



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – DIAGNÓSTICO BUCAL

André Goulart Poletto

**Título:** Perfil imuno-histoquímico de fibroblastos orais associados ao câncer e às lesões reativas da mucosa

Florianópolis

2022

André Goulart Poletto

**Dissertação de Mestrado**

**Título:** Perfil imuno-histoquímico de fibroblastos orais associados ao câncer e às lesões reativas da mucosa

Dissertação submetida ao Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Diagnóstico Bucal

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Elena Riet Correa Rivero.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Poletto, André

Perfil imuno-histoquímico de fibroblastos orais  
associados ao câncer e às lesões reativas da mucosa / André  
Poletto ; orientador, Elena Riet Correa Rivero, 2022.  
48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Fibroblasto. 3. Imuno-histoquímica.  
4. Câncer de boca. 5. Hiperplasia fibrosa inflamatória. I.  
Riet Correa Rivero, Elena. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.  
III. Título.

André Goulart Poletto

**Título:** Perfil imuno-histoquímico de fibroblastos orais associados ao câncer e às lesões reativas da mucosa

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 12 de dezembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Elena Riet Correa Rivero, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Filipe Modolo Siqueira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Kamile Leonardi Dutra Horstmann, Dra.  
CEPON

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Diagnóstico Bucal.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Elena Riet Correa Rivero, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, minha mãe **Angela**, meu pai **Cesar** e meu irmão **Christiano**, por me incentivarem, apoiarem minhas escolhas e estarem sempre presentes em minha vida.

Às minhas avós, **Delícia** e **Norma** (*in memoriam*) por todo o amor compartilhado com suas famílias e por terem feito de tudo para que seus filhos e netos pudessem chegar mais longe.

À minha orientadora **Elena Riet Correa Rivero**, pela relação de parceria e confiança que tivemos nos últimos anos, desde meu primeiro trabalho acadêmico de iniciação científica até a conclusão deste trabalho, por toda a paciência, compreensão e leveza que demonstrou ao conduzir esta orientação, e principalmente pela amizade que construímos.

Ao professor **Filipe Modolo**, por ter sido tão presente na minha formação acadêmica, onde tivemos a oportunidade de trabalhar juntos em diversas atividades, agradeço por todos os ensinamentos e pelo exemplo de entusiasmo e comprometimento com a docência.

Às professoras **Kamile** e **Angélica** por aceitarem o convite para a banca examinadora deste trabalho.

Ao meu amigo **Bubacar Embaló**, pela amizade verdadeira e pela ajuda na realização das análises estatísticas, além de todo o incentivo e apoio para que eu concluísse essa etapa.

À **Andressa Paza**, por ter me ajudado muito durante a etapa laboratorial do trabalho, sempre com muita paciência e cuidado.

Aos amigos do PPGO, **Gabriel Hernandez**, **Gilberto**, **Julia Pedron**, **Elis** e **Rúbia**, com quem compartilhei muitos momentos nos últimos anos, obrigado por todo o apoio, pelas conversas de incentivo e pelos momentos de descontração.

À **Universidade Federal de Santa Catarina**, que foi minha segunda casa nos últimos quase dez anos, por todas as oportunidades e experiências que me proporcionou, as quais fizeram toda a diferença na minha formação como profissional e como ser humano.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia** e todos os seus **professores** que participaram da minha formação durante este curso.

Às agências de fomento **CAPES** e **CNPq** por todo o apoio à pesquisa brasileira.

E por fim, meus agradecimentos mais especiais, à minha companheira **Heloise**, por sempre me apoiar e estar comigo em mais uma etapa importante, e ao **nosso filho** que está à caminho e foi a melhor e mais revolucionária notícia que recebemos este ano, vocês me deram a força que faltava nessa reta final para a finalização deste trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** Os fibroblastos são células que desempenham diversas funções no organismo, dentre estas a principal é a produção de colágeno que faz com que essas células tenham um importante papel na cicatrização de feridas. Além disso eles também participam da patogênese de diversas lesões, como nas lesões reativas da mucosa e no processo de carcinogênese, quando passam a ser denominados de fibroblastos associados ao câncer. **Objetivo:** avaliar a expressão imuno-histoquímica de diversos marcadores associados a fibroblastos em lesões reativas da mucosa, lesões potencialmente malignas e carcinoma epidermóide de boca (CEB). **Metodologia:** A expressão imuno-histoquímica das proteínas,  $\alpha$ -SMA,  $\beta$ -Gal, Caveolina-1 (CAV-1), Osteopontina (OPN), Interleucina-6 (IL-6) e P16, foi avaliada nos fibroblastos justa epitelial de 28 casos de Hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), de 49 casos de displasia epitelial (DE), e no estroma de 40 casos de CEB. Os resultados foram expressos na quantidade de fibroblastos positivos por mm<sup>2</sup>, os testes de Kruskal-Wallis e o teste ANOVA foram aplicados para a comparação entre os grupos. Nos casos de DE, também foram aplicados os testes de T-Student ou de Mann-Whitney para comparação entre as DE baixo (DEAB) e alto (DEAR) risco para transformação maligna. **Resultados:** A expressão imuno-histoquímica de  $\alpha$ -SMA foi estatisticamente maior nos fibroblastos de CEB, quando comparado a HFI ( $p=0.002$ ) e DE ( $p=0.004$ ). A expressão de  $\beta$ -Gal foi maior em CEB e em DE quando comparados a HFI ( $p=0.017$  e  $p=0.022$  respectivamente). Também se observou diferença na expressão de CAV-1, a qual foi estatisticamente menor nos casos de CEB em relação a HFI ( $p=0.013$ ) e DE ( $p=0.00$ ); a expressão de IL-6 foi estatisticamente menor em CEB, quando comparado a HFI e DE ( $p=0.03$  e  $p=0.00$  respectivamente). Para os marcadores OPN e P16 não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos. Na comparação entre os graus de DE, houve diferença estatística apenas para IL-6 ( $p=0.044$ ), onde a expressão foi maior em DEBR do que DEAR. **Conclusões:** os fibroblastos associados ao câncer mostraram expressão para  $\alpha$ -SMA e  $\beta$ -Gal; uma redução da expressão de CAV-1 nos fibroblastos pode estar relacionada a progressão do câncer e a transformação maligna de lesões orais; a IL-6 tem uma participação importante nas lesões reativas da mucosa oral; OPN e P16 não podem ser considerados marcadores específicos para fibroblastos associados ao câncer ou para os que atuam nas lesões reativas da mucosa.

