



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



Estudo piloto da presença de miofibroblastos estromais e carcinomas espinocelulares orais de pacientes jovens

Marina Barbosa Azevedo

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Universidade Estadual de Campinas

PIRACICABA 2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



Marina Barbosa Azevedo

Estudo piloto da presença de miofibroblastos estromais e carcinomas espinocelulares orais de pacientes jovens

**Monografia apresentada como requisito para conclusão de curso e
obtenção de título de cirurgião-dentista.**

Orientador: Alan Roger dos Santos Silva

Piracicaba 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Az25e	Azevedo, Marina Barbosa, 1993- Estudo piloto da presença de miofibroblastos estromais e carcinomas espinocelulares orais de pacientes jovens / Marina Barbosa Azevedo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2014. Orientador: Alan Roger dos Santos Silva. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Neoplasias bucais. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Miofibroblastos. I. Santos-Silva, Alan Roger, 1981-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
-------	--

Dados fornecidos pelo autor do trabalho

Dedicatória

Aos meus pais, **Carlos Alberto de Azevedo** e **Cristina Lúcia Barbosa Azevedo** por todo amor, dedicação, cuidado e exemplo de vida.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** pela oportunidade de ter chegado até aqui. A fé foi o melhor refúgio nos momentos difíceis e a certeza de que tudo daria certo.

Agradeço aos meus pais **Carlos** e **Cristina**, a quem tudo devo. Obrigada pela cumplicidade em todas as ocasiões. Obrigada pela confiança que me transmitiram nos momentos de dúvidas, pelo carinho que tiveram com os meus medos e pelo amor incondicional que sempre me fez querer continuar.

Agradeço minha irmã **Flávia** que mesmo a distância me ensinou através de exemplos concretos que a bondade é uma virtude inigualável.

Agradeço meus avôs **Ildeu** e **José** (em memória) e avós **Marta** e **Helena** que de um modo especial me mostraram que a paciência é um dom valioso a ser conquistado.

Agradeço ao professor **Alan Roger Santos Silva** pela paciência, atenção e dedicação em conduzir esse trabalho ao meu lado. Obrigada pela oportunidade e pelo exemplo profissional que me transmitiu ao longo desses anos, levarei esses ensinamentos sempre comigo.

Agradeço aos meus **amigos** que, perto ou longe, sempre estiveram presentes. Sem esse apoio não teria sido tão prazeroso caminhar até aqui.

Agradeço a tão querida amiga **Imaculada** que como uma segunda mãe me ensina a permanecer na estrada do bem e da fé.

Resumo

A evidência de uma maior agressividade de carcinomas espinocelulares orais (CEO) afetando pacientes jovens vem estimulando inúmeros estudos que avaliam as características moleculares das células epiteliais neoplásicas envolvidas nessas lesões. Entretanto, nenhum estudo foi realizado no sentido de avaliar a presença e a função dos miofibroblastos no estroma tumoral de jovens, correlacionando-os com o comportamento biológico das mesmas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de miofibroblastos no estroma de CEO em pacientes jovens, comparando-os com o mesmo tipo de lesão acometendo pacientes mais velhos, acima dos 40 anos de idade. Foram avaliados 20 casos de CEOs de pacientes com idade inferior a 40 anos. Os casos foram investigados quanto à presença de miofibroblastos pela reação imunoistoquímica contra α -actina de músculo liso (α -AML) utilizando-se a técnica da imunoperoxidase e os resultados obtidos foram correlacionados com a ploidia dos tumores e comparados à expressão observada nos casos de CEOs afetando pacientes acima de 40 anos de idade. Os resultados encontrados neste estudo piloto mostram preponderância pelo sexo masculino no grupo dos pacientes jovens, enquanto que no grupo dos pacientes mais velhos a maioria é do sexo feminino. A maior parte dos pacientes mais velhos faz uso de tabaco e álcool. Cinquenta e cinco por cento das lesões em pacientes jovens continha miofibroblastos no estroma em comparação com 80% dos pacientes mais velhos. Nenhuma diferença significativa pode ser vista na comparação entre os grupos e não houve correlação entre a expressão de α -AML no estroma tumoral, grau histológico dos tumores, estágio clínico da doença no momento do diagnóstico ou estado da ploidia tumor.

Palavras-chave: câncer oral; carcinoma espinocelular; miofibroblastos; actina de músculo liso.

Abstract

Background: The evidence of increased aggressiveness of oral squamous cell carcinoma (OSCC) affecting young patients has stimulated numerous studies evaluating the molecular characteristics of neoplastic epithelial cells involved in these lesions. However, no study was conducted to assess the presence and function of myofibroblasts in tumor stroma of young patients, correlating them with the biological behavior of the same. Therefore, the aim of this study was to evaluate the presence of myofibroblasts in the stroma of OSCC in young patients, comparing them with the same type of lesion affecting older patients above 40 years of age. Twenty cases of patients younger than 40 years old with OSCC were evaluated. The cases were investigated for the presence of myofibroblasts by immunohistochemistry against α -smooth muscle actin (α -SMA) using the immunoperoxidase technique and the results were correlated with tumor ploidy and compared to the expression observed in cases of OSCC affecting patients over 40 years of age. The results of this pilot study show a preponderance of males in the group of young patients, whereas in the group of older patients the majority is female. Most of the older patients were tobacco and alcohol users. Fifty-five percent of lesions in young patients contained myofibroblasts in the stroma compared with 80% of older patients. No significant difference could be seen in the comparison between the groups and no correlation between the expression of α -SMA in tumor stroma, tumor histological grade, clinical stage of disease at diagnosis or tumor ploidy status.

Keywords: Oral cancer; oral squamous cell carcinoma; myofibroblasts; SMA; young patients.

