivamente. A correlação entre a positividade de Ki-67 no estroma e no fronte invasivo do tumor foi analisada pelo teste de Spearman. Sobrevida global e sobrevida livre de doença foram estimadas através do método de Kaplan-Meier e o teste Log-rank foi empregado para comparar as curvas de sobrevida. O teste análise de variância (One way ANOVA) foi utilizado para comparar os efeitos do meio condicionado pelas células de CEC oral sobre a transdiferenciação dos FMN, enquanto que o teste t de Student foi utilizado para comparar os efeitos do meio condicionado por miofibroblastos sobre a taxa de proliferação e atividade de MMPs das linhagens de CEC oral. Em todas as análises, $p \leq 0,05$ foi considerado como indicativo de diferença estatisticamente significativa.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação Imunohistoquímica da Presença dos Miofibroblastos no Estroma de CECs Orais

Os resultados da análise imunohistoquímica da expressão de α -SMA são demonstrados na Tabela 4. Nós utilizamos um anticorpo capaz de reconhecer a proteína α -SMA por ser considerado o melhor marcador celular para identificação dos miofibroblastos (DESMOULIÈRE *et al.*, 2004; KUNZ-SCHUGHART & KNUCHEL, 2002). Em todas as amostras de mucosa oral normal (n=18) não houve no tecido conjuntivo a presença de células positivas para α -SMA, exceto pela marcação das células musculares lisas da parede dos vasos sangüíneos (controle interno positivo) (Figura 1A e B). Da mesma forma, todas as amostras de leucoplasias orais com displasia celular histologicamente confirmada foram negativas para presença de células positivas para α -SMA no tecido conjuntivo (Figura 2C e D). Em contraste, aproximadamente 60% dos CECs orais, independente do grupo analisado, demonstraram uma quantidade significativa de miofibroblastos.

As amostras de CECs de língua (primeiro grupo) foram classificadas quanto ao padrão de distribuição dos miofibroblastos em padrão reticular ou padrão fascicular (Figura 3A-D). Onze amostras (22,45%) apresentaram exclusivamente o padrão reticular, 22 (44,89%) apresentaram o padrão fascicular e 16 (32,66%) demonstraram áreas com padrão reticular e fascicular. Nenhuma correlação entre o padrão de distribuição e as características clínico-patológicas dos tumores foi

observada. Interessantemente, as amostras de CECs orais, independente do grupo, apresentavam um infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade variada, que tendia a ser inversamente proporcional a quantidade de miofibroblastos. Foi possível examinar o fronte invasivo de 72 amostras de CECs de língua, demonstrando que os miofibroblastos estavam concentrados ali, demarcando esta área em 35 (71,42%) das amostras positivas para α -SMA (Figura 4B). Esta proximidade sugere que a transdiferenciação dos miofibroblastos é induzida pelas células tumorais.

Tabela 4. Presença dos miofibroblastos em tecido oral normal, leucoplasias orais e CECs.

	Presença de Miofibroblastos		
	Total	Negativa (%)	Positiva (%)
Mucosas orais normais	18	18 (100)	0
Leucoplasias orais	14	14 (100)	0
CECs de língua	83	34 (40,96)	49 (59,04)
CECs orais	38	15 (39,48)	23 (60,52)

5.2. Correlação Entre a Presença dos Miofibroblastos e as Características Clínico-Patológicas dos Tumores

As correlações entre as características clínico-patológicas dos tumores e a presença dos miofibroblastos no grupo de CECs de língua (primeiro grupo de

CECs) estão listadas na Tabela 5. Foi observada uma significativa correlação entre a presença dos miofibroblastos no estroma geral do tumor e no fronte de invasão (coeficiente de Spearman $r=0,59$; $p=0,005$). A presença abundante de miofibroblastos encontrada no estroma e no fronte invasivo do tumor correlacionou positivamente e significativamente com o estágio clínico N, invasão linfática e vascular, presença histologicamente confirmada de metástases em linfonodos e ruptura capsular dos linfonodos por infiltração tumoral. A abundante presença de miofibroblastos no fronte invasivo do tumor também correlacionou significativamente com invasão perineural. A presença de miofibroblastos não foi associada com idade, gênero, hábito de fumar ou consumir bebidas alcoólicas, tamanho do tumor (estádio T), diferenciação celular das células tumorais e recorrência tumoral. A abundante existência de miofibroblastos no fronte de invasão tumoral significativamente correlacionou com o período de sobrevida global (tempo transcorrido entre o diagnóstico da doença e a morte do paciente), onde pacientes que demonstravam uma grande quantidade de miofibroblastos no fronte invasivo apresentavam um período de sobrevida global significativamente menor que os pacientes com ausência ou escassa presença destas células ($p=0,05$). Não houve associação entre a sobrevida livre de doença e a presença de miofibroblastos.

A taxa de proliferação dos tumores de língua foi avaliada pela reação imunohistoquímica para Ki-67. Núcleos com coloração amarronzada, independente da intensidade, foram interpretados como positivo para Ki-67. A taxa de proliferação representa a porcentagem de células positivas para Ki-67 e foi

determinada pela contagem de 1.000 células em cada uma das áreas analisadas neste estudo (estroma e frente invasivo do tumor). A mediana da expressão imunohistoquímica de Ki-67 de cada área analisada foi empregada para dividir os tumores em 2 grupos, um acima e outro abaixo da mediana (exibindo alta e baixa atividade proliferativa), que foram associados com a presença de miofibroblastos. A porcentagem de células positivas para Ki-67 foi maior no frente invasivo comparado ao estroma tumoral e uma forte e positiva correlação foi observada entre a taxa de proliferação destas duas áreas (Figura 5, coeficiente de Spearman $r=0,63$; $p=0,0005$). A quantidade de miofibroblastos no estroma foi significativamente maior em tumores exibindo uma elevada proporção de células positivas para Ki-67 ($p=0,05$). Da mesma forma, tumores que apresentaram uma alta atividade proliferativa exibiram uma significante abundância de miofibroblastos no frente invasivo do tumor ($p=0,01$). Estes resultados demonstram que, independente da localização, a presença dos miofibroblastos correlaciona com várias características clínicas e patológicas dos tumores, incluindo um potencial proliferativo elevado.

No segundo grupo, 38 amostras de CECs de várias localizações da cavidade oral foram avaliadas apenas para a presença dos miofibroblastos no estroma geral do tumor. Vinte e três (60,52%) amostras apresentaram miofibroblastos no estroma envolvendo as ilhas de células neoplásicas, sendo que 12 (31,6%) destas amostras demonstraram uma abundante presença de células positivas para α -SMA. A correlação entre a presença dos miofibroblastos e os

dados clínico-patológicos deste grupo esta listado na Tabela 6. A presença abundante dos miofibroblastos no estroma correlacionou significativamente com o estágio clínico N, presença de células tumorais nas margens da peça cirúrgica e recorrência regional após o tratamento. Assim como para as amostras de língua, a presença dos miofibroblastos não correlacionou com idade, gênero, hábito de fumar ou consumir bebidas alcoólicas, tamanho do tumor e grau de diferenciação histológica. Um achado interessante neste grupo foi que a presença dos miofibroblastos correlacionou significativamente com a atividade de MMP-2 e MMP-9 dos tumores. As atividades de MMP-2 e MMP-9 foram previamente determinadas através da análise zimográfica dos extratos protéicos destas amostras de CEC (YORIOKA *et al.*, 2002). Nossos resultados demonstraram que a presença abundante de miofibroblastos no estroma tumoral correlacionou significativamente com uma maior atividade de MMP-2 e MMP-9 dos tumores (Figura 6).

Tabela 5. Correlação entre as características clínico-patológicas dos CECs de língua (primeiro grupo) e a presença dos miofibroblastos no estroma geral e no fronte invasivo dos tumores.

Variáveis	Miofibroblastos			Miofibroblastos		
	Estroma Geral		Valor de P	Fronte Invasivo		Valor de P
	0/1 ¹ n (%)	2 n (%)		0/1 n (%)	2 n(%)	
Idade						
≤ 58 anos	25 (49,02)	17 (53,12)	0,71	33 (55,93)	7 (53,85)	0,89
> 58 anos	26 (50,98)	15 (46,88)		26 (44,07)	6 (46,15)	
Gênero						
Masculino	40 (78,43)	24 (75)	0,71	45 (76,27)	9 (69,23)	0,59
Feminino	11 (21,57)	8 (25)		14 (23,73)	4 (30,77)	
Hábito de Fumar						
Não	5 (11,36)	4 (13,33)	0,79	7 (13,46)	2 (16,67)	0,77
Sim	39 (88,64)	26 (86,67)		45 (86,54)	10 (83,33)	
Consumo de álcool						
Não	9 (20)	5 (16,67)	0,71	9 (16,98)	4 (33,33)	0,2
Sim	36 (80)	25 (83,33%)		44 (83,02)	8 (66,67)	
Estádio T						
T1/T2	30 (58,82)	13 (40,62)	0,10	34 (57,63)	5 (38,46)	0,21
T3/T4	21 (41,18)	19 (59,38)		25 (42,37)	8 (61,54)	

Continuação

Estádio N						
N0	41 (83,67)	16 (51,61)	0,002	54 (91,54)	1 (7,7)	0,007
N+	8 (16,33)	15 (48,39)		5 (8,48)	12 (92,3)	
Diferenciação²						
BD	27 (52,94)	15 (46,87)	NA ³	36 (61,01)	1 (7,69)	NA
MD	21 (41,17)	16 (50)		21 (35,59)	10 (76,92)	
PD/I	3 (5,89)	1 (3,13)		2 (3,4)	2 (15,39)	
Invasão Vascular						
Não	47 (94)	25 (78,13)	0,03	54 (91,53)	8 (66,67)	0,01
Sim	3 (6)	7 (21,87)		5 (8,47)	4 (33,33%)	
Invasão Linfática						
Não	33 (66)	15 (46,88)	0,06	40 (67,8)	2 (16,67)	0,001
Sim	17 (34)	17 (53,12)		19 (32,2)	10 (83,33)	
Invasão Perineural						
Não	36 (72)	19 (59,38)	0,23	43 (72,88)	3 (25)	0,002
Sim	14 (28)	13 (40,62)		16 (27,12)	9 (75)	
Metástases em linfonodo⁴						
Não	36 (70,59)	14 (43,75)	0,01	41 (69,49)	4 (30,77)	0,009
Sim	15 (29,41)	18 (56,75)		18 (30,51)	9 (69,23)	
Infiltração Capsular						
Não	11 (21,57)	15 (46,88)	0,01	13 (22,03)	8 (61,54)	0,005
Sim	40 (78,43)	17 (53,12)		46 (77,97)	5 (38,46)	

Continuação

Recorrência local						
Não	35 (68,62)	23 (71,87)	0,75	41 (69,49)	9 (69,23)	0,98
Sim	16 (31,38)	9 (28,13)		18 (30,51)	4 (30,77)	
Recorrência Regional						
Não	39 (76,47)	26 (81,25)	0,61	45 (76,27)	10 (76,92)	0,99
Sim	12 (23,53)	6 (18,75)		14 (23,73)	3 (23,08)	
Recorrência a Distância						
Não	43 (94,11)	28 (87,5)	0,76	52 (88,13)	9 (69,23)	0,1
Sim	8 (15,68)	4 (12,5)		7 (11,86)	4 (30,77)	
Sobrevida Global (158 meses, média de 57 meses)						
	49,17%	37,5%	0,16	31,74%	8,5%	0,05
Sobrevida Livre de Doença (129 meses, média de 57 meses)						
	48,14%	38,72%	0,39	47,81%	41,15%	0,24
Células positivas para Ki-67						
≤ 30%	30 (58,82)	12 (37,5)	0,05			
> 30%	21 (41,18)	20 (62,5)				
≤ 38%				35 (68,62)	3 (27,27)	0,01
> 38%				16 (31,38)	8 (72,73)	

¹Presença de miofibroblastos: (0) negativa, (1) escassa e (2) abundante. ²Diferenciação: (BD) bem diferenciado, (MD) moderadamente diferenciado, (PD) pobremente diferenciado e (I) indiferenciado. ³NA: não avaliado. ⁴Metástases em linfonodos: histologicamente confirmada.

Tabela 6. Correlação entre a presença de miofibroblastos e as características clínico-patológicas dos CECs orais (segundo grupo).

Variáveis	Miofibroblastos		Valor de P
	0/1 ¹ n (%)	2 n (%)	
Idade			
>62 anos	13 (50)	8 (75)	0,33
>62 anos	13 (50)	4 (25)	
Gênero			
Masculino	22 (84,61)	12 (100)	0,15
Feminino	4 (15,39)	0	
Estádio T			
T1/T2	13 (50)	5 (41,66)	0,63
T3/T4	13 (50)	7 (58,34)	
Estádio N			
N0	19 (73,07)	4 (25)	0,02
N+	7 (26,93)	8 (75)	
Diferenciação ²			
BD	10 (38,46)	4 (25)	0,57
MD	13 (50)	5 (41,66)	
PD/I	3 (11,54)	3 (33,4)	

Continuação

Margens			
Livres	17 (94,45)	6 (50)	0,005
Comprometidas	1 (5,55)	6 (50)	
Recorrência local			
Não	19 (73,07)	8 (75)	0,68
Sim	7 (26,93)	4 (25)	
Recorrência Regional			
Não	24 (92,3)	6 (50)	0,003
Sim	2 (7,7)	6 (50)	
Recorrência distância			
Não	23 (88,46)	8 (75)	0,13
Sim	3 (11,54)	4 (25)	
Status atual			
Vivo	7 (26,93)	5 (41,66)	0,40
Morto	19 (73,07)	7 (58,34)	

¹Presença de miofibroblastos: (0) negativa, (1) escassa, e (2) abundante. ²Diferenciação: (BD) bem diferenciado, (MD) moderadamente diferenciado, (PD) pobremente diferenciado e (I) indiferenciado.