**Palavras-chave:** Fibroblastos, Carcinoma epidermóide, Displasias epiteliais, Imuno-histoquímica

## ABSTRACT

**Introduction:** Fibroblasts are cells that perform several functions in the body, among which the main one is the production of collagen, which makes these cells play an important role in wound healing. In addition, they also participate in the pathogenesis of various lesions, such as reactive mucosal lesions and in the carcinogenesis process, when they are called cancer-associated fibroblasts. **Purpose:** to evaluate the immunohistochemical expression of several markers associated with fibroblasts in reactive oral lesions, potentially malignant lesions and oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methodology:** The immunohistochemical expression of proteins,  $\alpha$ -SMA,  $\beta$ -Gal, Caveolin-1 (CAV-1), Osteopontin (OPN), Interleukin-6 (IL-6) and P16, was evaluated in juxtaepithelial fibroblasts from 28 cases of inflammatory fibrous hyperplasia (IFH), of 49 cases of epithelial dysplasia (ED), and in the stroma of 40 cases of OSCC. The results were expressed in the number of positive fibroblasts per mm<sup>2</sup>, the Kruskal-Wallis test and the ANOVA test were applied for comparison between groups. In cases of ED, the T-Student's or Mann-Whitney tests were also applied for comparison between low (LRED) and high (HRED) risk for malignant transformation. **Results:** The immunohistochemical expression of  $\alpha$ -SMA was statistically higher in OSCC fibroblasts when compared to IFH ( $p=0.002$ ) and DE ( $p=0.004$ ).  $\beta$ -Gal expression was higher in OSCC and DE when compared to IFH with ( $p=0.017$ ), and ( $p=0.022$ ) respectively. There was also a difference in the expression of CAV, which was statistically lower in cases of OSCC compared to IFH ( $p=0.013$ ) and ED ( $p=0.00$ ); IL-6 expression was statistically lower in OSCC when compared to IFH and DE ( $p=0.03$  and  $p=0.00$  respectively). For the OPN and P16 markers, there was no statistical difference between any of the groups. Comparing the degrees of ED, there was a statistical difference only for IL-6 ( $p=0.044$ ), where the expression was higher in LRED than HRED. **Conclusions:** cancer-associated fibroblasts showed expression for  $\alpha$ -SMA and  $\beta$ -Gal; a reduction in CAV-1 expression in fibroblasts may be related to cancer progression and malignant transformation of oral lesions; IL-6 plays an important role in reactive lesions of the oral mucosa; the OPN and P16 markers cannot be considered specific markers for cancer-associated fibroblasts or for those acting on reactive mucosal lesions.

**Palavras-chave:** Fibroblasts, Oral cancer, Epithelial dysplasia, Immunohistochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expressão dos marcadores $\alpha$ -SMA $\beta$ -gal e CAV-1 em fibroblastos na região justa-epitelial. ....	31
Figura 2 - Expressão dos marcadores IL-6, OPN e P16 em fibroblastos na região justa-epitelial. ....	32

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Boxplot: comparação entre grupos.....	33
Gráfico 2 – Boxplot: expressão de IL-6 em Displasias epiteliais de alto e baixo risco de malignização.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características principais dos anticorpos para as reações imuno-histoquímicas....	27
Tabela 2 - Características da amostra .....	29
Tabela 3 – Teste de correlação de Spearman .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Teste de análise de variância

$\alpha$ -SMA - Alfa actina de músculo liso (*Alfa smooth muscle actin*)

$\beta$ -GAL - Beta Galactosidase

C – Celsius

CAF – Fibroblasto associado ao câncer (*Cancer associated fibroblast*)

CAV-1 - Caveolina 1

CE – Carcinoma epidermóide

CEB – Carcinoma epidermóide de boca

DAB – Diaminobenzidina

DEAR – Displasia epitelial de alto risco para transformação maligna

DEBR – Displasia epitelial de baixo risco para transformação maligna

DP – Desvio padrão

CEPSH - Comitê de ética em pesquisa com seres humanos

H&E – Hematoxilina e eosina

HFI – Hiperplasia fibrosa inflamatória

IL-6 – Interleucina 6

IQR – Distância interquartil

OPN – Osteopontina

PBS – Tampão fosfato-salino (*Phosphate-buffered saline*)

TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformante beta (*Transforming growth factor beta*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

LPB – Laboratório de patologia bucal

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
1.1 FIBROBLASTOS.....	14
1.2 PARTICIPAÇÃO DOS FIBROBLASTOS NO REPARO TECIDUAL .....	15
1.3 FIBROBLASTO ASSOCIADO AO CÂNCER .....	16
1.4 ALFA-ACTINA DE MÚSCULO LISO.....	18
1.5 BETA-GALACTOSIDASE .....	19
1.6 CAVEOLINA-1.....	19
1.7 OSTEOPONTINA.....	20
1.8 INTERLEUCINA-6.....	21
1.9 P16.....	21
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO .....	25
4.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	25
4.3 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS .....	25
4.4 CLASSIFICAÇÃO DAS DISPLASIAS EPITELIAIS .....	25
4.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS .....	26
4.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	28
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E CLASSIFICAÇÃO DAS DISPLASIAS .....	29

5.2 DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DAS AMOSTRAS.....	30
5.3 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS .....	30
5.4 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENTRE OS GRUPOS .....	34
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 FIBROBLASTOS

Os fibroblastos estão entre as células mais abundantes no tecido conjuntivo, e são responsáveis pela produção e organização de diversas proteínas presentes na matriz extracelular<sup>1</sup>. Estas células são extremamente heterogêneas e dinâmicas<sup>2</sup>, podendo apresentar diferentes morfologias de acordo com o sítio anatômico, com a profundidade em que se encontram no tecido e com a condição do tecido onde estão inseridas<sup>3; 4</sup>, expressando diversas proteínas como metaloproteinases e interleucinas, e produzindo diferentes quantidades de fibras colágenas, principalmente dos tipos I e III<sup>5</sup>.