Sumário

Introdução.....	10
Revisão da literatura.....	12
Proposição.....	15
Materiais e Métodos.....	16
Resultados.....	18
Discussão.....	20
Conclusão.....	23
Tabelas.....	24
Referências Bibliográficas.....	27
Documentação Fotográfica.....	32
Documentos Anexados.....	34

1. Introdução

O câncer oral é um problema de saúde em todo o mundo e abrange aproximadamente 6% de todos os tumores malignos em países desenvolvidos, ocupando a sexta colocação dentre as neoplasias malignas mais comuns no mundo; e, na maioria das vezes, está relacionado ao uso de produtos contendo tabaco (Vered et al., 2007; Warnakulasuriya, 2009; Chaturvedi et al., 2013; Coelho, 2012) e ao etilismo. O carcinoma espinocelular é o subtipo mais comum de câncer oral, responsável por 95% dos tumores malignos da boca (Vered et al., 2009; Pontes et al., 2011). Ainda que esses tumores sejam frequentemente diagnosticados na população adulta, por volta dos cinquenta anos de idade, a incidência do carcinoma espinocelular oral (CEO) em pacientes jovens (com idade inferior a 40 anos) tem mostrado um aumento em diferentes partes do mundo, embora os exatos mecanismos e os possíveis fatores etiológicos relacionados a sua origem e progressão em pacientes jovens continuem incertos (Ribeiro et al., 2009). Além disso, o comportamento biológico dos CEO afetando pacientes jovens tem sido motivo de controvérsias, uma vez que alguns autores relatam um comportamento clínico mais agressivo se comparado aos casos de acometimento mais tardio (Sarkaria et al., 1994; Vargas et al., 2000; Siriwardena et al., 2007; Vered et al., 2009), enquanto outros não apontaram diferenças significantes entre ambos os grupos (Vered et al., 2007; Sobral et al., 2011).

Os miofibroblastos foram inicialmente identificados em tecidos de granulação e feridas (Vered et al., 2007; Sobral et al., 2011; Thode et al., 2011). Eles exibem um fenótipo intermediário entre fibroblastos e células musculares, sendo caracterizados pela expressão de α -actina de músculo liso (α -AML) (Vered et al., 2009). Nos últimos anos, os miofibroblastos têm sido considerados o principal componente estromal de diferentes malignidades e agora se acredita que eles possuem um papel importante na sinalização epitélio/estroma que conduz à transformação maligna, ao crescimento e progressão das células epiteliais neoplásicas (Vered et al., 2007; Sobral et al., 2011). Tem sido demonstrado que através da expressão de citocinas, proteínas

da matriz extracelular e enzimas entre células neoplásicas e células estromais das lesões, os miofibroblastos podem promover a invasão e migração tumoral; sendo dessa forma implicados no potencial agressivo de inúmeras neoplasias epiteliais (Kellerman et al., 2007; Surowiaki et al., 2007; Tsujino et al., 2007).

Estudos recentes evidenciaram que miofibroblastos poderiam estimular o crescimento, a proliferação e a invasividade dos CEOs, considerando que células malignas podem induzir diretamente a transdiferenciação dos miofibroblastos e ilustrando a interação molecular entre ambos os componentes no processo carcinogênico (Kellerman et al., 2007; Kellerman et al., 2008; Marsh et al., 2011; Sobral et al., 2011). Consequentemente, devido ao aumento da agressividade dos CEO em pacientes jovens, especulado na literatura, e à recente descrição da associação entre miofibroblastos e à agressividade clínica do câncer, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de miofibroblastos no estroma de CEOs em pacientes jovens, comparando-os com o mesmo tipo de lesão acometendo pacientes mais velhos, acima dos 40 anos de idade.

2. Revisão da Literatura

As neoplasias malignas constituem a segunda maior causa de morte na população brasileira. No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade oral em homens é o quarto mais frequente nas regiões Sudeste (15,48/ 100 mil) e Nordeste (7,16/ 100 mil). Na região Centro-Oeste, é o quinto (8,18/ 100 mil). Nas regiões Sul (15,21/ 100 mil) e Norte (3,21/ 100 mil), o sexto. Para as mulheres, é o nono mais frequente nas regiões Sudeste (4,88/ 100 mil) e Nordeste (3,72/ 100 mil). Na região Norte (1,60/ 100 mil), ocupa a 11ª posição. Na região Centro-Oeste (3,30/ 100 mil), é o 12º mais frequente (INCA,2014).

O CEO é uma neoplasia maligna derivada do epitélio de revestimento e representa a entidade neoplásica maligna mais comum em boca, constituindo mais de 90% dos casos (Siriwardena et al., 2006). Já se sabe que os fatores de risco associados à etiologia do CEO são o consumo de tabaco e bebidas alcólicas (Scully e Felix,2006). Essa neoplasia afeta principalmente homens brancos acima de 60 anos de idade, etilistas e tabagistas (Llewellyn et al., 2004; Sasaki et al., 2005, Scully e Felix, 2006).

Os principais sítios acometidos na cavidade oral são língua (40% dos CEOs), assoalho bucal (20% dos sítios do tumor), gengiva, rebordo alveolar, palato mole e mucosa jugal (Cotrim et al., 2001; Regezi e Sciubba et al., 2000).

CEOs são caracterizados por invasão local, sendo que as metástases ocorrem mais frequentemente nos linfonodos cervicais. O atraso pela procura do tratamento aumenta a incidência de pacientes com metástases cervicais no diagnóstico. Metástases a distância não são muito frequentes, entretanto, quando presentes são encontradas principalmente nos pulmões, ossos, fígado e mediastino (SCHWENDER et al., 2002).

Os pacientes jovens afetados por essa neoplasia apresentam um perfil clínico diferente dos pacientes mais velhos. Pouco se sabe ainda a respeito dos agentes etiológicos e dos fatores de risco do câncer nesses pacientes. Entretanto, podemos considerar que poucos casos estão associados a fatores ambientais ou relacionados a síndromes hereditárias de predisposição ao câncer (Bleyer, 2002).

O que se observa nesses pacientes é que a etiologia e a patogênese do CEO é diferentes nos jovens, principalmente devido à ausência ou curto período de exposição dos jovens a agentes carcinogênicos, à provável ausência de lesões com elevado potencial de malignidade preexistente e ao suposto comportamento biológico mais agressivo do CEO em pacientes mais novos (Sasaki et al., 2005).

Os autores Mackenzie et al. (2000) e Porter, Waugh (2000), mediante os indícios que sugerem que o CEO em pacientes jovens é uma entidade distinta, principalmente por causa do seu aparente comportamento biológico mais agressivo e devido a poucas evidências dos fatores de risco tradicionais (como o tabaco e o álcool), propõem a necessidade de estudos mais amplos. De preferência, envolvendo diferentes áreas geográficas para que se obtenha uma melhor caracterização do perfil clínico dos pacientes jovens com essa neoplasia em boca. Assim, os estudos mult institucionais poderiam reunir casos mais representativos e superar a dificuldade do tamanho reduzido das amostras.