5.3. Meio Condicionado por Células de CEC Oral Induz a Transdiferenciação dos FMN em Miofibroblastos

Primeiro, para avaliar o efeito dos meios condicionados pelas linhagens celulares de CEC oral sobre os FMN foi realizada uma análise morfológica das células coradas pela técnica de H&E. Todas as linhagens de fibroblastos demonstraram uma morfologia fusiforme com núcleo central esférico e típicos prolongamentos citoplasmáticos, mas quando estas linhagens celulares foram cultivadas na presença de meio condicionado pelas linhagens celulares de CEC oral por 3 dias, elas se apresentaram mais alongadas e aumentadas de tamanho devido a uma ampla expansão do citoplasma (Figura 7A e B). Adicionalmente, estas células tratadas com meio condicionado por células de CEC oral não foram induzidas à morte celular durante o experimento. A morfologia das linhagens de FMN cultivadas com meio condicionado pelas células de CEC oral foi bastante similar à observada em miofibroblastos gengivais de fibromatose gengival hereditária (BITU *et al.*, 2006).

Para verificar se os meios condicionados pelas linhagens celulares de CEC oral são capazes de estimular a transdiferenciação dos FMN em miofibroblastos, nós examinamos a expressão de α -SMA por imunofluorescência e western blot. Os ensaios de western blot demonstraram que as células de CEC oral induziram a transdiferenciação das linhagens de FMN em miofibroblastos (Figura 8A, B e C). A análise densitométrica das bandas correspondentes à α -SMA normalizadas pelo valor de β -actina demonstraram que os níveis de produção de α -SMA foram

significativamente maiores quando as linhagens de fibroblastos foram cultivadas na presença de meio condicionado pelas células de CEC oral comparado com fibroblastos cultivados com meio controle (Figura 8D, E e F). Um aumento de 3-6 vezes na produção de α -SMA foi observado nas linhagens celulares FMN1 e FMN2 em relação ao controle (Figura 6B e D), enquanto que uma estimulação mais significativa, um aumento de 9-20 vezes, foi encontrada na linhagem FMN3 (Figura 8F).

Visando confirmar estes resultados, nós realizamos o ensaio de imunofluorescência com fibroblastos cultivados com meio condicionado pelas células de CEC oral. Como esperado, miofibroblastos foram identificados quando os meios de cultura condicionados pelas células de CEC oral foram adicionados às linhagens de fibroblastos. As linhagens de FMN demonstraram ocasionais células com uma fraca e perinuclear positividade para α -SMA (Figura 9A). Em contraste, o cultivo dos fibroblastos com meio condicionado pelas células de CEC oral resultou na transdiferenciação dos miofibroblastos, como revelada pelo grande número de células apresentando estriações brilhantes, compatíveis com fibras do estresse, por todo o citoplasma celular (Figura 9B).

5.4. Meio Condicionado por Células de CEC Oral Induz a Transdiferenciação dos Miofibroblastos Através da Ação de TGF- β 1

Muitos estudos demonstraram que TGF- β 1 apresenta um papel fundamental na transdiferenciação dos miofibroblastos (DESMOULIÈRE *et al.*,

2005; TUXHORN *et al.*, 2001). Além disso, TGF- β 1 é freqüentemente detectado em CECs orais, sendo encontrado em altas concentrações no estroma tumoral (PASCHE, 2001). Primeiramente, nós avaliamos a capacidade de TGF- β 1 induzir a transdiferenciação das linhagens de FMN em miofibroblastos. As análises de RT-PCR e western blot demonstraram que o tratamento das linhagens celulares FMN1 e FMN3 com 10 ng/ml de TGF- β 1 por 72 h estimularam significativamente a expressão e produção de α -SMA quando comparado com células controle (Figura 10A e B). Adicionalmente, a análise por citometria de fluxo demonstrou que os fibroblastos tratados com TGF- β 1 apresentaram um número maior de células positivas e uma intensidade maior de fluorescência para α -SMA (Figura 10C). Por exemplo, o tratamento da linhagem FMN3 com 10 ng/ml de TGF- β 1 resultou em mais de 90% das células positivas para α -SMA.

Para verificar se a transdiferenciação dos miofibroblastos é dependente de TGF- β 1 liberado pelas células de CEC oral, nós bloqueamos a atividade de TGF- β 1 com anticorpos neutralizantes anti-TGF- β 1. Para isto, anticorpos anti-TGF- β 1 foram adicionados ao meio condicionado pelas linhagens celulares de CEC oral na concentração de 10 μ g/ml e mantido por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, este meio foi incubado com a linhagem celular FMN1 e após 72 h, as células foram coletadas para análise por western blot. Nossos resultados claramente demonstraram que o anticorpo neutralizante anti-TGF- β 1 inibiu significativamente a expressão de α -SMA quando comparado ao tratamento controle (meio condicionado pelas células de CEC oral) (Figura 11). Estes

resultados demonstraram que a transdiferenciação dos FMN em miofibroblastos é dependente de TGF β 1 liberado pelas células de CEC oral.

5.5 Meio Condicionado por Miofibroblastos Estimula a Proliferação das Células de CEC Oral

Visto que nossos resultados anteriores correlacionaram a presença dos miofibroblastos com um potencial proliferativo elevado das amostras de CEC de língua, nós procuramos determinar se os fatores secretados por miofibroblastos são capazes de induzir um aumento na proliferação celular das linhagens celulares de CEC oral. Para obter o meio condicionado por miofibroblastos, as linhagens celulares FMN1 e FMN3 foram tratadas com 10 ng/ml de TGF- β 1 por 3 dias. Em seguida, meio de cultura (sem TGF- β 1) foi adicionado as células e mantido por mais 1 dia. Após este período, o meio condicionado foi coletado e incubado por 24 h com as linhagens de CEC oral. O efeito do meio condicionado na proliferação das células de CEC oral foi avaliado através da análise da incorporação de BrdU ao DNA e pela expressão imunocitoquímica de Ki-67. Foram considerados positivos os núcleos corados em marrom, independente da intensidade, tanto para os ensaios de BrdU quanto para Ki-67 (Figura 12). Nossos resultados demonstraram um aumento significativo no índice de proliferação das células de CEC oral quando tratadas com meio condicionado por miofibroblastos em comparação com o meio condicionado por fibroblastos, como revelado pelos ensaios de BrdU e Ki-67 (Figuras 13 e 14). Para o ensaio de BrdU, o meio

condicionado por miofibroblastos derivados da linhagem FMN1 induziu respectivamente 2,15x, 2x, 2,29x e 1,89x a proliferação das linhagens SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25 em relação ao meio condicionado por fibroblastos, enquanto que o meio condicionado por fibroblastos da linhagem FMN3 induziu respectivamente 2,19x, 2,13x, 2,5x e 3,21x. A diferença nos índices de positividade para Ki-67 foram maiores que os índices de incorporação de BrdU. O meio condicionado por miofibroblastos derivados da linhagem FMN1 induziu 3,93x, 2,94x, 3,69x e 7,57x a proliferação das linhagens SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25 em relação ao meio condicionado por fibroblastos, respectivamente, enquanto que o meio condicionado por fibroblastos da linhagem FMN3 induziu 3,87x, 3,81x, 5,36x e 7,05x respectivamente.

5.6. Meio Condicionado por Miofibroblastos Induz Significativamente a Produção de MMP-2 pelas Células de CEC Oral

Visto que nossos resultados demonstraram uma correlação entre a presença dos miofibroblastos e uma elevada atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 nos CECs orais, nós avaliamos através de zimografia se o meio condicionado por miofibroblastos é capaz de induzir a produção de MMP-2 e MMP-9 nas linhagens celulares de CEC oral. Para isso, células das 4 diferentes linhagens de CEC oral foram incubadas com meio condicionado por fibroblastos ou miofibroblastos por 24 h e os sobrenadantes celulares analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gelatina como substrato. Duas bandas principais foram produzidas pelas linhagens celulares analisadas. Uma

banda difusa com massa molecular de aproximadamente 86-92 kDa e uma bem demarcada banda com massa molecular próxima a 72 kDa (Figura 15A). As atividades gelatinolíticas destas bandas foram atribuídas a MMP-9 e MMP-2 por terem sido inibidas por 1 mM de 1,10-fenantrolina adicionado diretamente ao tampão de ativação (Figura 15A). Contudo, a confirmação da origem destas bandas foi realizada pelo ensaio de imunoprecipitação utilizando anticorpos específicos para contra MMP-9 e MMP-2, seguido por zimografia. Como revelado na Figura 15B, as bandas com 86-92 kDa e com 72 kDa foram, respectivamente, MMP-9 e MMP-2.

Uma significativa indução na atividade de MMP-2 foi observada em todas as linhagens de CEC oral incubadas com meio condicionado por miofibroblastos, independente da linhagem de fibroblasto que gerou os miofibroblastos, quando comparado com o meio condicionado por fibroblastos (Figura 16). A atividade da enzima MMP-9 pelas linhagens de CEC oral foi muito mais fraca que a atividade de MMP-2, mas foi detectada em todos os experimentos. Embora a incubação das células de CEC oral com meio condicionado por miofibroblastos tenha induzido a produção de MMP-9, isto não foi estatisticamente significativo quando comparado com a indução promovida pelo meio condicionado por fibroblastos (Figura 16). Interessantemente, meio condicionado por fibroblastos ou miofibroblastos induziu a atividade de MMP-2 e MMP-9 em todas as linhagens de CEC oral comparado ao meio controle.

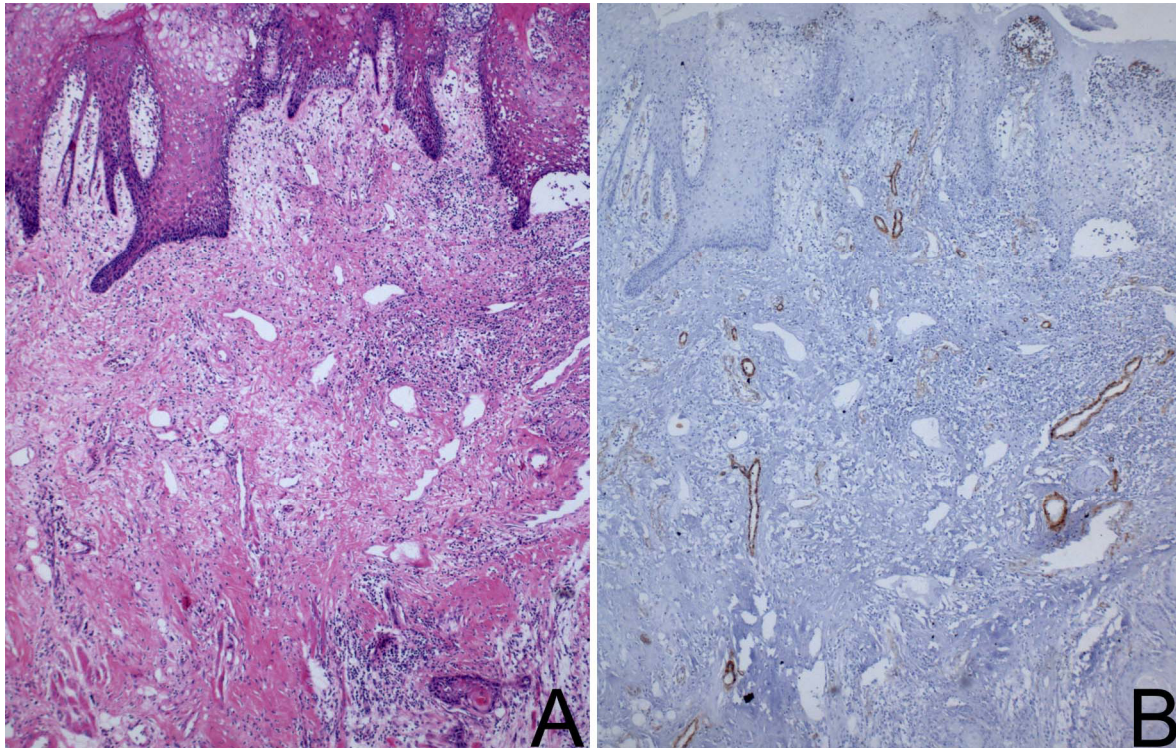


Figura 1. Ausência de miofibroblastos em mucosa oral normal. Análise histológica, coloração H&E **(A)** e imunohistoquímica da expressão de α -SMA **(B)** em uma das amostras de mucosa oral normal deste estudo. Dezoito amostras de mucosa oral normal foram submetidas à análise imunohistoquímica para α -SMA. Todas as amostras foram negativas para expressão de α -SMA. Células musculares lisas das paredes dos vasos foram positivas (controle interno positivo). (x50)