De forma geral, os fibroblastos podem ser encontrados em dois estados, quiescente ou ativado. São denominados fibroblastos quiescentes os que se encontram em condições homeostáticas, e que possuem um baixo metabolismo e uma baixa capacidade proliferativa. Quando há uma alteração no equilíbrio homeostático, essas células passam a apresentar uma maior capacidade proliferativa, assim com um metabolismo mais ativo, aumentando sua atividade secretora, sendo então denominados fibroblastos ativados, que atuam por exemplo no processo de reparo tecidual e no estroma de lesões malignas, influenciados pelas células tumorais<sup>6</sup>.

Os fibroblastos quiescentes, apesar do seu nome, têm um papel importante na manutenção da homeostasia, provendo suporte estrutural aos tecidos através da produção e constante remodelação da matriz extracelular, expressando diferentes proteínas específicas para cada órgão<sup>7</sup>. Os fibroblastos da mucosa bucal, por exemplo, são diferentes dos presentes na pele<sup>8</sup>, eles possuem uma capacidade proliferativa maior e sintetizam mais colágeno<sup>9</sup>.

Sabe-se que os fibroblastos orais tem uma origem embrionária diferente dos da pele, sendo “mais jovens”, tendo assim uma melhor capacidade no processo de cicatrização, podendo regenerar as feridas sem deixar cicatriz<sup>10</sup>. Os fibroblastos orais também apresentam características diferentes de acordo com sua localização<sup>11</sup>. Os fibroblastos do ligamento periodontal são responsáveis por produzir e manter as fibras que ligam o elemento dental ao osso alveolar, além de sua capacidade contrátil ter extrema importância durante os processos de erupção dentária e movimentos pós-eruptivos<sup>9</sup> enquanto os fibroblastos gengivais secretam colágeno e a matriz do tecido conjuntivo, mantendo a integridade dos tecidos e protegendo o

osso alveolar do meio oral, já os presentes na mucosa jugal são responsáveis pela adesão de queratinócitos, morfogênese das células epiteliais e pela organização da membrana basal<sup>11</sup>. Um estudo recente comparou fibroblastos da mucosa mastigatória proveniente do palato duro e da mucosa de revestimento proveniente da região anterior da mandíbula e mostrou que há uma diferença no fenótipo, nas taxas de proliferação e nos genes expressos entre os fibroblastos das duas regiões<sup>12</sup>.

## 1.2 PARTICIPAÇÃO DOS FIBROBLASTOS NO REPARO TECIDUAL

No processo de reparo tecidual, onde possuem um perfil secretório ativo<sup>13</sup>, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, estas células apresentam-se com um formato fusiforme ou estrelado e levam esse nome devido a sua semelhança com células do tecido muscular liso e tem como principal marcador imuno-histoquímico a proteína alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA – do inglês alfa smooth muscle actin)<sup>14</sup>. Neste processo, os primeiros fibroblastos surgem entre 24 e 48 horas após a injúria, após a fase inflamatória do processo<sup>15</sup>. Em um primeiro momento são responsáveis pela substituição da camada de fibrina por substâncias da matriz extracelular<sup>16</sup>, como colágeno I-IV, proteoglicanos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos e ácido hialurônico, substâncias essas que regulam a migração e atividade dos fibroblastos e também participam no processo de angiogênese e na formação de tecido de granulação<sup>17</sup>.

Além disso, diferentemente dos fibroblastos quiescentes, os miofibroblastos possuem uma capacidade contrátil, devido à presença de microfilamentos citoplasmáticos contráteis<sup>18</sup>. Essa característica possibilita uma melhor cicatrização, pois aproxima as margens da ferida proporcionando um melhor fechamento<sup>19</sup>. Por outro lado, o excesso de atividade miofibroblástica leva a formação de tecido cicatricial indesejável como fibroses cicatriciais e queloides, podendo acarretar em problemas estéticos e funcionais<sup>18</sup>.

O processo de cicatrização na mucosa oral é diferente do que acontece em pele, no meio oral a cicatrização é mais rápida e raramente ocorre a formação de fibrose cicatricial, o que de acordo com um estudo de Ozaki e colaboradores (2002) ocorre provavelmente pelo fato dos fibroblastos orais cessarem a proliferação celular mais rapidamente do que os fibroblastos da pele.<sup>20</sup>

Dentre as lesões reativas que ocorrem na cavidade oral, a mais comum é a hiperplasia fibrosa inflamatória, também chamada de fibroma de irritação. Histologicamente essa lesão é caracterizada por um epitélio pavimentoso estratificado hiperplásico e um tecido conjuntivo fibroso denso, onde ocorre uma superprodução de fibras colágenas pelos fibroblastos, influenciados por uma reação inflamatória decorrente de um trauma crônico, como próteses mal adaptadas ou a presença de placa bacteriana<sup>21</sup>. Diferente do que ocorre em lesões de caráter fibroso em pele, os fibroblastos de lesões fibrosas em mucosa oral como a hiperplasia fibrosa inflamatória, geralmente apresentam marcação fraca ou negativa para  $\alpha$ -SMA<sup>22; 23</sup>, sendo então necessário mais estudos para elucidar o papel dos fibroblastos e como ocorre a sua ativação nessas lesões<sup>23</sup>.