Aparentemente não existem formas de tratamento individualizadas para pacientes jovens com CEO, o que faz com que o tratamento desta população siga o mesmo protocolo aplicado aos pacientes mais velhos. No entanto, uma elevada incidência de margens cirúrgicas comprometidas em pacientes jovens já foi observada, o que sugere que esta falta de tratamento mais específico

poderia gerar impacto negativo no prognóstico e na sobrevida dos pacientes (Mallet et al., 2009).

Estudos recentes evidenciaram que miofibroblastos poderiam estimular o crescimento, a proliferação e a invasividade dos CEC, considerando que as células malignas poderiam induzir a transdiferenciação dos miofibroblastos e ilustrando a interação molecular entre ambos os componentes desse processo carcinogênico (Kellerman et al., 2007; Kellerman et al., 2008; Marsh et al., 2011; Sobral et al., 2011).

Miofibroblastos são células que podem ser originadas a partir 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; Desmouliere et al., 2004). Especula-se que o papel dos miofibroblastos na evolução do câncer, uma vez que eventos relacionados à oncogênese, incluindo a proliferação, adesão, invasão e migração celular podem ser regulados pelos produtos da síntese dos miofibroblastos (BAGLOLE et al., 2006; ORIMO et al., 2005; e LEWIS et al., 2004).

Assim, devido ao aumento da agressividade do CEO em pacientes jovens e a recente descrição da associação dos miofibroblastos e a progressão do número de pacientes acometidos por câncer, esse estudo avaliou a presença desses miofibroblastos no estroma tumoral de pacientes jovens com CEO.

3. Proposição

O estudo visou avaliar a presença de miofibroblastos no estroma de CEO afetando pacientes com idade inferior a 40 anos com o propósito de testar a hipótese de que o componente estromal poderia estar relacionado com o suposto comportamento mais agressivo dessa neoplasia em indivíduos mais jovens, comparando-os com lesões que acometem pacientes acima dos 40 anos.

4. Materiais e Métodos

Foram avaliados 20 casos de CEOs de pacientes com idade inferior a 40 anos. Os casos foram investigados quanto a presença de miofibroblastos pela reação imunoistoquímica α -AML utilizando-se a técnica da imunoperoxidase e os resultados obtidos foram correlacionados com a ploidia dos tumores e comparados à expressão observada nos casos de CEOs afetando pacientes acima de 40 anos de idade.

Amostras de tecido

A amostra dos casos estudados foi constituída por 20 CEOs localizados em diversos sítios anatômicos da boca, previamente fixados em formalina e incluídos em blocos de parafina, provenientes da Universidade Estadual de Campinas (Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Brasil). Pacientes previamente tratados por cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, e casos cujo tecido ou informações clínicas disponíveis para análise eram insuficientes foram excluídos do estudo.

Os dados demográficos (idade e gênero), hábitos sociais (o consumo de tabaco e álcool) e o estágio da doença no momento do diagnóstico das lesões, de acordo com a classificação TNM de tumores malignos (UICC 2002) foram coletados a partir dos prontuários clínicos dos pacientes e arquivos laboratoriais. Os resultados foram comparados a um grupo controle de pacientes com mais de 40 anos selecionados do arquivo da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e classificados quanto ao local do tumor e estágio da doença. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba sob o número 076/2008.

Imunoistoquímica

Para a avaliação imunoistoquímica foram utilizados cortes de 3 μ m em lâminas sinalizadas, as quais foram tratadas por tampão citrato pH 6,0 em micro-ondas para recuperação antigênica. A inibição da peroxidase endógena foi realizada com peróxido de hidrogênio a 10% em cinco banhos, cada um com duração de cinco minutos, e a incubação com os anticorpos monoclonais primários dirigidos contra α -AML (Dako Corp. Carpinteria, CA, USA, diluição 1:200) junto ao BSA foi realizada overnight. Após os anticorpos primários, os cortes foram incubados com anticorpos secundários biotinilados e com o sistema estreptavidina/peroxidase por 30 minutos cada um (LSAB Kit - DakoCytomation, USA). O produto da reação foi visualizado com auxílio de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) e os cortes foram contra corados com hematoxilina de Carazzi (Andrade et al., 2012).

Vasos sanguíneos das lesões foram utilizados como controle positivo interno, enquanto o controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário específico. A presença de células α -AML positivas foram classificadas em negativas (0), escassas (1) e abundantes (2) em duas diferentes áreas do estroma de cada caso e a análise foi realizada cegamente por três observadores independentes. O estroma no interior do tumor, considerado a área de interesse desse estudo, representa a faixa de tecido entre a frente invasiva do tumor e o tecido adjacente normal (Kellerman et al., 2007).

Análise da ploidia do DNA

Com o propósito de correlacionar o conteúdo do DNA celular do CEC oral de pacientes jovens com a presença de miofibroblastos nesses casos, foram utilizados os resultados previamente descritos por Santos-Silva et al (2011).

Análise estatística

As correlações entre a presença de miofibroblastos, os parâmetros clínico-patológicos e os parâmetros de ploidia dos tumores foram realizadas pelo teste exato de Fisher, com o valor de significância estabelecido em 5% (GraphPad Prism version 5.0).

5. Resultados

Foram analisadas amostras tumorais de 20 pacientes jovens com CEO (tabela 1). A idade média dos pacientes no momento da biopsia foi 32,5 anos (intervalo de 21 - 40), com uma preponderância do sexo masculino (M: F proporção de 1,8:1). Quarenta por cento dos pacientes eram fumantes e 55% eram usuários de álcool. O grupo pareado de 20 pacientes mais velhos apresentou uma média de idade de 63,35 anos (intervalo 41-77 anos) e uma predileção feminina com uma relação masculina: feminino de 1:0,7. A maioria dos pacientes mais velhos relataram uso de tabaco (80%) e o consumo de álcool (70%). Dados relacionados estadiamento clínico dos tumores, bem como de acordo com grau histopatológico dos tumores podem ser encontrados nas tabelas 1 e 2.