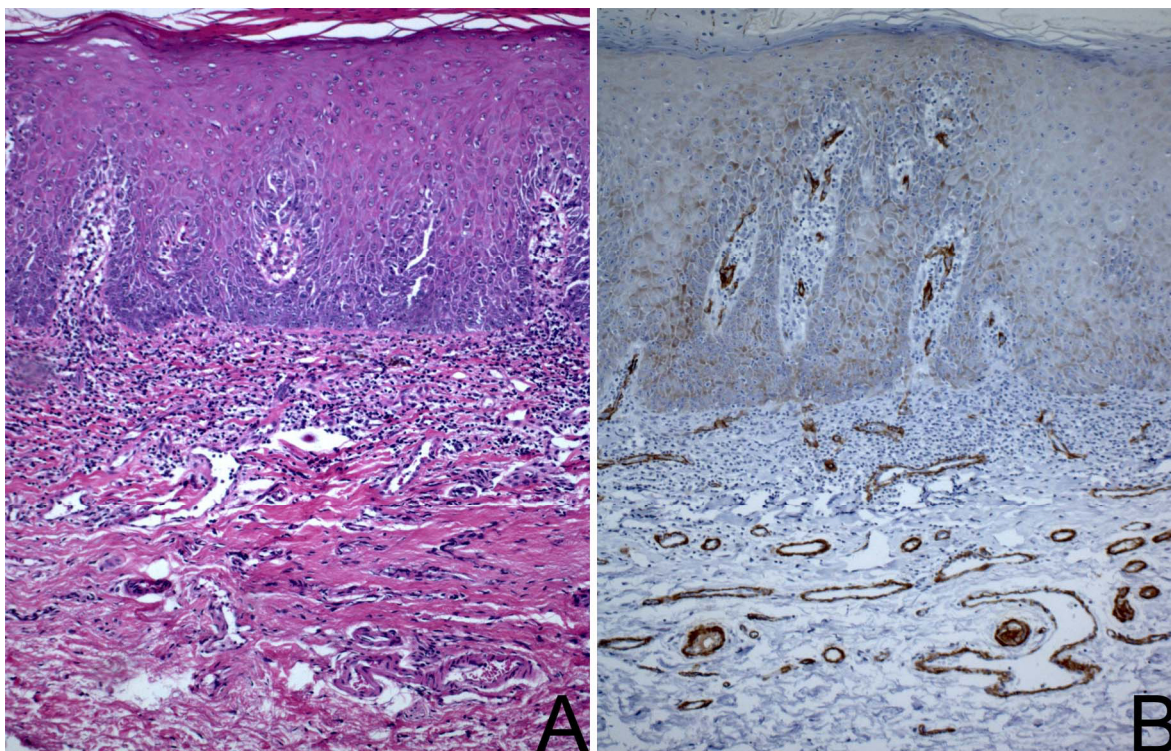


Figura 2. Miofibroblastos não foram encontrados no estroma de leucoplasias orais. Quatorze lesões com o diagnóstico clínico de leucoplasia e histologicamente diagnosticadas como tendo displasia foram incluídas nesta análise. Nenhuma amostra revelou a presença dos miofibroblastos no tecido conjuntivo, enquanto que células musculares lisas da parede vascular foram positivas para α -SMA. Note o grande número de vasos sangüíneos no tecido conjuntivo. **(A)** Coloração de H&E e **(B)** marcação imunohistoquímica para α -SMA. (x50)

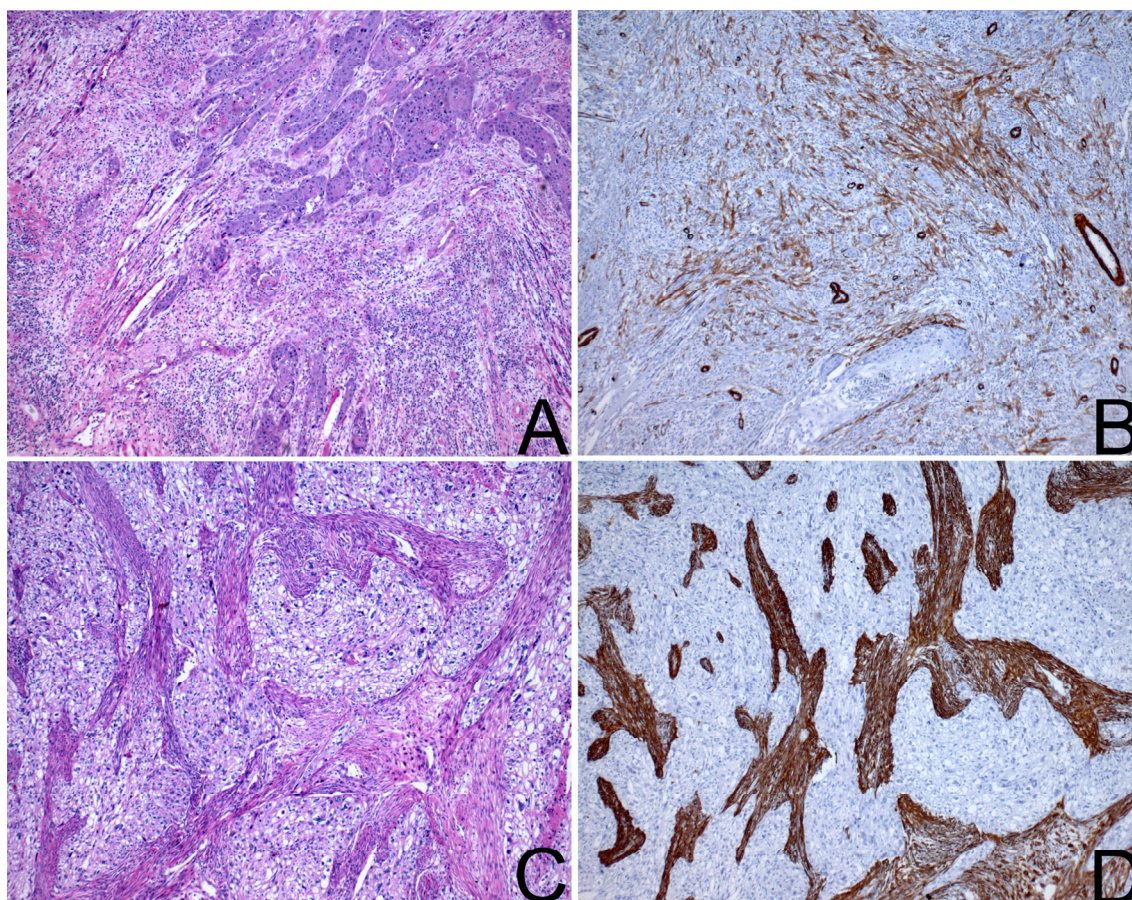


Figura 3. Miofibroblastos foram abundantemente encontrados no estroma de CECs de língua. **(A e C)** Características histológicas e **(B e D)** análise imunohistoquímica da expressão de α -SMA de duas das amostras de CEC de língua deste estudo. Os miofibroblastos demonstraram 2 padrões de distribuição: padrão reticular **(B)** e padrão fascicular **(D)**. Nenhuma correlação foi observada entre o padrão de distribuição e as características clínico-patológicas dos tumores. (x50)

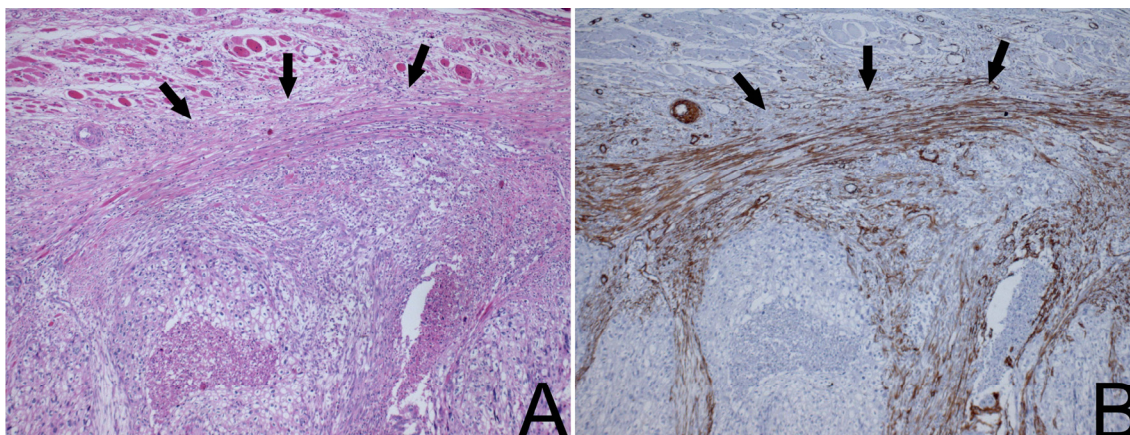


Figura 4. Miofibroblastos foram encontrados principalmente no fronte invasivo dos tumores. Os fronts invasivos do tumores, demarcado pelas setas, se apresentaram repletos por miofibroblastos em mais de 70% dos casos positivos. Esta proximidade entre os miofibroblastos e as células tumorais sugere um importante papel indutivo na transdiferenciação dos miofibroblastos por parte das células de CEC oral. **(A)** Coloração de H&E e **(B)** marcação imunohistoquímica para α -SMA. (x50)

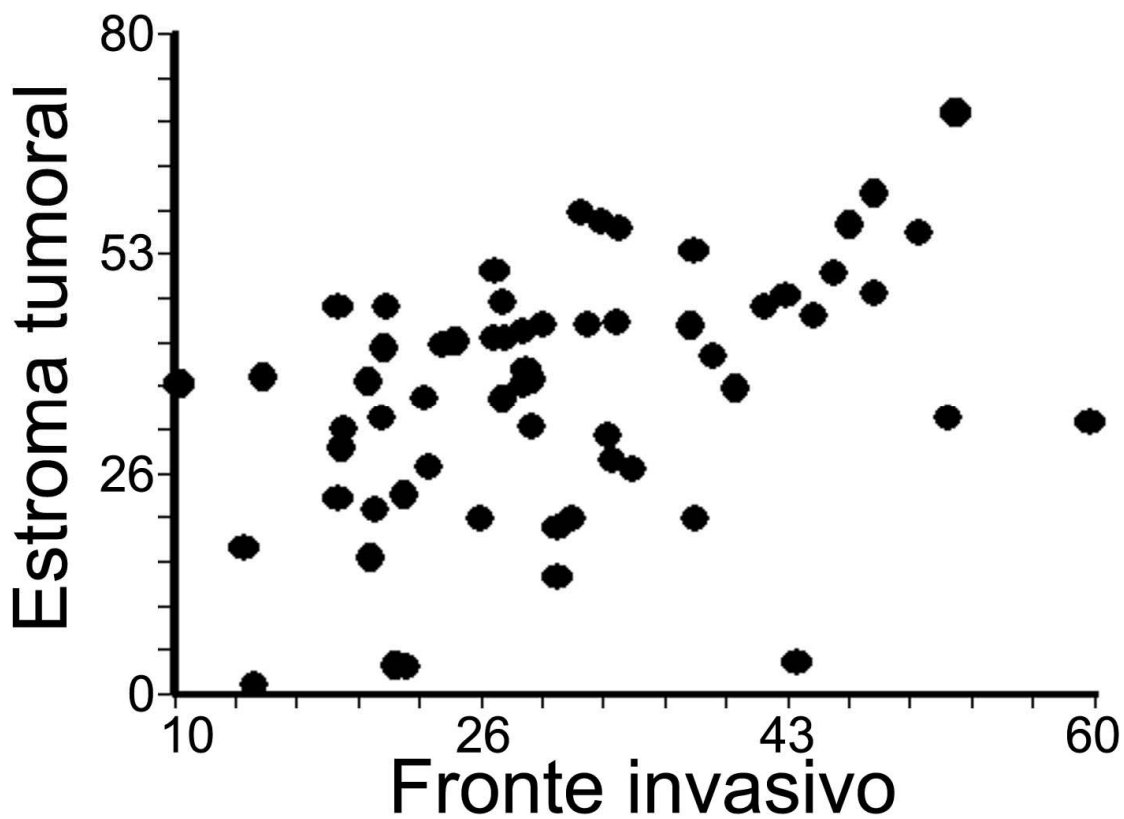


Figura 5. Correlação entre o índice de expressão imunohistoquímica de Ki-67 no estroma e frente tumoral. Uma forte e significativa correlação entre a positividade para Ki-67 foi observada entre o estroma e o frente tumoral (coeficiente de Spearman $r=0,63$; $p=0,0005$). A média de células positivas para Ki-67 no frente do tumor foi maior que a média no estroma tumoral.

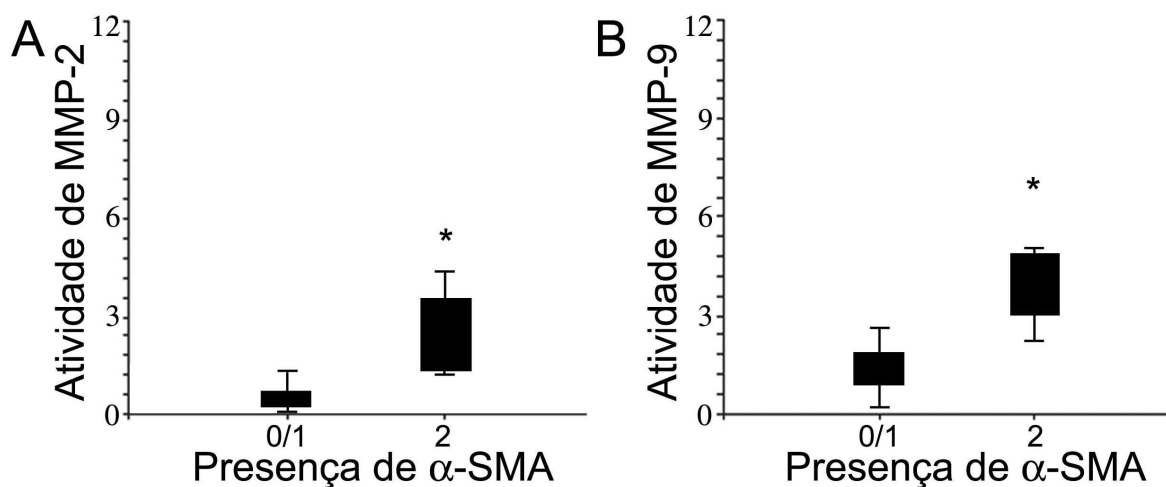


Figura 6. Presença dos miofibroblastos no estroma tumoral correlaciona significativamente com a atividade de MMP-2 e MMP-9 em CECs orais. Uma atividade elevada de MMP-2 **(A)** e MMP-9 **(B)** foi identificada em amostras de CEC oral que apresentavam um número abundante de miofibroblastos. Estes resultados sugerem que os tumores com uma presença abundante de miofibroblastos estão associados a uma maior atividade de MMP-2 e MMP-9, sugerindo um fenótipo mais agressivo. * $p < 0,05$