### 1.3 FIBROBLASTO ASSOCIADO AO CÂNCER E FIBROBLASTOS SENESCENTES

Durante o processo de transformação maligna, sabe-se que não apenas as células do parênquima neoplásico estão envolvidas. Estudos mostram que o estroma também tem participação no desenvolvimento do câncer, o denominado microambiente tumoral<sup>24</sup>. Nestas condições, os fibroblastos influenciados pelas células tumorais também possuem um perfil ativo, sendo denominados fibroblastos associados ao câncer (CAF – do inglês Cancer-associated fibroblasts). Além dos fibroblastos, outros componentes do estroma como células do sistema imunológico, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento presentes na matriz extracelular também participam deste processo<sup>7</sup>.

Inicialmente, os CAFs eram identificados apenas pela marcação positiva para  $\alpha$ -SMA, mas atualmente sabe-se que os CAFs  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> são apenas um subgrupo dentre os CAFs presentes no estroma de lesões de câncer, e diversos outros marcadores vêm sendo estudados neste contexto como a podoplanina, a vimentina, e a proteína ativadora de fibroblasto<sup>25; 26</sup>. Estudos indicam que os CAFs contribuem com o desenvolvimento do câncer, secretando fatores de crescimento como o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$  - do inglês transforming growth factor beta) e enzimas proteolíticas como as metaloproteínases que podem degradar a membrana basal facilitando a migração e invasão das células tumorais. Os CAFs também promovem a angiogênese, o que pode facilitar a progressão tumoral. Os fibroblastos ativados são também considerados possíveis responsáveis pela consistência fibrosa observada em diversos carcinomas, denominada reação desmoplásica<sup>5; 27</sup>. Uma revisão sistemática com meta-

análise publicada em 2020 constatou uma possível associação entre a alta densidade de CAFs e um aumento no risco de morte para os pacientes com lesões de carcinoma epidermóide (CE) de boca (CEB), podendo ser considerado como um possível fator prognóstico<sup>28</sup>.

Além da participação na progressão da doença, a presença dos CAFs também foi associada a uma maior resistência à radioterapia e quimioterapia. Estudos relatam que fibroblastos irradiados podem promover crescimento tumoral e invasão através de um aumento na expressão de TGF- $\beta$ , além de a radiação induzir o processo de senescência celular, que pode ser também um fator de promoção tumoral<sup>29</sup>. No que diz respeito à quimioterapia a presença de CAFs foi associada a uma maior resistência das células malignas ao tratamento com quimioterápicos<sup>29</sup>.

Por outro lado, alguns estudos apontam um possível papel supressor tumoral atribuído aos CAFs, atuando por exemplo na regulação do sistema imunológico<sup>7</sup>. Alguns estudos clínicos correlacionaram a expressão de colágeno tipo I e marcadores como  $\alpha$ -SMA e proteína ativadora de fibroblasto com o prognóstico em pacientes com carcinoma de mama e de pulmão e observaram que lesões com alto grau de desmoplasia podem ter um prognóstico mais favorável<sup>5</sup>. Entretanto, o possível mecanismo antitumoral dos CAFs ainda é pouco conhecido<sup>5</sup>.

Fibroblastos senescentes também têm sido associados ao mecanismo de carcinogênese. O processo de senescência celular consiste na parada do ciclo celular, onde a célula para de proliferar, porém ainda apresenta um metabolismo ativo. Existem diferentes mecanismos que induzem a senescência celular, que pode ocorrer em células normais e baseia-se no encurtamento dos telômeros quando a célula atinge seu limite de replicações, estando relacionado ao envelhecimento celular natural. Por outro lado, a senescência pode ocorrer prematuramente, induzida por algum mecanismo que cause danos ao DNA, como por exemplo a exposição à radiação ionizante<sup>30</sup>. Outro mecanismo importante de senescência celular está relacionado a carcinogênese, através da alteração de oncogenes, como os genes RAS, P16, P53<sup>30</sup>. Este mecanismo é considerado um importante supressor tumoral nas células tumorais de origem epitelial, por outro lado, nos fibroblastos do estroma, as células senescentes estão relacionadas a promoção tumoral, estimulando por exemplo os processos de proliferação, migração e invasão<sup>31</sup>.

Atualmente os principais biomarcadores que auxiliam na identificação de células senescentes são a enzima Beta-Galactosidase ( $\beta$ -GAL) e os genes P16 e P53, e acredita-se que os fibroblastos senescentes também expressam fatores que influenciam na proliferação das

células tumorais, como interleucinas, metaloproteinases, fatores de crescimento endotelial vascular, e osteopontina (OPN)<sup>31</sup>.

Tendo em vista a conhecida participação dos CAFs no desenvolvimento do câncer, alguns estudos tem o apontado como um possível alvo terapêutico, porém os tratamentos focados nos CAFs ainda não apresentaram sucesso, principalmente devido à heterogeneidade e a complexidade da atuação destas células durante o processo de carcinogênese, onde a tentativa de inativação ou destruição dos CAFs pode acabar favorecendo a progressão do tumor uma vez que eles também exercem um papel de supressão tumoral, principalmente no estágio inicial da doença<sup>29</sup>.