Positividade imunoistoquímica para α -AML foi observada em 67,5% (n=27) dos tumores estudados. Notou-se que, na zona do estroma desprovida de tecido neoplásico, nenhuma reação positiva poderia ser encontrada. Considerando-se os casos de CEO que afetam pacientes jovens, positividade para AML foi encontrada em 55% dos casos, sendo n=11 (Figura A e B). Destes, verificou-se uma reação abundante no avanço da área frontal em seis casos e uma reação escassa em outros dois casos (Figura 1C e D). Miofibroblastos foram identificados abundantemente no compartimento estromal de três casos, mas revelou-se escasso em outros seis casos (Figura 1E e F). Nas lesões que afetam os indivíduos mais velhos, a positividade foi observada em 80% da amostra estudada, sendo n=16 (Figura 2A e 2B). Positividade abundante para AML estava presente no compartimento frontal em seis casos e coloração escassa em dez casos (Figura 2C e D). Positividade estromal foi forte em sete casos e escassa em também sete casos (Figura 2E e F). Comparando a expressão de α -AML em pacientes jovens e adultos em ambas as áreas do estroma e da frente, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Nenhuma diferença significativa pode ser vista através da comparação da presença de miofibroblastos entre os casos classificados como estágio I/II e III/IV ($p>0,05$). Da mesma forma, a positividade para α -AML não se correlacionou significativamente com o grau histológico ($p>0,05$) nem com o status da ploidia do DNA de células neoplásicas de CEOs de pacientes jovens ($p>0,05$) (tabela 3).

6. Discussão

CEO é considerado uma doença dos idosos, afetando pacientes com mais de 45 anos de idade, tabagistas e etilistas. No entanto, foi relatado um aumento do número de pacientes jovens diagnosticados com esta condição, nas últimas décadas (Warnakulasuriya et al., 2009; Warnakulasuriya et al., 2007). Embora a incidência de CEO afetando jovens geralmente varia de 2 a 6%, na maioria dos serviços especializados em todo o globo terrestre (Ribeiro et al., 2009; Annertz K et al., 2002; Udeabor et al., 2012; Llewellyn et al., 2004) a maior incidência foi recentemente descrita em algumas partes dos EUA (Schantz et al., 2002), Europa Ocidental (Annertz et al., 2002), América Latina (Pontes et al., 2011; Ribeiro et al., 2009) e Ásia (Iamaroon et al., 2004). Relacionadas a essa variabilidade na epidemiologia do CEO afetando pacientes jovens, são as incertezas quanto ao seu comportamento biológico e clínico. Os casos em pacientes jovens têm sido considerados especialmente preocupantes por aparentemente representarem uma doença mais agressiva do que os diagnosticados em pacientes mais velhos, e por não poderem também ser associados com o consumo de tabaco e álcool, o que sugere que fatores etiológicos alternativos podem estar envolvidos (Ribeiro et al., 2009; Sasaki et al., 2005; Hirota et al., 2008). No entanto, investigações recentes demonstraram não haver diferenças significativas no prognóstico, sobrevida e resposta ao tratamento de pacientes jovens diagnosticados com CEO, quando comparados aos mais velhos e a avaliação molecular das lesões não demonstrou diferenças significativas, sugerindo também que não existem diferenças relevantes (Siriwardena et al., 2007; Warnakulasuriya et al., 2007; Thomas et al., 2012; Benevenuto et al., 2012).

Ainda que a ativação do estroma do hospedeiro tenha sido considerada um passo inicial importante para a tumorigênese em diferentes cânceres humanos (Thode et al., 2011), estudos que investigam os componentes do estroma do CEO afetando indivíduos jovens e sua relevância para o comportamento biológico desses tumores são muito escassas, e os estudos específicos sobre a presença de miofibroblastos, até à data, nunca foi realizado. Portanto, no presente trabalho de conclusão de curso, os autores

avaliaram a presença de miofibroblastos na área frontal invasiva das ilhas neoplásicas e no compartimento estromal geral do CEO de pacientes jovens, com o objetivo de melhor compreender as características biológicas desta apresentação clínica incomum de CEC.

Os resultados obtidos revelaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de miofibroblastos em pacientes jovens, se comparados com indivíduos mais velhos, tanto no fronte do tumor avançando quanto no estroma total das neoplasias. Isto foi ainda apoiado pela falta de associação entre miofibroblastos e grau histopatológico de tumores e estágio clínico dos pacientes. Fato que está de acordo com outros estudos do nosso grupo, que não conseguiram encontrar diferenças no perfil histopatológico do CEO de pacientes jovens e velhos (Ribeiro et al., 2009; Santos-Silva et al., 2011).

Vários estudos têm mostrado que o microambiente de tecidos neoplásicos desempenha um papel ativo na progressão do tumor e, simultaneamente, na conversão de tecido epitelial normal em epitélio displásico de carcinoma, o estroma iria também mudar de um estado ativado em que os fibroblastos, um dos mais importantes constituintes deste compartimento, são transdiferenciados em miofibroblastos ativos, o que representa um evento crucial na carcinogênese humana (Vered et al., 2007; Thode et al., 2011; Barth et al., 2004). Esta mudança no estado de miofibroblastos parece ser mediada por fatores de crescimento e citocinas expressas por células de tumor, especialmente fator de crescimento transformante beta (TGF- β), ao passo que, por sua vez, miofibroblastos secretam numerosos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios que estimulam proliferação de célula neoplásica epitelial (Thode et al., 2011; Marsh et al., 2011; Barth PJ, Schweinsberg et al., 2004). Assim, vários estudos têm demonstrado a importância dos elementos do estroma no desenvolvimento tumoral, crescimento, invasão e agressividade, lustrando miofibroblastos como célula anfitriã induzida por câncer (Etemad-Moghadam et al., 2009). O nosso grupo e de outros autores já demonstraram que miofibroblastos também estaria presente no estroma da CEC, correlacionando de forma significativa para a taxa de metástases regionais e, conseqüentemente, para o prognóstico final de pacientes afetados (Kellermann et al., 2007). No entanto, os estudos não conseguiram demonstrar qualquer

expressão de α -AML em lesões potencialmente malignas da cavidade oral e na mucosa oral normal, destacando que miofibroblastos parecem estar associados com a troca de informações molecular entre os elementos do estroma e neoplasia epitelial (Barth et al., 2004; De-Assis et al., 2012). Isto é ainda suportado no presente estudo, com a falta de imunorreatividade nas zonas desprovidas de ilhas neoplásicas.