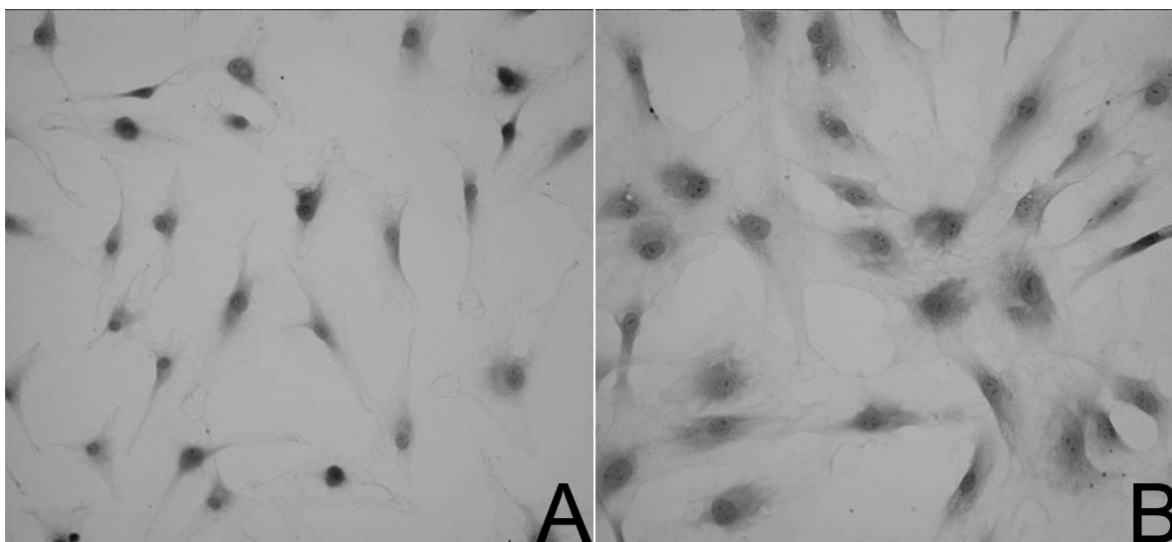


Figura 7. Micrografias representativas do efeito do meio condicionado por células de CEC oral na morfologia dos fibroblastos. É demonstrado um experimento utilizando a linhagens FMN3 e SCC4. Células da linhagem FMN3 foram cultivadas por 3 dias com meio controle **(A)** ou meio condicionado pela linhagem de CEC oral SCC4 **(B)**. Células cultivadas em meio condicionado apresentaram uma morfologia estrelada e um citoplasma mais amplo comparado com células cultivadas em meio controle. (x200)

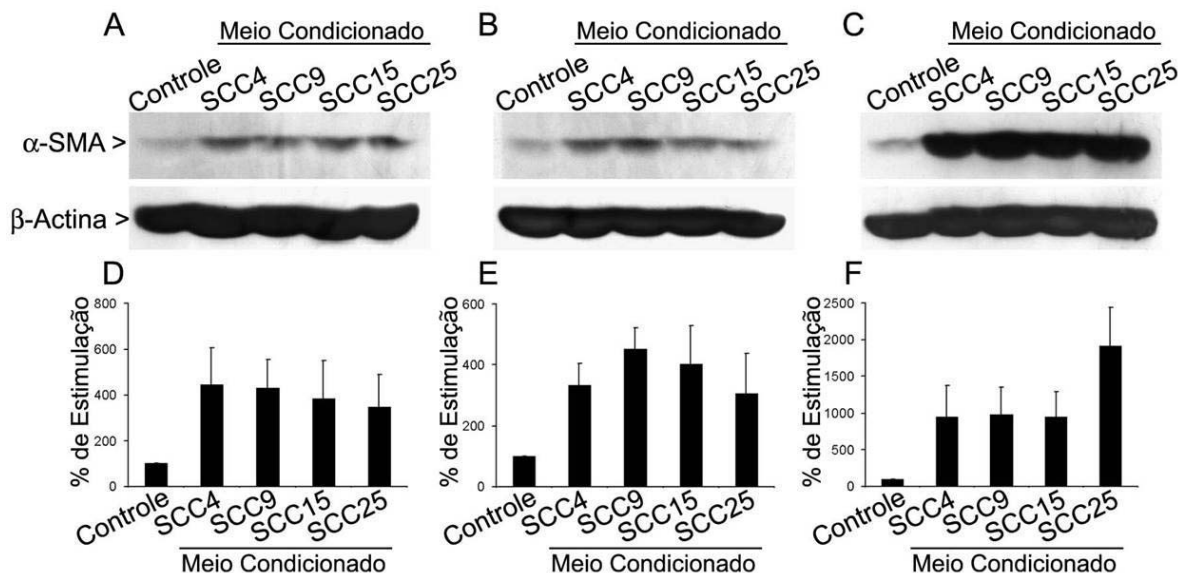


Figura 8. Produtos da síntese das células de CEC oral induzem a transdiferenciação dos FMN em miofibroblastos. FMN incubados com meio de cultura condicionado pelas células de CEC oral por 3 dias foram coletados e submetidos a análise de western blot utilizando anticorpos específicos contra α -SMA e β -actina. Os filmes de 3 experimentos para cada linhagem celular foram escaneados, densitometrados e o valor médio $\pm$ desvio padrão da estimulação da expressão de α -SMA foi calculado tomando-se como referencia o valor da produção de α -SMA pelas células incubadas com meio controle (meio de cultura não condicionado). **(A, B e C)** Análise por western blot e **(D, E e F)** análise densitométrica. **(A e D)** Representam a linhagem FMN1, **(B e E)** a linhagem FMN2 e **(C e F)** a linhagem FMN3. Canaletas são indicadas com a linhagem de CEC oral utilizada para condicionamento do meio.

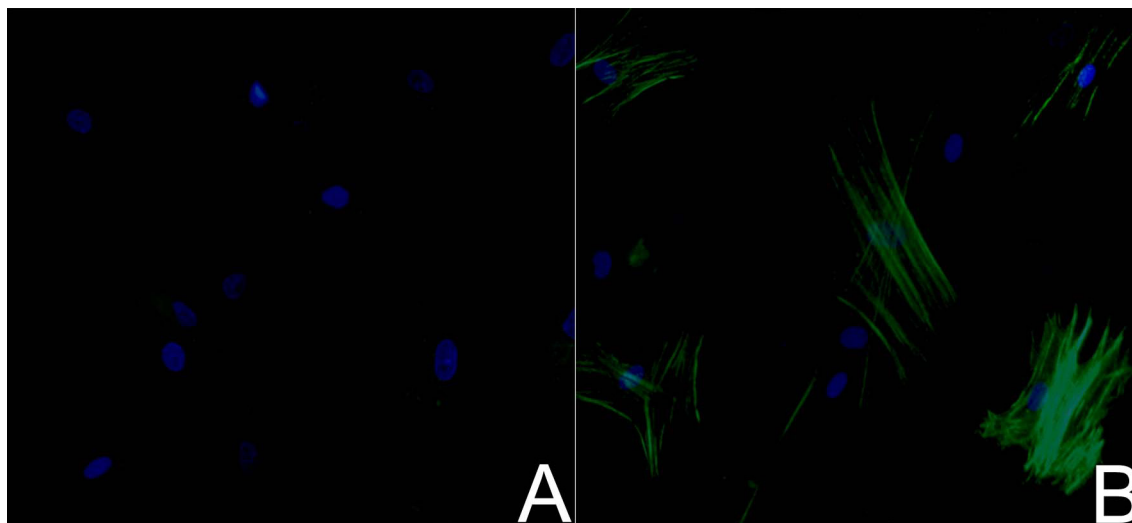


Figura 9. Ensaio de imunofluorescência para avaliar os efeitos do meio condicionado pelas células de CEC oral na transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos. É demonstrado um experimento representativo utilizando a linhagem FMN3 e a linhagem de CEC oral SCC4. **(A)** Células controle e **(B)** células cultivadas com meio condicionado pela linhagem SCC4. Observe a ampla distribuição citoplasmática de α -SMA em um padrão fibrilar nas células cultivadas com meio condicionado. (x200)

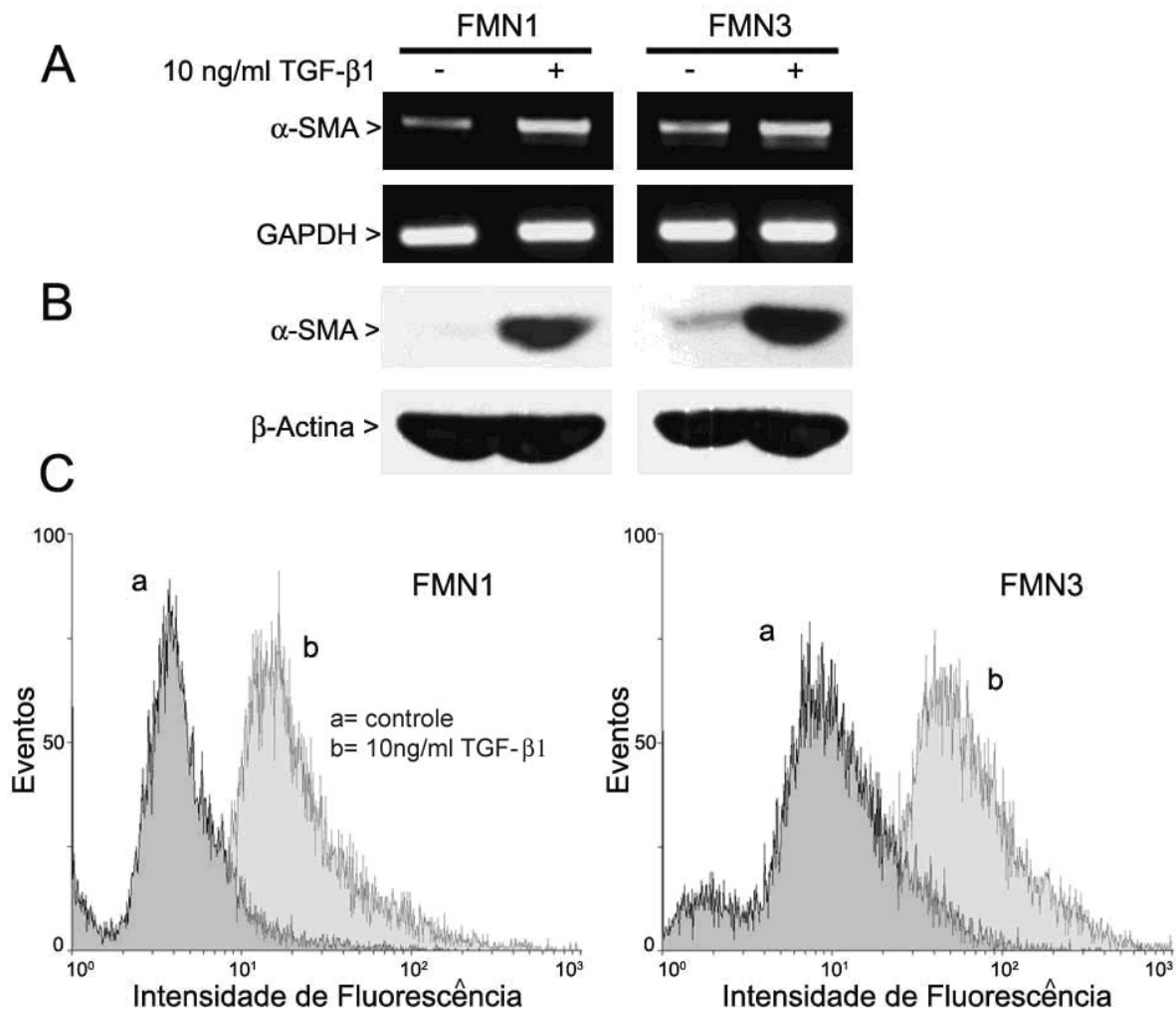


Figura 10. TGF- β 1 induz a transdiferenciação dos FMN em miofibroblastos. As linhagens FMN1 e FMN3 foram tratadas com meio de cultura contendo 0,1% de FBS e 10 ng/ml de TGF- β 1 por 72 h. Em seguida, as células foram coletadas e submetidas à técnica de RT-PCR (**A**), western blot (**B**) e citometria de fluxo (**C**) para avaliar a expressão e produção de α -SMA. TGF- β 1 induziu drasticamente a expressão e produção de α -SMA.

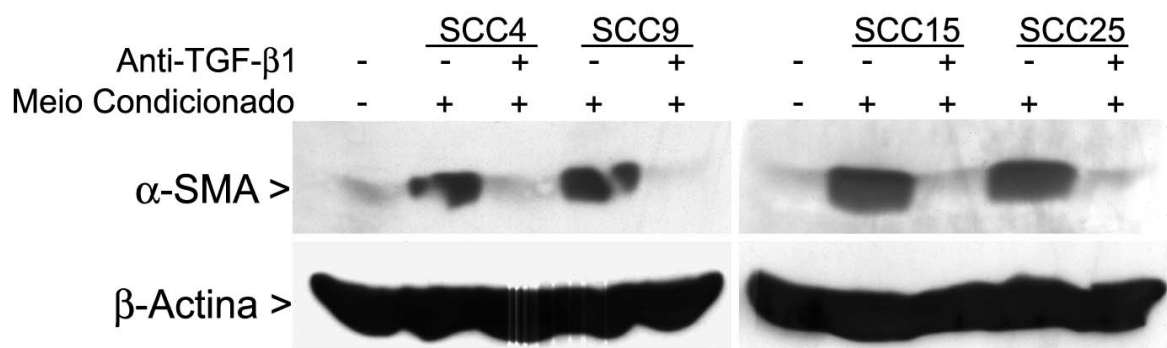


Figura 11. Meio condicionado pelas células de CEC oral é dependente de TGF- β 1 para estimular a transdiferenciação dos miofibroblastos. Western blot com anticorpos específicos para α -SMA e β -actina foram realizados com fibroblastos da linhagem FMN1 em 3 condições: controle, crescido em meio condicionado pelas linhagens celulares de CEC oral e crescido em meio condicionado pelas linhagens de CEC oral acrescido de 10 μ g/ml de anticorpos neutralizantes anti-TGF- β 1. Estes resultados demonstraram que a transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos é dependente de TGF- β 1 liberado pelas células de CEC oral.