Um desafio no estudo dos fibroblastos se deve a sua heterogeneidade e dificuldade na caracterização imuno-histoquímica desta célula, apesar do marcador  $\alpha$ -SMA ser considerado o principal marcador para CAF até o presente momento, ele também está presente nos fibroblastos que atuam no reparo tecidual e em outras desordens fibrosas, portanto ainda não há um marcador que seja específico para CAF, sendo assim necessário a realização de novos estudos para identificação de fibroblastos ativados, associados ao câncer ou senescentes. Abaixo segue uma breve descrição de alguns desses marcadores, que serão avaliados nesse estudo:

#### 1.4 ALFA-ACTINA DE MÚSCULO LISO

O marcador  $\alpha$ -SMA, como já mencionado anteriormente, é a principal proteína que caracteriza a ativação de fibroblastos em miofibroblastos<sup>14</sup>, indicando atividade contrátil, principalmente no processo de cicatrização<sup>19</sup>.

Além da sua expressão no processo de cicatrização já citado anteriormente, o marcador  $\alpha$ -SMA é também um dos principais marcadores para CAF<sup>32</sup>. Alguns estudos indicam uma relação entre a quantidade de miofibroblastos presentes no estroma de lesões de CEB com processo de invasão tumoral e metástase em linfonodos, sugerindo que os miofibroblastos podem proporcionar um microambiente favorável para que ocorra a invasão tumoral<sup>32; 33</sup>. Uma revisão sistemática e meta-análise, publicada em 2017 por Dourado *et al.* relata que a presença elevada de CAFs, indicados pelo marcador  $\alpha$ -SMA, influenciam em um pior prognóstico aos pacientes com CEB<sup>34</sup>.

No entanto, expressão de  $\alpha$ -SMA em lesões potencialmente malignas é controversa na literatura, os estudos de Smitha *et al.*<sup>32</sup> e de-Assis *et al.*<sup>35</sup> não detectaram a presença de miofibroblastos em lesões leucoplásicas, independente do grau de displasia, enquanto os estudos de Chaudhary *et al.*<sup>36</sup> e Joshi *et al.*<sup>37</sup> detectaram a expressão de  $\alpha$ -SMA em lesões de alto risco para transformação maligna. Por fim uma revisão sistemática publicada em 2018 sugere que a presença de miofibroblastos nestas lesões não pode ser considerada como um fator de risco para transformação maligna, com exceção de lesões de fibrose submucosa oral, onde essa relação parece existir<sup>38</sup>.

### 1.5 BETA-GALACTOSIDASE

A alta expressão da enzima  $\beta$ -GAL está associada ao processo de senescência celular<sup>39</sup>, sendo este processo também associado a carcinogênese<sup>31</sup>. Kanaji *et al.* observaram fibroblastos do pulmão com diferentes perfis após exposição a fumaça de cigarro, um fenótipo senescente foi encontrado, apresentando alta expressão de  $\beta$ -GAL e baixo índice de proliferação celular, e outro fenótipo semelhante a fibroblastos de tecidos fibróticos, sem marcação para  $\beta$ -GAL e altos índices de migração e proliferação celular e apresentando resistência ao processo de senescência celular. Estas células apresentavam também elevada expressão de TGF- $\beta$ <sup>40</sup>.

### 1.6 CAVEOLINA-1

*Caveolae* são invaginações na membrana plasmática que participam de diversos processos fisiológicos celulares<sup>41</sup> e a caveolina-1 (CAV-1) é a principal proteína estrutural presente nos *caveolae*, que estão presentes principalmente em células acometidas por stress mecânico, como fibroblastos, células endoteliais e musculares. Este marcador está envolvido ocasionalmente no mecanismo de autofagia celular<sup>42</sup> e na produção de colágeno, onde estudos mostram que uma baixa expressão de CAV-1 está relacionado a um aumento na produção de colágeno<sup>43</sup>.

Nos miofibroblastos, que apresentam uma significativa expressão de  $\alpha$ -SMA, geralmente apresentam uma baixa marcação para CAV-1, o que indica uma possível relação negativa entre CAV-1 e o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ )<sup>44</sup>. Os fibroblastos em condições normais, em comparação aos miofibroblastos de lesões fibrosas em pacientes

com escleroderma apresentaram uma diferente interação entre CAV-1 e  $\alpha$ -SMA, a redução de CAV-1 aumentou os níveis de  $\alpha$ -SMA apenas nos fibroblastos normais e não nos miofibroblastos, enquanto o aumento da CAV-1 reduziu a expressão de  $\alpha$ -SMA em miofibroblastos, mas não nos fibroblastos normais<sup>43</sup>.

Uma revisão publicada por Gvaramia *et al.* em 2013 relata que uma redução de CAV-1 foi observada em diversas condições de fibrose tecidual, como fibrose pulmonar idiopática, fibrose cardíaca, quelóide e esclerose sistêmica<sup>45</sup>. Assim como a reintrodução de CAV-1 reduziu as alterações fibróticas, comprovando sua atividade anti-fibrótica<sup>45</sup>.

No que diz respeito aos tecidos orais, a presença de CAV-1 foi observada em osteoblastos, cementoblastos, células do ligamento periodontal<sup>46</sup>, e em células epiteliais, endoteliais e fibroblastos de tecido gengival, onde foi também observado uma intensificação da sua expressão relacionada a inflamação periodontal crônica<sup>47</sup>. A expressão de CAV-1 também ocorre em lesões potencialmente malignas e malignas<sup>48</sup>, entretanto, seu papel no microambiente tumoral é bastante controverso na literatura, alguns estudos relatam que a sua expressão está relacionada com a promoção e a progressão do carcinoma<sup>49</sup>, com um pior prognóstico e com a presença de linfonodos metastáticos<sup>48</sup>, por outro lado, alguns estudos sugerem que a CAV-1 pode ter um papel inibitório no desenvolvimento do câncer<sup>50</sup>.

## 1.7 OSTEOPONTINA

A OPN é uma glicoproteína que foi inicialmente detectada em tecido ósseo por Fránzen *et al.*<sup>51</sup>, onde é expressa por osteoblastos e osteoclastos, inibindo a produção de hidroxiapatita e participando no processo de remodelação óssea<sup>52</sup>. Posteriormente foi encontrada em outros tecidos, como em alguns tipos específicos de epitélio de revestimento, principalmente nos rins<sup>53</sup>.