Apesar de nenhuma diferença significativa observada no conteúdo de miofibroblastos estromais do CEO afetando pacientes jovens no presente estudo, estudos anteriores descrevem uma maior incidência de anormalidades ploidia de DNA em células epiteliais neoplásicas destes casos, se comparado a CEC de pacientes mais velhos, sugerindo que CEO de jovens adultos que apresentam um aumento da instabilidade gênica (Iamaroon et al., 2004). No entanto, a falta de correlação significativa observada nesse estudo entre a presença de miofibroblastos e o teor de DNA, pode sugerir que esta diferença de características de ploidia não é influenciada por este elemento estromal. Assim, tendo em consideração ambos os estudos, pode-se especular que, se um comportamento clínico distinto realmente existe de fato para os casos que afetam os pacientes jovens, tal característica é independente do componente miofibroblástico do estroma tumoral.

7. Conclusão

Em conclusão, embora sejam necessários mais estudos para compreender melhor as características biológicas da CEO afetando pacientes jovens, os resultados obtidos sugerem que não houve diferença significativa entre o componente estromal miofibroblástico de CEOs afetando indivíduos jovens e idosos e que miofibroblastos não são os responsáveis por qualquer comportamento clínico diferente nos CEOs de pacientes jovens.

8. Tabelas

Caso	Pacientes jovens (idade < 40 anos)					Pacientes idosos (idade > 41 anos)				
	Estágio	Sexo	Idade	Tabaco	Álcool	Estágio	Sexo	Idade	Tabaco	Álcool
1	I/II	F	36	-	-	I/II	F	53	+	+
2	I/II	F	21	-	-	I/II	F	71	+	+
3	I/II	M	28	-	+	I/II	F	69	+	+
4	I/II	M	39	+	+	I/II	F	71	+	-
5	I/II	M	34	+	+	I/II	F	71	-	-
6	I/II	M	31	-	+	I/II	F	57	+	-
7	I/II	M	37	+	-	I/II	M	57	+	+
8	I/II	M	37	+	+	I/II	M	62	+	+
9	I/II	M	35	+	+	I/II	F	41	-	-
10	I/II	M	36	-	+	I/II	F	74	+	+
11	I/II	F	40	-	-	I/II	M	66	-	-
12	I/II	M	26	-	-	I/II	M	58	+	+
13	I/II	M	25	-	+	I/II	M	77	NE	NE
14	I/II	F	33	-	+	I/II	F	67	-	-
15	I/II	F	35	-	-	I/II	M	53	+	+
16	III/IV	M	36	+	-	III/IV	F	52	+	+
17	III/IV	F	31	+	-	III/IV	F	67	+	+
18	III/IV	F	29	-	-	III/IV	F	57	+	+
19	III/IV	M	40	+	+	III/IV	F	56	+	+
20	III/IV	M	31	-	+	III/IV	F	68	+	+

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes jovens e idosos estudados neste projeto de pesquisa.

Pacientes jovens (idade < 40 anos)				Pacientes idosos (idade > 40 anos)		
No.	Grade Histológica	Fronte	Todo o estroma	Grade Histológica	Fronte	Todo o estroma
1	Muito	0	0	Muito	1	1
2	Muito	1	1	Muito	0	2
3	Muito	1	1	Muito	1	1
4	Muito	0	0	Muito	0	0
5	Muito	1	2	Muito	0	0
6	Muito	0	0	Muito	1	2
7	Muito	1	1	Muito	1	2
8	Muito	0	1	Muito	1	2
9	Muito	0	0	Muito	2	1
10	Muito	0	0	Muito	2	2
11	Muito	0	0	Muito	2	1
12	Muito	0	0	Muito	1	1
13	Pouco	2	2	Pouco	1	2
14	Pouco	1	2	Pouco	1	0
15	Moderado	2	0	Moderado	2	1
16	Moderado	0	0	Moderado	2	2
17	Moderado	0	0	Moderado	0	0
18	Moderado	0	1	Moderado	0	1
19	Moderado	0	1	Moderado	2	0
20	Moderado	1	1	Moderado	0	0

0: Negativo; 1: Escasso; 2: Abundante.

Tabela 2. A intensidade da marcação para α -AML em cada caso de acordo com o grau histopatológico dos tumores.

No.	α - AML		Parâmetros de Ploidia				
	Fronte	Todo Estroma	I.D.	D.O.I	I.H.	Células Superiores a 5N (%)	Status de Ploidia
1	0	0	1,6	5,99	26	7,18	Anaploidia
2	1	1	1,73	5,99	25	8,26	Anaploidia
3	0	0	1,41	4,63	22	3,71	Anaploidia
4	0	0	1,01	3,24	28	5,74	Diploidia
5	0	0	2,34	7,69	31	16,57	Anaploidia
6	0	1	1,96	7	33	18,29	Anaploidia
7	0	1	3,1	10,76	39	54,86	Anaploidia
8	1	1	1,99	7	34	23,48	Anaploidia
9	0	0	2,39	8,03	37	19,37	Anaploidia
10	1	2	1,73	6,32	39	30,73	Anaploidia
11	1	1	2,06	7,72	34	32,31	Anaploidia
12	0	0	1,84	6,32	32	21,88	Anaploidia
13	1	1	1,29	4,62	26	3,52	Anaploidia
14	2	2	1,18	4,59	36	18,11	Anaploidia
15	2	2	1,39	4,98	40	16	Anaploidia
16	0	1	1,55	5,63	35	25,24	Anaploidia
17	0	0	2,67	9,05	33	49,48	Anaploidia
18	0	0	1,87	6,67	31	23,45	Anaploidia
19	2	2	2,05	6,66	30	14,97	Anaploidia
20	0	0	2,64	9,1	39	41,61	Anaploidia

0: Negativo; 1: Escasso; 2: Abundante; α -SMA: α -actina de músculo liso; I.D.: índice de DNA; D.O.I: densidade óptica integrada; I.H.: índice de heterogeneidade.

Tabela 3. Intensidade de α -AML encontrada nos 20 casos de CEO afetando pacientes jovens de acordo com o estado de ploidia do DNA.