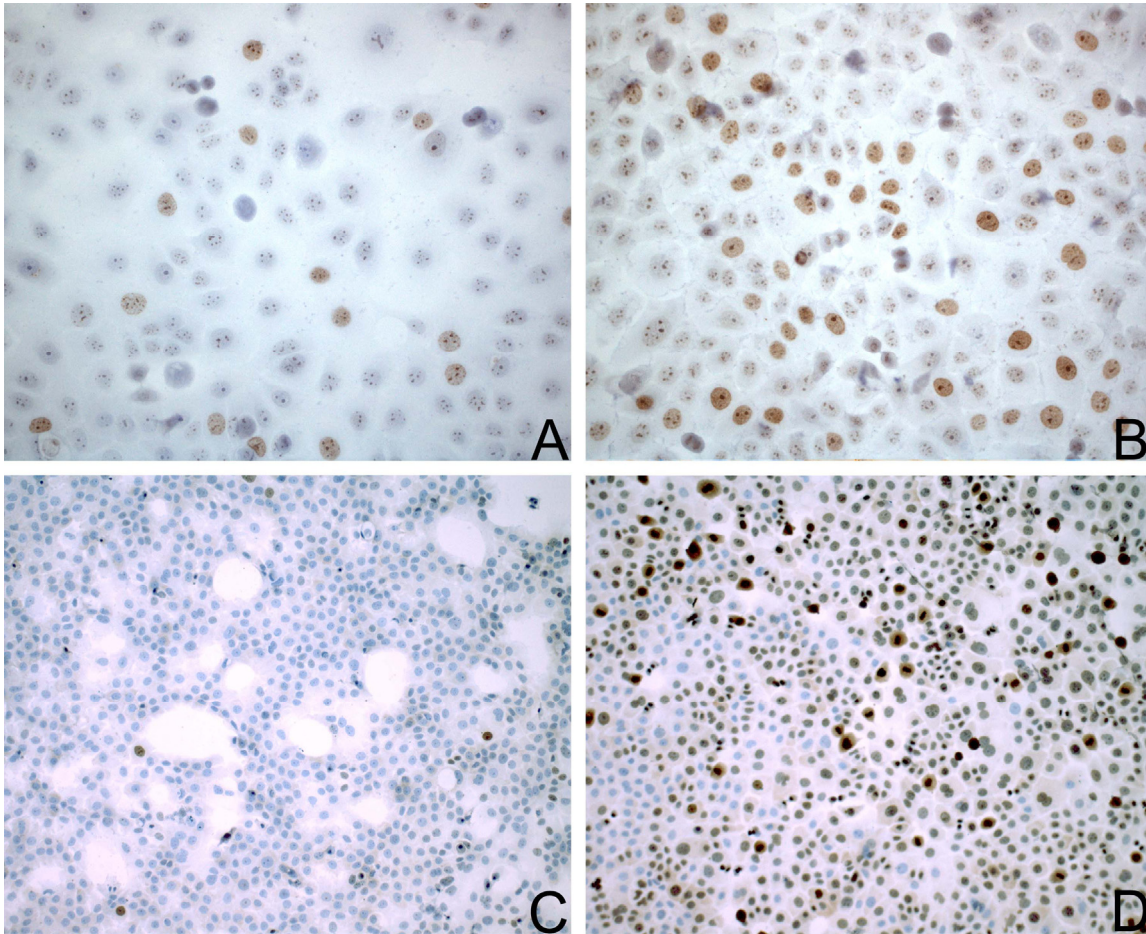


Figura 12. Análise imunocitoquímica representativa da incorporação de BrdU (**A e B**) e Ki-67 (**C e D**) na linhagem de CEC oral SCC4. (**A e C**) representam células incubadas com meio condicionado por fibroblastos e (**B e D**) representam células incubadas com meio condicionado por miofibroblastos (linhagem FMN1 tratada com 10 ng/ml de TGF- β 1 por 3 dias). Observe a maior incidência de células positivas nas culturas cultivadas com meio condicionado por miofibroblastos. (x200)

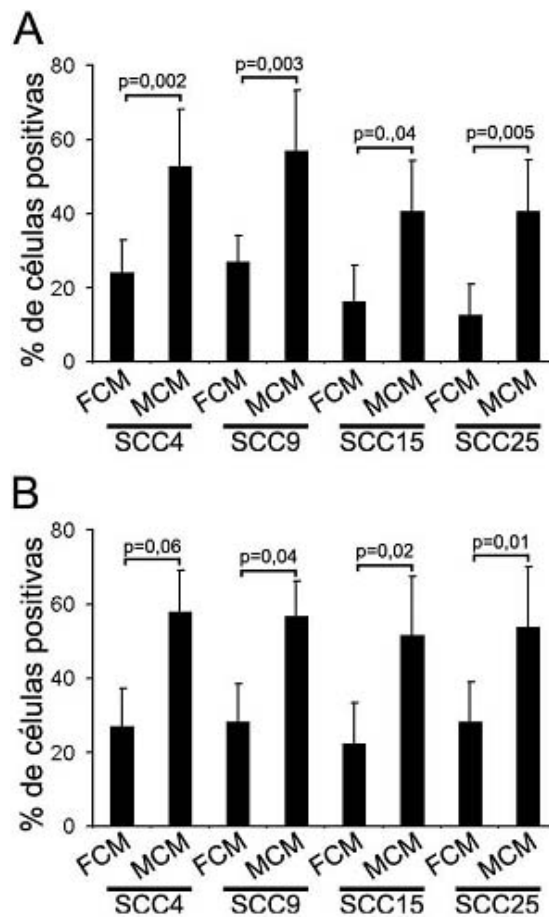


Figura 13. Meio condicionado por miofibroblastos induz a proliferação das células de CEC oral. Células quiescentes foram incubadas com meio condicionado por fibroblastos (FCM) ou meio condicionado por miofibroblastos (MCM) por 24 h. Após 1 h de incorporação de BrdU, células foram fixadas, o DNA desnaturado e o antígeno detectado pela técnica de biotina-avidina-peroxidase. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de células positivas em uma contagem de 1.000 células para cada linhagem em cada tratamento. **(A)** Corresponde a células da linhagem FMN1 e **(B)** células da linhagem FMN3. Observe o significativo aumento na proliferação de todas as linhagens de CEC oral quando tratadas com o meio condicionado por miofibroblastos.

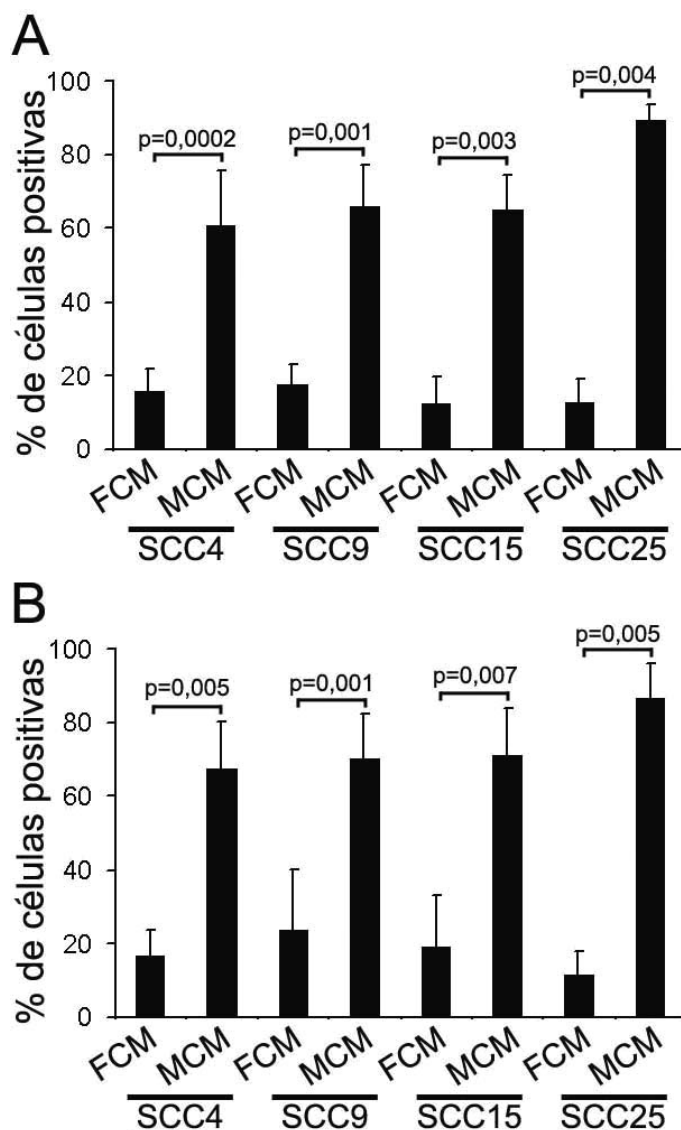


Figura 14. Análise imunocitoquímica da expressão de Ki-67 nas linhagens de CEC oral incubadas com meio condicionado por fibroblastos (FCM) ou meio condicionado por miofibroblastos (MCM) Os valores representam a media $\pm$ desvio padrão de células positivas em uma contagem de 1.000 células em 2 experimentos independentes. **(A)** Corresponde a células da linhagem FMN1 e **(B)** células da linhagem FMN3.

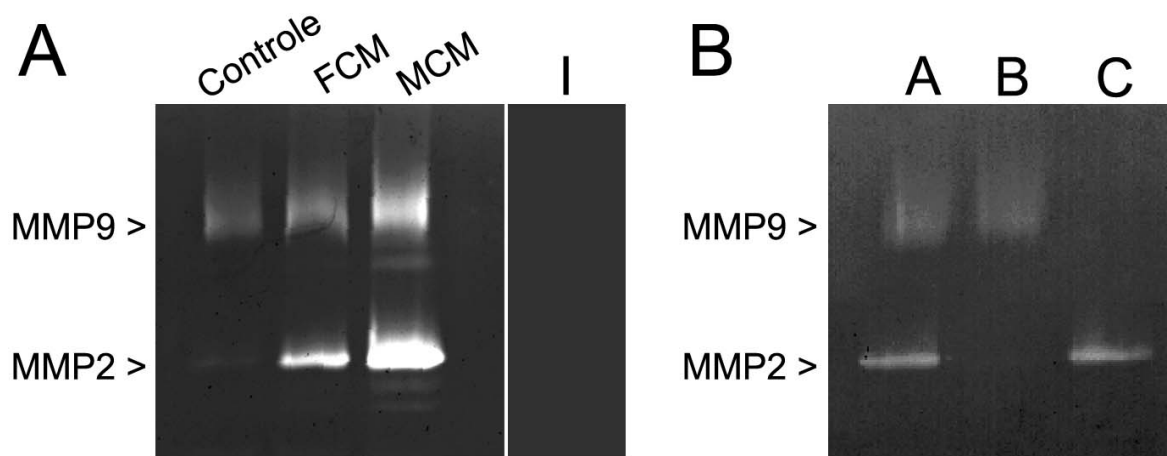


Figura 15. Análise zimográfica representativa do efeito dos produtos de síntese dos fibroblastos e miofibroblastos sobre a atividade de MMP-2 e MMP-9 pelas células de CEC oral. **(A)** Após incubação por 24 h com meio condicionado por fibroblastos (FCM) ou meio condicionado por miofibroblastos (MCM), a atividade de MMP-2 e MMP-9 foi analisada por zimografia. Como controle foi utilizado meio não condicionado. Canaleta marcada com a letra I representa a amostra proveniente do tratamento com MCM incubada no tampão de ativação contendo 1 mM de 1,10-fenantrolina. **(B)** Imunoprecipitação com anticorpos específicos anti-MMP-9 (B) e anti-MMP-2 (C). Canaleta (A) representa a amostra utilizada para as imunoprecipitações.

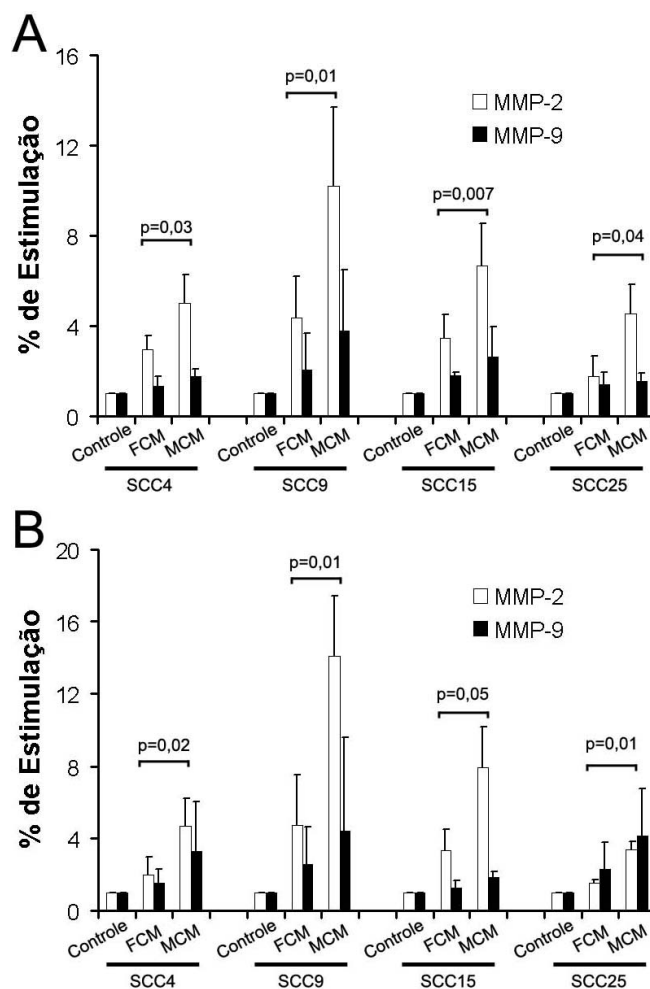


Figura 16. Análise densitométrica do efeito dos produtos da síntese dos fibroblastos e miofibroblastos sobre a atividade de MMP-2 e MMP-9 pelas diferentes linhagens de CEC oral. **(A)** Células foram incubadas com meio de cultura derivado da linhagem FMN1 e **(B)** meio de cultura derivado da linhagem FMN3. Controle representa o meio de cultura não condicionado. (FCM) meio condicionado por fibroblastos e (MCM) meio condicionado por miofibroblastos. A atividade de MMP-2 foi significativamente maior quando as células foram incubadas com meio condicionado por miofibroblastos. Valores de p representam a atividade de MMP-2.