Estudos apontam um aumento da expressão de OPN em processos inflamatórios, promovendo a migração, adesão e ativação dos macrófagos e células T e mediando a expressão de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento<sup>54</sup>, tendo também uma participação importante em doenças de origem autoimune, como lúpus<sup>55</sup>, artrite reumatoide<sup>56</sup> e esclerose múltipla<sup>57</sup>.

Um estudo em animais realizado por Mori e colaboradores mostrou que ao inibir a expressão de OPN em fibroblastos durante o processo de cicatrização, resultou em um menor

tempo de reparo e redução na formação de tecido de granulação e fibrose cicatricial<sup>58</sup>. Lenga *et al.* demonstraram a participação da OPN na diferenciação de miofibroblastos, influenciando na expressão de  $\alpha$ -SMA<sup>59</sup>. Estudos também apontam que a OPN pode ter um papel de proteção celular, atuando como um gene supressor da apoptose<sup>60</sup>.

Em tumores malignos, a OPN também é indicada como um possível marcador, participando nos mecanismos de promoção tumoral<sup>61</sup> podendo estar relacionado a transformação de lesões potencialmente malignas em malignas<sup>62</sup> e a um pior prognóstico para o paciente<sup>63</sup>. A expressão pode ser observada tanto nas células epiteliais neoplásicas<sup>62</sup> quanto nos fibroblastos do estroma tumoral<sup>64</sup>.

## 1.8 INTERLEUCINA-6

A interleucina-6 (IL-6), da família das citocinas, tem um papel importante em respostas a traumas ou infecções, ativando uma resposta do sistema imunológico<sup>65</sup>, sua expressão já foi observada em diferentes tipos celulares, como macrófagos, linfócitos T, células endoteliais e fibroblastos<sup>66</sup>. Em lesões orais, a expressão de IL-6 ocorre principalmente em lesões inflamatórias, imunomediadas e malignas<sup>67</sup>. Em lesões de CE na região de cabeça e pescoço, a expressão de IL-6 por CAFs no microambiente tumoral induz a expressão de OPN, indicando que pode ter um papel no mecanismo de crescimento e de metástase tumoral<sup>68</sup>.

Estudos que avaliaram a expressão de IL-6 em fibroblastos de tecido gengival de pacientes com fibromatose gengival causada pelo uso de medicamentos, observaram um aumento significativo em sua expressão em relação ao grupo controle<sup>69; 70</sup> onde ocorre também uma maior produção de fibras colágenas<sup>71</sup> indicando que a IL-6 pode ter uma função importante no mecanismo molecular da hiperplasia gengival causada por este medicamento. Uma maior expressão de IL-6 também foi observada em fibroblastos associados a formação de quelóide<sup>72</sup>.

## 1.9 P16

O gene P16 está associado ao processo de supressão tumoral, onde atuam no ciclo celular<sup>73; 74</sup>. A mutação destes genes está frequentemente relacionada ao desenvolvimento de lesões malignas<sup>75; 76</sup>. Um aumento da expressão de P16 foi observado em lesões de CEB e

lesões potencialmente malignas orais em comparação a amostras de tecido normal de mucosa oral, aumentando gradativamente de acordo com o grau de displasia observado nas lesões<sup>77</sup>.

Em estudos com amostras de mucosa oral saudável, os fibroblastos apresentaram marcação positiva para P16<sup>78</sup>. Estudos relacionando estes marcadores ao processo de cicatrização constataram uma maior expressão de P16 pelos fibroblastos associados a formação de cicatrizes hipertróficas e quelóides em comparação aos fibroblastos de tecido normal<sup>79; 80</sup>. Em relação aos CAFs, a ativação do gene P16 está relacionada ao processo de senescência celular, onde os fibroblastos senescentes apresentam um aumento na expressão desses marcadores, associados a interrupção do ciclo celular<sup>81</sup>.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista a heterogeneidade observada na função dos fibroblastos em diferentes condições e a diversidade de imunomarcadores existentes, uma análise qualitativa e quantitativa do perfil imuno-histoquímico destas células em diferentes condições no meio oral pode auxiliar na compreensão do papel dos fibroblastos na patogênese das lesões orais potencialmente malignas, CEB e lesões inflamatórias reativas da mucosa oral, assim como identificar possíveis alvos terapêuticos, incentivar e embasar futuros estudos sobre o tema.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a expressão imuno-histoquímica de marcadores associados a fibroblastos em lesões reativas da mucosa (hiperplasia fibrosa inflamatória), lesões potencialmente malignas (displasias epiteliais de alto e baixo risco de transformação maligna) e CEB.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de fibroblastos ativados, por meio do marcador  $\alpha$ -SMA, nos diferentes grupos.
- Investigar a presença de fibroblastos senescentes, por meio dos marcadores p16 e SA- $\beta$ -GAL nos diferentes grupos.
- Investigar se a expressão de CAV-1, IL-6 e OPN nos fibroblastos pode estar relacionada a progressão do câncer e a transformação maligna de lesões orais.
- Investigar se a expressão de CAV-1, IL-6 e OPN pode ser utilizada para a diferenciação de fibroblastos associados ao câncer e de fibroblastos associados a processos reativos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo tem caráter observacional descritivo e retrospectivo.

### 4.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

As amostras foram selecionadas do arquivo do Laboratório de patologia bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A seleção foi realizada de acordo com o diagnóstico histopatológico e a análise das lâminas coradas em Hematoxilina & Eosina (H&E). Foram selecionados do arquivo: 40 casos para o grupo carcinoma epidermóide de boca; 49 casos de lesões com diagnóstico clínico de leucoplasia, eritroplasia ou leucoeritroplasia que tivessem diagnóstico histológico de displasia epitelial (DE); e 28 casos para o grupo das hiperplasias fibrosas inflamatórias (HFI) representando as lesões inflamatórias reativas. Os casos de displasia epitelial ainda foram classificados em dois subgrupos: de alto ou baixo risco para malignização, de acordo com a metodologia proposta por Kujan *et al.*<sup>82</sup>. Além disso, informações a respeito dos dados clínicos dos pacientes como sexo, idade, etilismo, tabagismo e localização das lesões foram coletados das fichas de biópsia quando disponíveis.