Referências

1. Vered M, Allon I, Buchner A, miofibroblastos Dayan D. estromais e transformação maligna em um modelo de carcinogênese língua de ratos 4NQO. *Oral Oncol* 2007; 43: 999-1006.
2. Epidemiologia Warnakulasuriya S. global de câncer de boca e orofaringe. *Oral Oncol* 2009; 45: 309-316.
3. Coelho KR. Desafios da carga de câncer oral na Índia. *J Cancer Epidemiol* 2012; 2012: 701-932.
4. Chaturvedi P, Vaishampayan SS, Nair S, Nair D, Agarwal JP, Kane SV, et al. Carcinoma oral de células escamosas provenientes de fundo de fibrose submucosa oral: A doença clinicopathologically distinta. *Head Neck* 2013; 35: 1404-1409.
5. Vered M, Allon I, Buchner A, miofibroblastos Dayan D. estromais acompanhar modificações no fenótipo epitelial displásico língua e lesões malignas. *Câncer Microenviron* 2009; 2: 49-57.
6. Pontes FSC, Carneiro JT, Fonseca FP, Silva TSP, Pontes HAR, Pinto DS. O carcinoma espinocelular da língua e assoalho da boca: Análise da taxa de sobrevida e fatores prognósticos independentes na região amazônica. *J Craniofac Surg* 2011; 22: 925-930.
7. Ribeiro ACP, Santos-Silva AR, Simonato LE, Salzedas LMP, Sundefeld MLMM, Soubhia AMP. Análise clínica e histopatológica de carcinoma epidermóide de boca em jovens. Um estudo descritivo em brasileiros. *Br J Oral e Cirurgia Maxilo-facial* 2009; 47: 95-98.
8. Sarkaria JN, Harari PM. Câncer de língua oral em jovens adultos com menos de 40 anos de idade: Fundamentação para a terapia agressiva. *Head Neck* 1994; 16: 107-111.
9. Vargas H, Pitman KT, JT Johnson, Galati LT. Comportamento mais agressivo do carcinoma epidermóide de língua anterior em mulheres jovens. *Laryngoscope* 2000; 110: 1623-6.
10. Siriwardena BSMS, Tilakaratne A, Amaratunga EAPD, Udagama MNGPK, Ogawa I, Kudo Y, et al. Análise das diferenças histopatológicas e imuno-

histoquímico do carcinoma epidermóide oral em pacientes jovens e idosos no Sri Lanka. J Oral Pathol Med 2007; 36: 357-362.

11. Annertz¹ K, Anderson H, Biörklund A, Möller t, Kantola S, Mork J, et al. Incidência e sobrevivência de carcinoma de células escamosas da língua na Escandinávia, com especial referência aos jovens adultos. Int J Cancer 2002; 101: 95-99.

12. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Características clínico-patológico de carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes <40 anos de idade. J Oral Pathol Med. 2005; 34: 129-33.

13. Udeabor SE, Rana M, G Wegener, Gellrich N, Eckardt AM. Carcinoma de células escamosas da cavidade oral e da orofaringe em pacientes com menos de 40 anos de idade: uma análise de 20 anos. Head Neck Oncol 2012; 4: 28-35.

14. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, S Prapayasatok, Jittidecharaks S, et al. Análise de 587 casos de carcinoma epidermóide de boca no norte da Tailândia, com foco nos jovens. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33: 84-88.

15. Santos-Silva AR, Ribeiro ACP, Soubhia AMP, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM, et al. Altas incidências de anormalidades ploidia de DNA em língua carcinoma de células escamosas de pacientes jovens: um estudo colaborativo internacional. Histopatologia de 2011; 58: 1127-1135.

16. Sobral LM, Bufalino A, Lopes MA, Graner E, Salo T, Coletta RD. Os miofibroblastos no estroma do câncer bucal promover tumorigênese através da secreção de Activin A. Oral Oncol 2011; 47: 840-846.

17. Thode C, Jørgensen¹ TG, Dabelsteen E, Mackenzie I, Dabelsteen S. Significância dos miofibroblastos em carcinoma de células escamosas oral. J Oral Pathol Med 2011; 40: 201-207.

18. Surowiak P, Murawa D, V Materna, Maciejczyk A, Pudelko M, Ciesla S, et al. Ocorrência de miofibroblastos estromais no tecido de câncer de mama ductal invasivo é um fator prognóstico desfavorável. Anticancer Res 2007; 27 (4C): 2917-2924.

19. Tsujino t, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa Y, et al. Miofibroblastos estromais prever a recorrência da doença para o câncer colorretal. Clin Cancer Res 2007; 3: 2082-2090.

20. Kellermann MG, Sobral LM, Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Os miofibroblastos no estroma do carcinoma epidermóide de boca estão associados com mau prognóstico. *Histopatologia* de 2007; 51: 849-853.
21. Kellermann MG, Sobral LM, Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Efeitos parácrinos Mútuos de células de carcinoma de células escamosas orais e fibroblastos oral normal: indução de fibroblastos de transdiferenciação de miofibroblastos e modulação da proliferação de células tumorais. *Oral Oncol* 2008; 44: 509-517.
22. Marsh D, Suchak K, Moutasim KA, Vallath S, Hopper C, Jerjes W, et al. Características do estroma são preditivos de mortalidade da doença em pacientes com câncer bucal. *J Pathol* 2011; 223: 470-481.
23. Warnakulasuriya S, Mak V, Möller H. de sobrevivência de câncer oral em pessoas jovens em South East England. *Oral Oncol* 2007; 43: 982-986.
24. Llewellyn CD, Linklater K, Sino J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. Uma análise dos fatores de risco para câncer de boca em jovens: um estudo de caso-controle. *Oral Oncol* 2004; 40: 204-213.
25. Schantz SP, Yu GP. Cabeça e pescoço de incidência de câncer tendências em jovens americanos, 1973-1997, com uma análise especial para o câncer de língua. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 268-274.
26. Hirota SK, Braga FPF, Penha SS, Sugaya NN, Migliari DA. Fatores de risco para carcinoma de células escamosas oral em pacientes jovens e idosos brasileiros: uma análise comparativa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13: E227-E231.
27. Thomas L, Moore EJ, McGree ME, Olsen KD, Kasperbauer JL, Erickson LA, et al. Recursos prognósticos, estado papilomavírus humano e crescimento expressão do receptor do fator epidérmico no carcinoma epidermóide oral em adultos jovens. *Am J Cabeça Otolaryngol Neck Med Surg* 2012; 33: 650-656.
28. Benevenuto TG, Nonaka CFW, Pinto LP, Souza LB. Análise comparativa imunohistoquímica da proliferação celular e índice angiogênico em carcinomas de células escamosas da língua entre pacientes jovens e mais velhos. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20: 291-297.
29. Barth PJ, Schweinsberg TS, Ramaswamy A, Moll R. CD34 + fibrócitos, musculares myofibroblasts antígeno-positivo a-suaves e expressão CD117 no

estroma de carcinomas de células escamosas invasivo da cavidade oral, faringe e laringe. *Virchows Arch* 2004; 444: 231-234.