6. DISCUSSÃO

Interações entre o epitélio e o tecido conjuntivo adjacente são essenciais para a manutenção da homeostasia tecidual. Alterações em quaisquer destes tecidos podem influenciar o outro. Então, quando as células epiteliais sofrem transformação maligna e iniciam sua invasão, o tecido conjuntivo passa por inúmeras modificações, visando estabelecer um ambiente propício ou não para o desenvolvimento tumoral (DE WEVER & MAREEL, 2003). Adicionalmente, mudanças no tecido conjuntivo com o desenvolvimento de um estroma tumoral parecem ser uma etapa crítica no crescimento e progressão tumoral (MUELLER & FUSENIG, 2004). Contudo, os mecanismos de indução do estroma tumoral pelas células neoplásicas e o seu papel no controle da carcinogênese não estão completamente compreendidos. Existem fortes evidências de que ocorra uma estimulação recíproca entre as células tumorais e os componentes do estroma através da secreção de fatores de crescimento, citocinas, proteases e proteínas da MEC, promovendo a proliferação, sobrevivência e invasão das células tumorais (BAGLOLE *et al.*, 2006; ORIMO *et al.*, 2005; DE WEVER *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 2004). Uma das características mais evidentes durante o desenvolvimento do estroma tumoral é a presença de miofibroblastos. Existem inúmeros estudos que demonstraram a presença de miofibroblastos no estroma tumoral, incluindo aqueles que utilizaram cânceres de mama (RONNOV-JESSEN *et al.*, 2002; SIEUWERTS *et al.*, 1998), próstata (UNTERGASSER *et al.*, 2005; OLUMI *et al.*, 1999;), pulmão (CEKANOVA *et al.*, 2006), bexiga (KURODA *et al.*, 2006) e fígado (MIKULA *et al.*, 2006). Miofibroblastos também foram encontrados em CECs de

cavidade oral, faringe e laringe (KOJC *et al.*, 2005; BARTH *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 2004).

Os resultados deste estudo demonstraram que um número elevado de CECs orais (aproximadamente 60%) continham miofibroblastos, que estavam localizados principalmente no fronte invasivo do tumor. Em contraste, estas células não foram detectadas no tecido conjuntivo de amostras de mucosa oral normal e leucoplasias com diagnóstico histológico de displasia, sugerindo que um íntimo contato entre as células tumorais e as células do tecido conjuntivo, provavelmente fibroblastos, é necessário para a indução dos miofibroblastos. Outros estudos realizados com câncer de mama, rins, uretra e cólon também demonstraram a ausência de miofibroblastos no estroma de tecidos normais além do fronte invasivo do tumor (KURODA *et al.*, 2006; CIMPEAN *et al.*, 2005; KURODA *et al.*, 2005). Por outro lado, carcinoma ductal *in situ* altamente pleomórfico da mama e carcinoma urotelial de bexiga não-invasivo induziram o aparecimento de miofibroblastos no estroma subjacente às células neoplásicas, demonstrando que fatores derivados das células tumorais agressivas são capazes de se difundir através da membrana basal, estimulando a transdiferenciação dos miofibroblastos (SHIMASAKI *et al.*, 2006; CHAUHAN *et al.*, 2003). Nossos resultados também demonstraram que a presença dos miofibroblastos não foi associada ao grau de diferenciação dos tumores e que o padrão de distribuição dos miofibroblastos (reticular ou fascicular) não correlacionou com nenhuma característica clínico-patológica dos tumores. SHIMASAKI *et al.* (2006) estudaram o padrão de distribuição dos miofibroblastos em amostras de carcinoma de bexiga,

através de técnicas de imunohistoquímica, microscopia eletrônica e imuno eletrônica. Estes autores encontraram uma significativa correlação entre o padrão de distribuição dos miofibroblastos e o grau de diferenciação tumoral, sendo observado um predomínio do padrão fascicular nos carcinomas mais indiferenciados.

O resultado de maior relevância de nosso estudo foi que a presença abundante dos miofibroblastos induziu um comportamento mais agressivo para o CECs orais. A presença de grandes quantidades de miofibroblastos no fronte invasivo do tumor significativamente correlacionou com uma menor taxa de sobrevida global do paciente. Para o nosso conhecimento, esta é a primeira evidência na literatura brasileira que a presença dos miofibroblastos pode ser útil para prever o prognóstico de pacientes afetados por CEC oral. A presença abundante dos miofibroblastos também correlacionou significativamente e positivamente com metástases em linfonodos regionais, presença de invasões linfática, vascular e perineural e elevado potencial proliferativo das células tumorais, sugerindo que a menor sobrevida global dos pacientes pode ser uma consequência de um fenótipo mais agressivo e metastático. Contudo, nós não encontramos nenhuma associação entre a presença dos miofibroblastos e as taxas de recorrência dos CECs orais.

Resultados semelhantes aos nossos foram previamente descritos em cânceres de mama, intestino, pulmão e fígado (GALIE *et al.*, 2005; DESMOULIERE *et al.*, 2004; YAZHOU *et al.* 2004; TOKUNOU *et al.*, 2001, SUZUKI *et al.*, 2000; ADACHI *et al.*, 2000). TOKUNOU *et al.* (2001) encontraram

uma significativa associação entre a presença dos miofibroblastos e um menor período de sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma de pulmão. YAZHOU *et al.* (2004), analisando parâmetros prognósticos para os carcinomas ductais de mama, encontraram uma marcante correlação entre a presença dos miofibroblastos e presença de metástases linfonodais, graduação histológica e alta densidade microvascular do tumor, sugerindo que a presença dos miofibroblastos é associada a um pior prognóstico para o paciente. GALIE *et al.* (2005), utilizando células epiteliais de câncer de mama e células do estroma da mesma lesão, encontraram que as células tumorais induzem um estroma altamente vascular e invasivo com presença de miofibroblastos. Adicionalmente, a presença dos miofibroblastos correlacionou significativamente com o desenvolvimento de metástases, visto que a infiltração destas células precede o recrutamento de células endoteliais em micrometástases avasculares, gerando um estroma específico para a angiogênese do tipo sinusoidal e portal (OLASO *et al.*, 2003). Juntos, estes resultados reforçam nossos resultados clínicos da importância da presença dos miofibroblastos para o comportamento tumoral.

Citocinas secretadas pelas células tumorais ou pelas próprias células do estroma tumoral são os mais prováveis candidatos para induzir a emergência dos miofibroblastos no estroma tumoral (DESMOULIERE *et al.*, 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que células derivadas de CECs orais produzem elevadas quantidades de citocinas e fatores de crescimento, incluindo TGF- β 1, TGF- α , IGF e ILs (JACKSON-BERNITSAS *et al.*, 2006; LEWIS *et al.*, 2004;

NATSUGOE *et al.*, 2002; KOLIOPANOS *et al.*, 2002; HAGEDORN *et al.*, 2001; SOLORZANO *et al.*, 1997). Em particular, TGF- β 1 parece ser o principal fator responsável pela indução da transdiferenciação dos miofibroblastos a partir de fibroblastos (para revisão ver DESMOULIERE *et al.*, 2005). Nosso grupo recentemente demonstrou que TGF- β 1 induz a transdiferenciação de fibroblastos gengivais em miofibroblastos em uma maneira dependente da dose e tempo (SOBRAL *et al.*, In press). Adicionalmente, nós demonstramos que os miofibroblastos transdiferenciados mantêm este fenótipo por, pelo menos, 3 dias sem a presença de TGF- β 1. Neste estudo, o tratamento das linhagens celulares de FMN com 10 ng/ml de TGF- β 1 por 72 h resultou na transdiferenciação de mais de 90% das células em miofibroblastos, como revelado pela expressão de α -SMA e as alterações morfológicas nas células.

Nós também investigamos se o meio de cultura condicionado pelas linhagens celulares de CEC oral é capaz de induzir a transdiferenciação dos FMN em miofibroblastos e analisamos o papel de TGF- β 1 neste processo. Este estudo revelou que o meio condicionado por todas as linhagens celulares de CEC oral estudadas foram capazes de induzir a transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos. Interessantemente, quando anticorpos neutralizantes anti-TGF- β 1, que se ligam de forma estável ao sítio ativo de TGF- β 1, foram adicionados ao meio de cultura condicionado pelas linhagens de CEC oral previamente a incubação com os fibroblastos, a indução da transdiferenciação dos miofibroblastos foi completamente inibida. Resultados similares foram descritos

por LEWIS e colaboradores (2004). Estes autores demonstraram que TGF- β 1 secretado por células de CEC oral induzem a transformação dos fibroblastos em miofibroblastos. Efeitos similares na transdiferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos foram também descritos com culturas celulares de câncer de mama e próstata (WEBBER *et al.*, 1999; OLUMI *et al.*, 1999; SIEUWERTS *et al.*, 1998).

Miofibroblastos podem influenciar o desenvolvimento e progressão tumoral por estimular a proliferação das células neoplásicas, promover angiogênese e linfangiogênese, atenuar a morte celular programada ou estimular a invasão e metástase por induzir proteólise da MEC (POURREYRON *et al.*, 2003; OFFERSEN *et al.*, 2003; ORIMO *et al.*, 2001; VALENTI *et al.*, 2001; SIEUWERTS *et al.*, 1999). Os resultados deste estudo demonstraram que em CECs de língua existe uma significativa correlação entre a presença abundante de miofibroblastos no estroma ou frente invasivo e o elevado potencial proliferativo das células tumorais. Resultados similares foram descritos por SUROWIAK *et al.* (2006) e SUO & NESLAND (2000). Estes estudos demonstraram, através de imunohistoquímica, uma significativa correlação entre a presença de miofibroblastos no estroma tumoral e uma maior expressão de Ki-67 pelas células tumorais.

Embora estes resultados sejam sugestivos da participação dos miofibroblastos na indução da proliferação das células tumorais, eles não são conclusivos. Para confirmar que os miofibroblastos secretam fatores capazes de

estimular a proliferação das células tumorais, nós cultivamos as linhagens celulares de CEC oral com meio de cultura condicionado por fibroblastos ou miofibroblastos e analisamos a proliferação celular através dos ensaios de incorporação de BrdU ao DNA e pela expressão imunocitoquímica de Ki-67. Estes experimentos claramente demonstraram que miofibroblastos são capazes de induzir a proliferação celular das linhagens de CEC oral. Tradicionalmente é assumido que as interações entre as células epiteliais e as células mesenquimais ocorram através da síntese de fatores de crescimento e deposição de macromoléculas da MEC. Contudo, POURREYRON e colaboradores (2003) sugeriram que a maior parte dos efeitos dos miofibroblastos na indução da proliferação celular das células de câncer de cólon são mediados pela síntese de MEC. Em um modelo diferente, KRTOLICA *et al.* (2001) demonstraram que os componentes da MEC secretados pelos miofibroblastos são responsáveis pela proliferação das células tumorais. Por outro lado, TOKUNOU *et al.* (2001) demonstraram que a síntese de HGF/SF por miofibroblastos induz a proliferação das linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão. Mais recentemente, SHAO *et al.* (2006) demonstraram que miofibroblastos estimulam a proliferação das células epiteliais intestinais via secreção do fator de crescimento epidérmico anfiregulina. É nítido que novos estudos são necessários para determinar se os efeitos dos miofibroblastos na indução da proliferação das células tumorais são dependentes da síntese de fatores de crescimento, da secreção de componentes da MEC ou ambos.

Migração das células tumorais pelo tecido conjuntivo é um fenômeno essencial para a invasão e metástase tumoral. Este evento é acompanhado por alterações nas interações entre as células e a MEC e pela secreção de enzimas proteolíticas capazes de degradar os componentes da matriz. As principais enzimas proteolíticas associadas à degradação da MEC são as pertencentes à família das MMPs (VANSAUN & MATRISIAN, 2006). O conceito que a super-expressão de MMPs, principalmente MMP-2 e MMP-9, as quais são capazes de degradar proteínas colagênicas e não-colagênicas da MEC, favorece a tumorigênese é bem estabelecido (para revisão ver KLEIN *et al.*, 2004). Por exemplo, as atividades elevadas de MMP-2 e MMP-9 predizem o período livre de doença de pacientes afetados por CEC oral (YORIOKA *et al.*, 2002).

No presente estudo, a presença de miofibroblastos foi correlacionada com altos níveis de produção de MMP-2 e MMP-9 pelos tumores, sugerindo que miofibroblastos podem estimular a síntese de MMPs pelas células tumorais. Nossa análise *in vitro* confirmou esta hipótese. Células de CEC oral cultivadas com o meio de cultura condicionado por miofibroblastos apresentaram uma atividade gelatinolítica de MMP-2 significativamente maior que células cultivadas com meio condicionado por fibroblastos. Similarmente, a atividade gelatinolítica de MMP-9 foi maior em células cultivadas com meio condicionado por miofibroblastos, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. O estudo publicado por WEBBER e colaboradores (1999) demonstrou os mesmos resultados que nós. Utilizando miofibroblastos e células epiteliais de próstata, este estudo demonstrou que o meio condicionado por miofibroblastos induz significativamente a expressão

de MMP-2, mas não de MMP-9. Miofibroblastos também induziram a ativação de MMP-2 por células epiteliais imortalizadas mas não-transformadas imersas em gel de colágeno, liderando para um comportamento similar ao de tumores (PETERSEN *et al.*, 2003) Adicionalmente, este estudo demonstrou que a implantação de miofibroblastos e células da linhagem de câncer de mama MCF-7 em camundongos nude promove um significativo aumento no tamanho dos tumores formados. Juntos, estes resultados reforçam nossos achados clínicos que evidenciaram um importância para os miofibroblastos no controle do comportamento dos CECs orais.