### 4.3 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Esse estudo faz parte do macroprojeto “O papel do estroma no desenvolvimento e progressão do câncer de boca”, já aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPSH) da UFSC (Plataforma Brasil – CAAE: 42976715.3.0000.0121; Parecer: 1.005.587 – 30/03/2015).

### 4.4 CLASSIFICAÇÃO DAS DISPLASIAS EPITELIAIS

Os casos de displasias epiteliais foram avaliados inicialmente em coloração H&E, e classificados de acordo com o sistema binário proposto por Kujan *et al.*<sup>82</sup> em 2006, o qual classifica as displasias em “alto risco” (DEAR) e “baixo risco” (DEBR) de transformação

maligna. Optou-se pelo sistema de classificação binário por ser um sistema menos subjetivo e que apresenta boas correlações com fatores prognósticos<sup>83</sup>. São consideradas displasias de “alto risco” quando presentes no mínimo quatro critérios arquiteturais e cinco critérios citológicos, e de “baixo risco” quando presentes menos de quatro critérios arquiteturais e cinco critérios citológicos. Sendo considerados critérios arquiteturais: (1) Projeções em forma de gota; (2) Alteração da polaridade das células basais; (3) Estratificação epitelial irregular; (4) Número aumentado de figuras mitóticas; (5) Mitoses superficiais anormais; (6) Disceratose; (7) Pérola de ceratina. E critérios citológicos: (1) Aumento do tamanho dos núcleos; (2) Pleomorfismo celular; (3) Pleomorfismo nuclear; (4) Aumento do tamanho das células; (5) Alteração da proporção núcleo/citoplasma; (6) Aumento do número e tamanho dos nucléolos; (7) Hiperchromatismo nuclear. Os campos escolhidos para classificação foram os campos que apresentaram maior grau de displasia nas lâminas selecionadas.

#### 4.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Os blocos de parafina dos casos selecionados foram seccionados no micrótomo em cortes com espessura de 3µm, para cada caso foram feitos cortes histológicos seriados os quais foram submetidos a coloração de H&E e para utilização nas reações imuno-histoquímicas.

Para a coloração de H&E os cortes foram distendidos em lâminas de vidro limpas e os mesmos seguiram o seguinte protocolo:

- Desparafinização com Xilol I e Xilol II;
- Reidratação em cadeia decrescente de álcool etílico;
- Lavagem em água destilada;
- Imersão em hematoxilina e lavagem em água corrente;
- Imersão em eosina e lavagem em água corrente;
- Desidratação em cadeia crescente de álcool etílico;
- Fixação em xilol I e II
- Montagem das lâminas, fixando as lamínulas com auxílio de Entellan® (Merck S/A, São Paulo, Brasil);
- Secagem final na estufa por no mínimo 60 minutos.

Para a técnica imuno-histoquímica, os cortes foram distendidos em lâminas de vidro previamente silanizadas e submetidas a técnica imuno-histoquímica para os anticorpos conforme tabela 1.

Tabela 1 – Características principais dos anticorpos para as reações imuno-histoquímicas

<b>Anticorpo</b>	<b>Clonalidade</b>	<b>Fonte</b>	<b>Expressão</b>	<b>Controle positivo</b>
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Policlonal	Sigma*	Citoplasmática	Vasos sanguíneos
<b><math>\beta</math>-Gal</b>	Policlonal	SC**	Citoplasmática	Condiloma acuminado
<b>CAV-1</b>	Policlonal	SC**	Citoplasmática	Pulmão
<b>IL-6</b>	Policlonal	SC**	Citoplasmática	Granuloma periapical
<b>OPN</b>	Monoclonal	SC**	Citoplasmática	Pele
<b>P16</b>	Monoclonal	Abcam***	Citoplasmática	Condiloma acuminado

\*Sigma, St. Louis, MO \*\*Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA. \*\*\*Abcam, Cambridge, Reino Unido.

$\alpha$ -SMA, anticorpo anti- $\alpha$ -SMA;  $\beta$ -Gal, anticorpo anti- $\beta$ -Gal; CAV-1, anticorpo anti-CAV-1; IL-6, anticorpo anti-IL-6; OPN, anticorpo anti-OPN a; p16, anticorpo anti-p16.

Fonte: elaborada pelos autores.

O processamento dos anticorpos anti-SMA, anti-Gal, anti-CAV-1, anti-OPN e anti-P16 foi realizado em dois dias de reação, no primeiro dia ocorreram os seguintes procedimentos:

- Bloqueio da peroxidase endógena: dois banhos de 20 minutos em peróxido de hidrogênio 6%;
- Recuperação antigênica: banho de 40 minutos em tampão citrato 0,01M pré-aquecido em banho maria;
- Bloqueio das ligações inespecíficas: banho em leite desnatado 5% por 40 minutos;
- Incubação do anticorpo primário: anticorpo primário diluído e incubado sob os cortes em câmara úmida resfriada (4 a 8°C), overnight.

No segundo dia as seguintes etapas foram realizadas:

- Incubação do anticorpo secundário (EnVison antibody complex, Dako do Brasil Ltda, São Paulo, Brazil) em câmara úmida por 30 minutos.

- Aplicação do cromógeno (DAB, Dako do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) em câmara úmida por 2 minutos.