30. Etemad-Moghadam S, M Khalili, Tirgary F, Alaeddini M. Avaliação de miofibroblastos em displasia epitelial bucal e carcinoma de células escamosas. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 639-643.

31. De-Assis EM, Pimenta LGGS, Costa-e-Silva E, Souza PEA, Horta MCR. Miofibroblastos estromais em leucoplasia bucal e carcinoma epidermóide de boca. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012; 17: e733-E738.

32. Scully C, Felix DH. Medicina Oral - Atualização para os dentistas. Oral cancer. *Br Dent J*. 2006;200:13-7.

33. Bleyer WA. O câncer em adolescentes mais velhos e adultos jovens: epidemiologia, diagnóstico, o tratamento, a sobrevivência ea importância dos ensaios clínicos. *Med Pediatr Oncol*. 2002;38:1-10.

34. Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, et al. O aumento da incidência de câncer oral entre os jovens: qual é a etiologia? *Oral Oncol*. 2000;36:387-9.

35. Mallet Y, Avalos N, Le Ridant AM, et al. Câncer de cabeça e pescoço em pessoas jovens: uma série de 52 CECs de língua em pacientes com 35 anos ou menos. *Acta Otolaryngol*. 2009;129:1503-8.

36. Porter S, Waugh A. Comente sobre: câncer bucal em adultos jovens. *Br Dent J*. 2000;188:366.

37. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

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

39. Bagloli CJ, Ray DM, Bernstein SH, Feldon SE, Smith TJ, Sime PJ, et al. Mais do que as células estruturais, fibroblastos criam e orquestram o microambiente do tumor. *Immunol Invest*. 2006; 35(3-4):297-325

40. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. Os miofibroblastos na reação do estroma: um jogador-chave no comportamento da célula tumoral. *Int J Dev Biol*. 2004; 48(5-6):509-17.

41. Orimo A, Gupta P, Sgroi D, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R et al. Fibroblastos estromais presentes em carcinomas invasivos humanos de mama promovem o crescimento tumoral e angiogênese através da secreção elevada de SDF-1/CXCL12. *Cell*. 2005; 121(3):335-48.

42. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors Papel de miofibroblastos intestinais no desenvolvimento e reparo do câncer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 289(1):G2-7.
43. Regezi JA, Sciubba JJ. Correlações Clínico-Patológicas Orais. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
44. Schwender FT, Wollner I, Kunju LP, Nakhleh RE, Chan KM. Carcinoma espinocelular da mucosa bucal com metástases para a cavidade pericárdica, pulmão e tireóide. *Oral Oncol*. 2002; 38(1):114-6
45. Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, Anderson WP, Speight PM, Marshall JF, et al. Derivada de tumor a TGF- β 1 modula a diferenciação de miofibroblastos e promove a invasão de HGF / SF- dependente de células de carcinoma escamoso. *Br J Cancer*. 2004; 90(4):822-32.

Documentação Fotográfica:

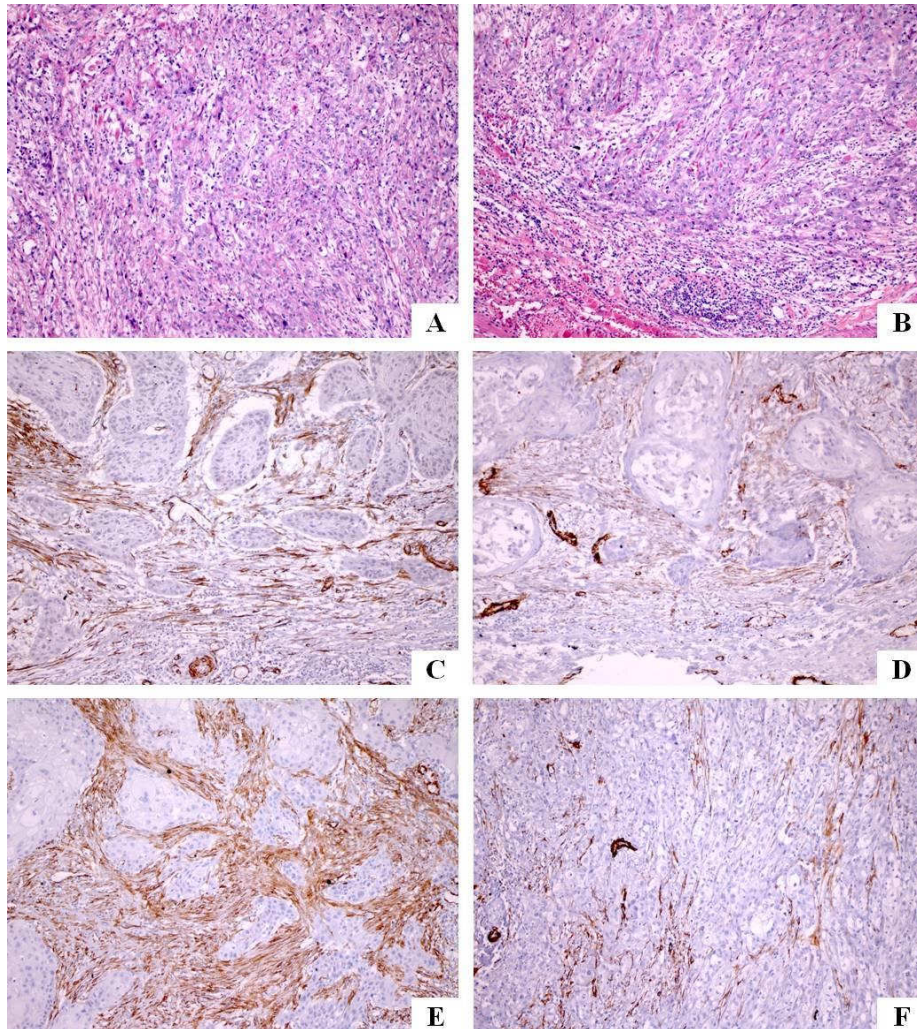


Figura 1. Expressão imunoistoquímica de α -AML e histopatológico de CEO de pacientes com menos de 40 anos de idade. A) Aspecto histopatológico do estroma geral e B) front de invasão (H & E, 100X). C) abundante e D) escassas expressão na área do front tumoral de pacientes jovens (Streptavidina biotina, 100X). E) Abundante e F) escassa expressão de α -AML no estroma total (Streptavidina biotina; 100x)

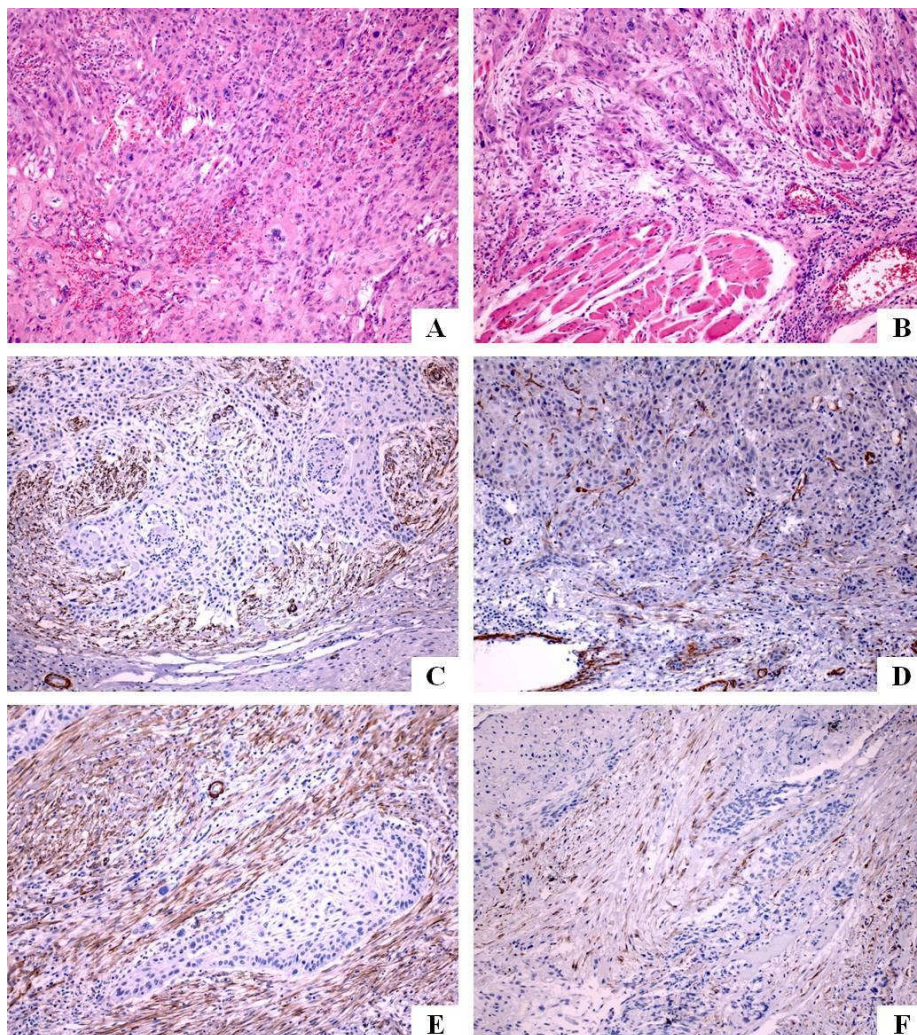


Figura 2. Expressão imunoistoquímica de α -AML em pacientes com mais de 40 anos de idade. A) Aspecto histopatológico do estroma geral e B) da área do front de invasão (H & E, 100X). C) abundante e D) escassa marcação para α -AML na área do front tumoral (Streptavidina biotina; 100x). E) abundante e F) escassa expressão de α -AML no estroma geral do CEO afetando pacientes mais velhos (Streptavidina biotina; 100x).



**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 **"Análise das características clínicas, histopatológicas, imunoistoquímicas e ploidia em pacientes jovens com câncer de boca. Estudo multicêntrico"**, protocolo nº 076/2008, dos pesquisadores Alan Roger dos Santos Silva, Marcio Ajudarte Lopes e Marina Barbosa Azevedo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 13/08/2008, com alterações em 09/10/2014.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project **"Analysis of the clinical, histopathological and immunohistochemical characteristics and ploidy study of young patients with oral cancer. A multicentric study."**, register number 076/2008, of Alan Roger dos Santos Silva, Marcio Ajudarte Lopes and Marina Barbosa Azevedo, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Aug 13, 2008; with alterations on Oct 09, 2014.

Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Coordenadora
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.



Sistema Institucional de Bolsas
de Iniciação Científica da UNICAMP
Parecer sobre Relatório Final de Atividades
Quota 01 de agosto de 2013 a 31 de julho de 2014

Bolsista: MARINA BARBOSA AZEVEDO - **RA:** 119890

Orientador: ALAN ROGER DOS SANTOS SILVA - **Matrícula:** 299613

Título do Projeto:

Avaliação da presença de miofibroblastos no estroma de carcinomas espinocelulares orais de pacientes jovens.

Parecer do Assessor sobre o Relatório Final:

O relatório final apresentado não é ainda aquele com todos os resultados, pois a pesquisa ainda não foi finalizada devido à sua complexidade. Segundo o relatório, a aluna teve seu pedido de renovação de bolsa aprovado e deverá finalizar a pesquisa. O orientador se mostra satisfeito com o desempenho acadêmico da aluna.

Conclusão do Parecer do Assessor sobre o Relatório Final:

Aprovar (**SIM**)

Reformular (**NÃO**)