Em resumo, nossos resultados demonstram que em CECs orais, interações recíprocas entre as células epiteliais transformadas e as células do estroma tumoral ocorrem em resposta ao crescimento e invasão tumoral. *In vivo*, fibroblastos próximos às ilhas tumorais sofrem o processo de transdiferenciação em miofibroblastos, em parte, devido à secreção de TGF- β 1 pelas células tumorais. Por outro lado, os miofibroblastos produzem alguns fatores que estimulam a proliferação celular e produção de MMP-2 pelas células tumorais, favorecendo o crescimento e invasão tumoral. Coletivamente, estes resultados sugerem que a inibição do surgimento ou da função dos miofibroblastos podem representar uma opção terapêutica para os CECs orais ainda inexplorada.

7. CONCLUSÕES

1. Miofibroblastos não foram encontrados em amostras de tecidos orais normais e em leucoplasias com a presença de displasia histologicamente confirmada.
2. Miofibroblastos foram encontrados em aproximadamente 60% das amostras de CEC oral.
3. Em 71,42% das amostras positivas do grupo de CECs de língua (primeiro grupo), os miofibroblastos estavam localizados principalmente no fronte invasivo dos tumores.
4. Nas amostras de CEC de língua, o padrão de distribuição fascicular dos miofibroblastos foi o predominante, embora não tenha existido nenhuma correlação entre o padrão de distribuição dos miofibroblastos e as características clínico-patológicas dos tumores.
5. A presença abundante de miofibroblastos no estroma ou fronte invasivo das amostras de CEC de língua correlacionou significativamente com estágio clínico N, invasão linfática e vascular, presença de metástases histologicamente confirmada em linfonodos, presença de infiltração extra-capsular em metástases linfonodais e potencial proliferativo das células tumorais.
6. A presença de grandes quantidades de miofibroblastos no fronte invasivo dos CECs de língua correlacionou significativamente com um menor período de sobrevida global dos pacientes.

7. A presença abundante de miofibroblastos no estroma das amostras de CEC de várias localidades da cavidade oral (segundo grupo) correlacionou significativamente com estágio clínico N, presença de células tumorais nas margens cirúrgicas, recorrência regional e elevada atividade de MMP-2 e MMP-9 pelos tumores.
8. O tratamento com 10 ng/ml de TGF- β 1 por 3 dias induziu a transdiferenciação dos fibroblastos de mucosa oral normal em miofibroblastos.
9. A secreção de TGF- β 1 pelas linhagens celulares de CEC oral induziu a transdiferenciação dos fibroblastos de mucosa oral normal em miofibroblastos.
10. A proliferação celular das linhagens celulares de CEC oral foi significativamente estimulada pelo meio de cultura contendo os produtos de síntese dos miofibroblastos.
11. A atividade gelatinolítica de MMP-2 pelas linhagens celulares de CEC oral foi significativamente induzida pelos produtos de secreção dos miofibroblastos.
12. A atividade gelatinolítica de MMP-9 foi maior com linhagens celulares de CEC oral cultivadas com meio condicionado por miofibroblastos, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Adachi Y, Yasuda K, Inomata M, Sato K, Shiraishi N, Kitano S. Pathology and prognosis of gastric carcinoma: well versus poorly differentiated type. *Cancer*. 2000; 89(7):1418-24.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scan J Dent Res*. 1987; 95(3) 229-49.

Annes JP, Rifkin DB, Munger JS. Making sense of latent TGF beta activation. *J Cell Sci*. 2003; 116:217-24.

Ariztia EV, Lee CJ, Gogoi R, Fishman DA. The tumor microenvironment: key to early detection. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006; 43(5):393-425.

Arora PD, McCulloch CA. Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1994; 159(1):161-75.

Bagloli CJ, Ray DM, Bernstein SH, Feldon SE, Smith TJ, Sime PJ, *et al*. More Than Structural Cells, Fibroblasts Create and Orchestrate the Tumor Microenvironment. *Immunol Invest*. 2006; 35(3-4):297-325.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357(9255):539-45.

Barth PJ, Schenck Zu, Schweinsberg T, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes, alpha-smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. *Virchows Arch.* 2004; 444(3):231-4.

Bitu CC, Sobral LM, Kellermann MG, Martelli-Junior H, Zecchin KG, Graner E, Colleta RD. Heterogeneous presence of myofibroblasts in hereditary gingival fibromatosis. *J Clin Periodontol.* 2006; 33(6):393-400.

Bradbury J. A two-pronged approach to the clinical use of HGF. *Lancet.* 1998; 351: 272.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmay GT. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. *J Contemp Dent Pract.* 2005; 6(4):1-16.

Busick TL, Uchida T, Wagner FR Jr. Preventing ultraviolet light lip injury: beachgoer awareness about lip cancer risk factors and lip protection behavior. *Dermato Surg.* 2005; 31(2):173-6.

Cawson AR, Binnie WH, Everson JW. *Atlas Colorido de Enfermidades da Boca,- Correlações Clínicas e Patológicas.* 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1995.

Cekanova M, Mais T, Plummer HK 3rd, Majidi M, Fedorocko P, Schüller HM. Pulmonary fibroblasts stimulate the proliferation of cell lines from human lung adenocarcinomas. *Anticancer Drugs.* 2006; 17(7):771-81.

Charalabopoulos K, Mittari E, Karakosta A, Golias C, Batistatou A. Integrins adhesion molecules and some of their ligands in laryngeal cancer. *Exp oncol*. 2005; 27(2):86-90.

Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. *J Clin Pathol*. 2003;56(4):271-6.

Chen AL, Soman KV, Rychahou PG, Luxon BA, Evers BM. Proteomic analysis of colonic myofibroblasts and effect on colon cancer cell proliferation. *Surgery*. 2005; 138(2):382-90.

Chomeczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-9.

Cimpean AM, Raica M, Narita D. Diagnostic significance of the immunoexpression of CD34 and smooth muscle cell actin in benign and malignant tumors of the breast. *Rom J Morphol Embryol*. 2005; 46(2):123-9.

Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell*. 2004; 118(6):671-4.

Colleta RD, Graner E, Lopes MA, Vargas PA, Junior JJ, Almeida OP. Os avanços da biologia molecular e o câncer bucal. *Revista da APCD*. 2002; 56 (1): 62-67.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917):860-7.

Cotran, Kumar, Robbins. *Patologia-Bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Cotrim P, Fregnani ER, Villalba H, Vargas PA, Almeida OP, Colleta RD. Carcinoma espinocelular bucal e suas variantes. BCI.2001; 32 (8):313-319.

Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. Lab Invest. 1990; 63:21-29.

Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Wound Repair Regen. 2005;13(1):7-12.

Desmoulière A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. Lab Invest. 2003; 83(12):1689-707.

Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblasts: a key player in the control of tumor cell behavior. Int J Dev Biol. 2004; 48(5-6):509-17.

De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. J Pathol. 2003; 200(4):429-47.

De Vicente JC, Olay S, Lequerica-Fernandez P, Sanchez-Mayoral J, Junquera LM, Fresno MS. Expression of Bcl-2 but not Bax has a prognostic significance in tongue carcinoma. J Oral Pathol Med. 2006; 35(3):140-5.

De Wever O, Westbroek W, Verloes A, Bloemen N, Bracke M, Gespach C *et al.* Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding. J cell Sci. 2004; 117(Pt 20):4691-703.

De Visser KE, Coussens LM. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. Contrib Microbiol. 2006; 13:118-3

Diaz-Rubio E. Vascular endothelial growth factor inhibitors in colon cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 587:251-75.

Dong Y, Qian J, Hibrahim R, Berzofsky JA, Khleif SN. Identification of H-2Db-specific CD8⁺ T-cell epitopes from mouse VEGFR2 that can inhibit angiogenesis and tumor growth. *J Immunother.* 2006; 29(1):32-40.

Dreys J, Schneider V. The use of vascular biomarkers and imaging studies in the early clinical development of anti-tumour agents targeting angiogenesis. *J Intern Med.* 2006; 260(6):517-29.

Eckes B, Zweers MC, Zhang ZG, Hallinger R, Mauch C, Aumailley M, Krieg T. Mechanical Tension and Integrin $\alpha 2 \beta 1$ Regulate Fibroblast Functions. *J invest Dermatol.* 2006; 126:66-72.

Engbring JA, Kleinman HK. The basement membrane matrix in malignancy. *J Pathol.* 2003; 200(4):465-70.

Eyden BP. Brief review of the fibronexus and its significance for myofibroblastic differentiation and tumor diagnosis. *Ultrastruct Pathol.* 1993; 17:611-622.

Fletcher, CDM. *Diagnostic Histopathology of Tumors.* 2. ed. London, New York, Philadelphia, ST Louis, Sydney, Toronto: Churchill Livingstone; 2000. 1v.

Folkman J, Hannahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp.* 1991; 22:339-47.

Franzke CW, Tasanen K, Schumann H, Bruckner-Tunderman L. Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype. *Matrix Biol.* 2003; 22:299-309.

Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, Gabbert HE. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2003; 10(2):309-13.

Gailit J, Marchese MJ, Kew RR, Gruber BL. The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators. *J Invest Dermatol.* 2001; 117(5):1113-9.

Galie M, Sorrentino C, Montani M, Micossi L, Di Carlo E, D'Antuono T. Mammary carcinoma provides highly tumourigenic and invasive reactive stromal cells. *Carcinogenesis.* 2005; 26(11):1868-78.

Gallagher AJ, Neil JR, Schiemann WP. Role of transforming growth factor-beta in cancer progression. *Future Oncol.* 2006; 2(6):743-63.

Goke M, Kanai M, Podolski DK. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol.* 1998; 274:G809-818.

Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J.* 2004; 18(3):469-79.

Gu L, Zhu YJ, Guo ZJ, Xu XX, Xu WB. Effect of IFN-gamma and dexamethasone on TGF-beta1-induced human fetal lung fibroblast-myofibroblast differentiation. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25(11):1479-88.

Gunhan O, Gardner DG, Bostanci H, Gunhan M. Familial gingival fibromatosis with unusual histologic findings. *J Periodontol.* 1995; 66(11):1008-11.

Haffty BG. Can molecular markers predict local, regional and distant metastasis in head and neck cancer? *Nat Clin Pract Oncol*. 2005; 2(3):132-3.

Hagedorn H, Elbertzhagen A, Ruoss I, Sauer U, Nerlich AG. Immunohistochemical analysis of major TGF-beta isoforms and their receptors in laryngeal carcinomas. *Virchows Arch*. 2001; 439(4):531-9.

Han S, Khuri FR, Roman J. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res*. 2006; 66(1):315-23.

Hannen EJ, Riediger D. The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer: a review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33(1):2-7.

Hashibe M, Ritz B, Le AD, Li G, Sankaranarayanan R, Zhang ZF. Radiotherapy for oral cancer as a risk factor for second primary cancers. *Cancer Lett*. 2005; 220(2):185-95.

Hasina R, Lingen MW. Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ*. 2001; 65(11):1282-90.

Hermesen MAJA, Xie Y, Rooimans MA, Meijer JA, Baak JPA, Plukker JTM. Cytogenetic characteristics of oral squamous cell carcinomas in Fanconi anemia. *Fam Cancer*. 2001; 1(1):39-43.

Huang X, Lee C. Regulation of stromal proliferation, growth arrest, differentiation and apoptosis in benign prostatic hyperplasia by TGF-beta. *Front Biosci*. 2003; 8:s740-9.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992; 69:11-25.

Ichwan SJA, Yamada S, Sumrejkanchanakij P, Ibrahim-Auerkari E, Eto K, Ikeda MA. Defect in serine 46 phosphorylation of p53 contributes to acquisition of p53 resistance in oral squamous cell carcinoma cells. *Oncogene* 2006; 25(8):1216-24.

INCA, Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil-Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. 1996-2006-<http://www.inca.org.br>.

Jablonska E, Piotrowski L, Grabowska Z. Serum Levels of IL-1b, IL-6, TNF-a, sTNF-RI and CRP in Patients with Oral Cavity Cancer. *Pathol Oncol Res*. 1997; 3(2):126-129.

Jackson-Bernitsas DG, Ichikawa H, Takada Y, Myers JN, Lin XL, Darnay BG, et al. Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2006; 26(10): 1385-97.

Jeng JH, Wang YJ, Chiang BL, Lee PH, Chan CP, Ho YS. Roles of keratinocyte inflammation in oral cancer: regulating the prostaglandin E₂, interleukin-6 and TNF- α production of oral epithelial cells by areca nut extract and arecoline. *Carcinogenesis*. 2003; 24(8):1301-1315.

Jin H, Kim TH, Hwang SK, Chang SK, Kim HW, Anderson HK, *et al*. Aerosol delivery of urocanic acid-modified chitosan/programmed cell death 4 complex regulated apoptosis, cell cycle, and angiogenesis in lungs of K-ras null mice. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5(4):1041-9.

Kapila YL, Niu J, Johnson PW. The high affinity heparin-binding domain and the V region of fibronectin mediate invasion of human oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *J Biol Chem*. 1997; 272(30):18932-8.

Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, de Bont ES. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; 50(2):87-100.

Kojc N, Zidar N, Vodopivec B, Galé N. Expression of CD34, alpha-smooth muscle actin, and transforming growth factor beta1 in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Hum Pathol*. 2005; 36(1):16-21.

Koliopanos A, Friess H, di Mola FF, Tang WH, Kubulus D, Brigstock D, et al. Connective tissue growth factor gene expression alters tumor progression in esophageal cancer. *World J Surg*. 2002; 26(4):420-7.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(21):12072-7.

Kunz-schughart LA, Knuechel R. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol*. 2002; 17(2):599-621.

Kuroda N, Nakayama H, Miyazaki E, Toi M, Hiroi M, Ezan H. The distribution of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in colorectal carcinoid tumors. *Histol Histopathol*. 2005; 20(1):27-33.

Kuroda N, Shimasaki N, Miyazaki E, Hamauzu T, Toi M, Hiroi M, *et al* .
The distribution pattern of myofibroblasts and CD34-positive stromal cells in normal renal pelvis and ureter and their cancers. *Histol Histopathol*. 2006; 21(12):1303-7.

Kyung-Whan M. Stromal elements for tumor diagnosis: a brief review of diagnostic electron microscopic features. *Ultrastruct Pathol.* 2006; 29: 305-318.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.

Leitinger B, Hohenester E. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol.* 2006; 26(3): 146-55.

Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, Anderson WP, Speight PM, Marshall JF, *et al.* Tumour-derived TGF- β 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Br J Cancer.* 2004; 90(4):822-32.

Lieubeau B, Heymann M-F, Henry F, Barbieux I, Meflah K, Grégoire M. Immunomodulatory effects of tumor-associated fibroblasts in colorectal-tumor development. *I J Cancer.* 1999; 81:629-636.

Liu CC, Shen Z, Kung HF, Lin MC. Cancer gene therapy targeting angiogenesis: an updated review. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(43):6941-8.

Lopes MA, Coletta RD, Alves FA, Abbade N, Rossi AJr. Reconhecendo e controlando os efeitos colaterais da radioterapia. *Assoc Paul Cirurg Dent.* 1998; 3(52): 241-244.

Margotta V, Capogreco M. Soft tissue pathologies of the oral cavity. *Minerva Stomatol.* 2003; 52(1-2):47-51.

Margulis A, Zhang W, Alt-Holland A, Pawagi S, Prabhu P, Cao J, Zucker S, Pfeiffer L, Garfield J, Fusenig NE, Garlick JA. Loss of intercellular adhesion

activates a transition from low- to high-grade human squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2006; 118(4):821-31.

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral Squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surgery, Oral, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006; 102(1):67-76.

Mass-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig ME. Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures thought IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2001; 114:1075-1084.

Mike P, Östaman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*. 2004; 2:S163-175.

Mikula M, Proell V, Fischer AN, Mikulits W. Activated hepatic stellate cells induce tumor progression of neoplastic hepatocytes in a TGF-beta dependent fashion. *J Cell Physiol*. 2006; 209(2):560-7.

Miller PM, Day TA, Ravenel MC. Clinical implications of continued alcohol consumption after diagnosis of upper aerodigestive tract cancer. *Alcohol Alcohol*. 2006; 41(2):140-2.

Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(11):839-49.

Mukaratirwa S, Koninkx JF, Gruys E, Nederbragt H. Mutual paracrine effects of colorectal tumour cells and stromal cells: modulation of tumour and stromal cell differentiation and extracellular matrix component production in culture. *Int J Exp Pathol*. 2005; 86(4):219-29.

Natsugoe S, Xiangming C, Matsumoto M, Okumura H, Nakashima S, Sakita H, et al. Smad4 and transforming growth factor beta1 expression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. Clin Cancer Res. 2002; 8(6):1838-42.

Neville BW, Dam, DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral & Maxilofacial. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J Clin. 2002; 52: 195-215.

Niquyen NM, Senior RM. Laminin isoforms and lung development: all isoforms are not equal. Dev Biol. 2006; 294(2):271-9.

Offersen BV, Nielsen BS, Hoyer-Hansen G, Rank F, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Am J Pathol. 2003; 163(5):1887-99.

Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, et al. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. Hepatology. 2003; 37(3):674-85.

Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. Cancer Res. 1999;59(19):5002-11.

Opdenakker G, Van Damme J. Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells. Immunol Today. 1992; 13:463-464.

Orimo A, Gupta P, Sgroi D, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell. 2005; 121(3):335-48.

Orimo A, Tomioka Y, Shimizu Y, Sato M, Oigawa S, Kamata K, *et al.* Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression. Clin Cancer Res. 2001; 7(10):3097-105.

Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. Cell Cycle. 2006; 5(15):1597-601.

Orlandini M, Oliveiro S. In fibroblasts Vegf-D expression is induced by cell-cell contact mediated by cadherin-11. J Biol Chem. 2001; 276:6576-6581.

Oshikiri T, Miyamoto M, Shichinohe T, Suzuoki M, Hiraoka K, Nakakubo Y, *et al.* Prognostic value of intratumoral CD8⁺ T lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. J Surg Oncol. 2003; 84(4):224-8.

Parrika M, Kainulainen T, Tasanen K, Vaanem A, Bruckner-Tunderman L, Salo T. Alterations of collagen XVII expression during transformation of oral epithelium to dysplasia and carcinoma. J Histochem Cytochem. 2003; 51:921-929.

Pelucchi C, Talamini R, Negri E, Levi F, Conti E, Franceschi S *et al.* Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. Ann Oncol. 2003; 14(11):1677-81.

Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ, Ronnov-Jessen L. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. Am J Pathol. 2003;162(2):391-402.

Pöschl & Seitz. Alcohol and cancer. Alcohol Alcohol 2004; 39(3):155-65.

Pourreyron C, Dumortier J, Ratineau C, Nejari M, Beatrix O, Jacquier M-F, *et al.* Age-dependent variations of human and rat colon myofibroblasts in culture: Influence on their functional interactions with colon cancer cells. Int J Cancer. 2003; 104(1):28-35.

Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and, cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 289(1):G2-7.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saad JI, West AB. Myofibroblasts. I. paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*. 1999; 277:c1-c19.

Regezi JA, Ramos DM, Pytela R, Dekker NP, Jordan RC. Tenascin and beta 6 integrin are overexpressed in floor of mouth in situ carcinomas and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2002; 38(4):332-6.

Regezi JA, Sciubba JJ. *Oral Pathology-Clinical Pathologic Correlations*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Ronnov-Jessen J, Villadsen R, Edwards JC, Petersen OW. Differential expression of a chloride intracellular channel gene, CLIC4, in transforming growth factor-beta1-mediated conversion of fibroblasts to myofibroblasts. *Am J Pathol*. 2002; 161(2):471-80.

Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schurch W, Gabbiani G. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer*. 1988; 41(5):707-12.

Schwender FT, Wollner I, Kunju LP, Nakhleh RE, Chan KM. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa with metastases to the pericardial cavity, lung and thyroid. *Oral Oncol*. 2002; 38(1):114-6.

Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol*. 2001; 2(4):239-51.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol.* 2000; 36 (5): 404-13.

Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology.* 2002; 16(2):217-26, 229.

Shao J, Sheng GG, Mifflin RC, Powell DW, Sheng H. Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. *Cancer Res.* 2006; 66(2):846-55.

Shimasaki N, Kuroda N, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Hiroi M, *et al.* The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness. *Histol Histopathol.* 2006; 21(4):349-53.

Sieuwerts AM, Klijn JG, Henzen-Logmand SC, Bouwman I, Van Roozendaal KE, Peters HA. Urokinase-type-plasminogen-activator (uPA) production by human breast (myo) fibroblasts in vitro: influence of transforming growth factor-beta(1) (TGF beta(1)) compared with factor(s) released by human epithelial-carcinoma cells. *Int J Cancer.* 1999; 76(6):829-35.

Skobe M, Fusenig NE. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:1050-1055.

Sobral LM, Martelli-Junior E, Graner E, Colleta RD. Opposite effects of TGF- β 1 and IFN- γ on transdifferentiation of myofibroblasts in human gingival cell cultures. *J Clin Periodontol.* In press.

Solorzano CC, Jones SC, Pettitjean M, O'Daniel TG, Auffenberg T, Woost PG, *et al.* Inhibition of transforming growth factor alpha stimulation of human squamous

cell carcinoma of the head and neck with anti-TGF- α antibodies and tyrphostin. *Ann Surg Oncol*. 1997; 4(8):670-84.

Stenbeack F, Maelinen MJ, Jussila T. The extracellular matrix skin development: a morphological study. *J Cutan Pathol*. 1997; 26:327-338.

ST John MA, Li Y, Zhou X, Denni P, Ho CM, Montemagno C *et al*. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 130(8):929-35.

Suo Z, Nesland JM. Phyllodes tumor of the breast: EGFR family expression and relation to clinicopathological features. *Ultrastuct Pathol*. 2000; 24(6):371-81.

Surowiak P, Suchocki S, Gyorffy B, Gansukh T, Wojnar A, Maciejczyk A, *et al*. Stromal myofibroblasts in breast cancer: relations between their occurrence, tumor grade and expression of some tumour markers. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006; 44(2):111-6.

Suzuki N, Yokoyama F, Nomizu M. Functional sites in the laminin α chains. *Connect Tissue Res*. 2005; 46(3):142-52.

Suzuki K, Yokose T, Yoshida J, Nishimura M, Takahashi K, Nagai K, *et al*. Prognostic significance of the size of central fibrosis in peripheral adenocarcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg*. 2000;69(3):893-7.

Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1:S59-66.

Tandle A, Blazer DG, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J Transl Med*. 2004; 2(1):22.

Tang WW, Ulich TR, Lacey DC, Hill MQ, Kaufman GY, Tarplei JE *et al.* Platelet derived growth factor-BB induces renal tubulointestinal myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 1996; 148:1169-1180

Thomas GJ, Lewis MP, Hart IR, Marshall JF, Speight PM. AlphaVbeta6 integrin promotes invasion of squamous carcinoma cells through up-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Int J Cancer*. 2001; 92(5):641-50.

Thomas GJ, Nystrom ML, Marshall JF. Alpha v beta6 integrin in wound healing and cancer of the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. 2006; 35(1):1-10.

Thun MJ, Henley SJ, Gansler T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. *Novartis Found Symp* 2004; 256:6-21

Ilstiy TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006; 1:119-1150.

Tokunou M, Niki T, Eguchi K, Iba S, Tsuda H, Yamada T, *et al.* c-MET expression in myofibroblasts: role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2001;158(4):1451-63.

Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphoring receptors: cell signaling for invasive growth. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:289-300.

Tsukamoto H, Mishima Y, Hayashibe K, Sasase A. Alpha-smooth muscle actin expression in tumor and stromal cells of benign and malignant human pigment cell tumors. *J Invest Dermatol*. 1992; 98(1):116-20.

Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. Clin Cancer Res. 2002; 8(9):2912-23.

Untergasser G, Gander R, Lilq C, Lepperdinger G, Plas E, Berger P. Profiling molecular targets of TGF-beta1 in prostate fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. Mech Ageing Dev. 2005; 126(1):59-69.

Vairaktaris E, Yannopoulos A, Vvlliotis A, Yapijakis C, Derka S, Vassiliou S. Strong association of interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphism with increased risk of oral cancer. Int J Biol Markers. 2006; 21(4):246-50.

Valenti MT, Azzarello G, Balducci E, Sartore S, Sandri M, Manconi R, *et al.* Conditioned medium from MCF-7 cell line induces myofibroblast differentiation, decreased cell proliferation, and increased apoptosis in cultured normal fibroblasts but not in fibroblasts from malignant breast tissue. Histochem J. 2001; 33(9-10):499-509.

VanSaun MN, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease. Birth Defects Res C Embryo Today. 2006; 78(1):69-79.

Vaquero E, Molero X, Tian X, Salas A, Malagelada Jr. Myofibroblast proliferation, fibrosis, and defective pancreatic repair induced by cyclosporin in rats. Gut. 1999; 45(2):269-77.

Wang, YF, Chang SY, Tai SK, Li WY, Wang LS. Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 receptor expressions in oral squamous cell carcinoma. Head Neck 2002; 24(9):850-8

Webber MM, Bello-DeOcampo D, Quader S, Deocampo ND, Metcalfe WS, Sharp RM. Modulation of the malignant phenotype of human prostate cancer cells by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR). Clin Exp Metastasis. 1999;17(3):255-63.

Witz IP. Tumor-microenvironment interactions: the selectin-selectin ligand axis in tumor-endothelium cross talk. Cancer Treat Res. 2006; 130:125-40.

Yazhou C, Wenlv S, Weidong Z, Licun W. Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast. Tumour Biol. 2004; 25(5-6):290-5.

Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. Int J Oncol 2002; 20(1):189-94

Zhang G, Luo X, Sumithran E, Pua VSC, Barnetson RStC, Halliday GM, *et al.* Squamous cell carcinoma growth in mice and in culture is regulated by c-Jun and its control of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression. Oncogene. 2006; 25(55):7260-6.

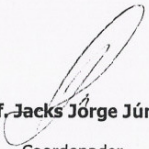
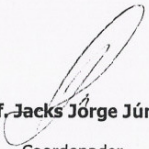
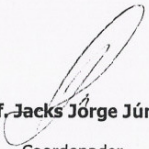
Zhang Y, Lu H, Dazin P, Kapila Y. Squamous cell carcinoma cell aggregates escape suspension-induced, p53 mediated anoikis: fibronectin and integrin α 5 mediate survival signals through focal adhesion kinase. J Biol Chem. 2004, 279:58342-58349.

Zigrino P, Löffek C, Mauch C. Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. Biochimie. 2005; 4(6):496-502.

Ziober AF, Falls EM, Ziober BL. The extracellular matrix in oral saquamous cell carcinoma: friend or foe? Head Neck. 2006; 28(8):740-9.

Ziober BL, Silverman SS Jr, Kramer RH. Adhesive mechanisms regulating invasion and metastasis in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(6):499-510.

9. ANEXO

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS			
CERTIFICADO				
O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Participação dos miofibroblastos no aumento gengival induzido por ciclosporina, na fibromatose gengival hereditária e nos carcinomas espinocelulares orais", protocolo nº 141/2006, dos pesquisadores RICARDO DELLA COLETTA, LAYS MARTIN SOBRAL, MICHELE GASSEN KELLERMANN e PATRICK FRANZ MONTAN, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 18/10/2006. The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Myofibroblasts participation in gingival overgrowth induced by cyclosporine, hereditary gingival fibromatosis and oral spinocellular carcinoma", register number 141/2006, of RICARDO DELLA COLETTA, LAYS MARTIN SOBRAL, MICHELE GASSEN KELLERMANN and PATRICK FRANZ MONTAN, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 18/10/2006.				
<table style="width: 100%; border: none;"><tr><td style="width: 50%; text-align: center;"> Profa. Cecília Gatti Guirado Secretária CEP/FOP/UNICAMP</td><td style="width: 50%; text-align: center;"> Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP</td></tr></table>			 Profa. Cecília Gatti Guirado Secretária CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
 Profa. Cecília Gatti Guirado Secretária CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP			
Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.				