Para a reação imuno-histoquímica da proteína IL-6, algumas alterações foram necessárias no segundo dia da reação:

Aplicação de 50µl de *chicken anti-goat biotin conjugate antibody* (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, EUA) na concentração de 1:500, como anticorpo secundário, incubado por 90 minutos. Foi realizado banho com PBS e em seguida a incubação com anticorpo terciário Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) incubado por 60 minutos, seguido pela aplicação do cromógeno (DAB, Dako do Brasil Ltda, São Paulo, Brazil).

#### 4.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise das amostras foi feita a partir de imagens capturadas com uma câmera digital (Canon A620, Beijing, China) acoplada ao microscópio óptico (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), em aumento de 400x. Foram fotografados 5 campos consecutivos em região justa-epitelial para cada caso e para cada marcador. A quantificação da expressão das proteínas foi feita com auxílio do software ImageJ 1.45q (National Institutes of Health, Maryland, EUA). Para cada campo fotografado foi calculado um valor de área de tecido conjuntivo com auxílio da ferramenta “Measure” do ImageJ previamente calibrada com uma régua microscópica, além da área calculada, foram contados os fibroblastos positivos para cada marcador e posteriormente relacionado o número de fibroblastos positivos por área, obtendo um valor de células positivas por milímetro quadrado em cada caso.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em um primeiro momento foi realizado um teste de normalidade para avaliar distribuição dos dados, o teste de Shapiro-Wilke, onde nos casos em que a distribuição dos dados foi normal, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) ou teste T entre os grupos e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP), e em caso de distribuição anormal, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney e os resultados expressos em mediana e as distâncias interquartil (IQR). Diferenças com o nível de significância  $p \leq 0.05$

foram consideradas estatisticamente significantes. Os testes foram aplicados para comparar a média e células por milímetro quadrado entre os três grupos de amostras: CEB; DE e HFI, e ainda entre os grupos DEAR e DEBR.

Além dos testes de comparação também foi aplicado o teste de correlação de Spearman para avaliar possíveis correlações entre a expressão dos marcadores nos grupos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E CLASSIFICAÇÃO DAS DISPLASIAS

Os dados clínicos referentes a amostra avaliada no estudo estão presentes na Tabela 2. Após a avaliação das DE, 30 foram classificadas como baixo risco e 19 como alto risco de malignização.

Tabela 2 - Características da amostra

VARIÁVEIS		HFI	DE	CEB
Sexo	<i>Masculino</i>	14 (56%)	23 (49%)	28(82%)
	<i>Feminino</i>	11 (44%)	24(51%)	6(18%)
Idade (média±DP)		51 (±15)	57 (±14)	56 (±9)
Tabaco	<i>Não</i>	5 (42%)	6 (14%)	2 (8%)
	<i>Sim</i>	7 (58%)	36 (86%)	24 (92%)
Etilismo	<i>Não</i>	5 (55%)	12 (40%)	1 (5%)
	<i>Sim</i>	4 (45%)	18 (60%)	18 (95%)
Localização	<i>Língua</i>	5 (20%)	14 (30%)	7 (21%)
	<i>Assoalho</i>	0 (0,0%)	7 (15%)	7 (21%)
	<i>Gengiva</i>	2 (8%)	10 (21%)	7 (21%)
	<i>Mucosa jugal</i>	15 (60%)	11 (23%)	8 (24,5%)
	<i>Palato</i>	3 (12%)	5 (11%)	4 (12,5%)

Legenda: CEB=Carcinoma epidermóide bucal; DE=Displasias epiteliais; DP=Desvio Padrão; HFI=Hiperplasia fibrosa inflamatória.

Fonte: elaborada pelos autores.

## 5.2 DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DAS AMOSTRAS

Para o marcador  $\beta$ -Gal, após a realização do teste Shapiro-Wilke a distribuição dos dados foi normal ( $p>0.05$ ), e para os marcadores  $\alpha$ -SMA, CAV-1, IL-6, OPN e P16, constatou-se uma distribuição anormal dos dados ( $p\leq 0.05$ ). Para os grupos de DEBR e DEAR, os marcadores  $\beta$ -Gal, IL-6 e OPN apresentaram distribuição normal ( $p>0.05$ ) e os marcadores  $\alpha$ -SMA, CAV-1 e P16 apresentaram distribuição anormal ( $p\leq 0.05$ ).

## 5.3 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS

Na comparação entre a expressão de  $\alpha$ -SMA nos grupos houve uma diferença estatisticamente significativa entre HFI (Mediana=128; IQR=532) e CEB (Mediana=546,5; IQR = 277),  $p=0.002$  e entre DE (Mediana = 243; IQR = 277) e CEB,  $p=0.004$ . Não houve diferença estatística entre HFI e DE,  $p=1.00$ .

Na avaliação do marcador  $\beta$ -Gal houve diferença estatística entre os grupos HFI (Média=855,78 $\pm$ 367,28) e CEB (Média=1194,59 $\pm$ 611,87),  $p=0.017$ , e entre os grupos HFI e DE (Média=1172,26 $\pm$ 415,58),  $p=0.022$ . Não houve diferença estatística entre DE e CEB,  $p=0.976$ .

Para CAV-1, houve diferença estatística entre HFI (Mediana=717; IQR=512) e CEB (Mediana=445; IQR=448),  $p=0.013$ , e entre DE (Mediana=748; IQR=420) e CEB,  $p=0.00$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre HFI e DE,  $p=1.00$ .

Na avaliação da expressão de IL-6, houve diferença entre HFI (Mediana=451; IQR=659) e CEB (Mediana=138; IQR=365),  $p=0.03$ , e entre DE (Mediana=657; IQR=560) e CEB,  $p=0.00$ . Não houve diferença estatística entre os grupos HFI e DE,  $p=0.19$ .

Para o marcador OPN não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos: HFI (Mediana=181, IQR=542), DE (Mediana=417; IQR=406), CEB (Mediana=201.5; IQR=500),  $p>0.05$ .

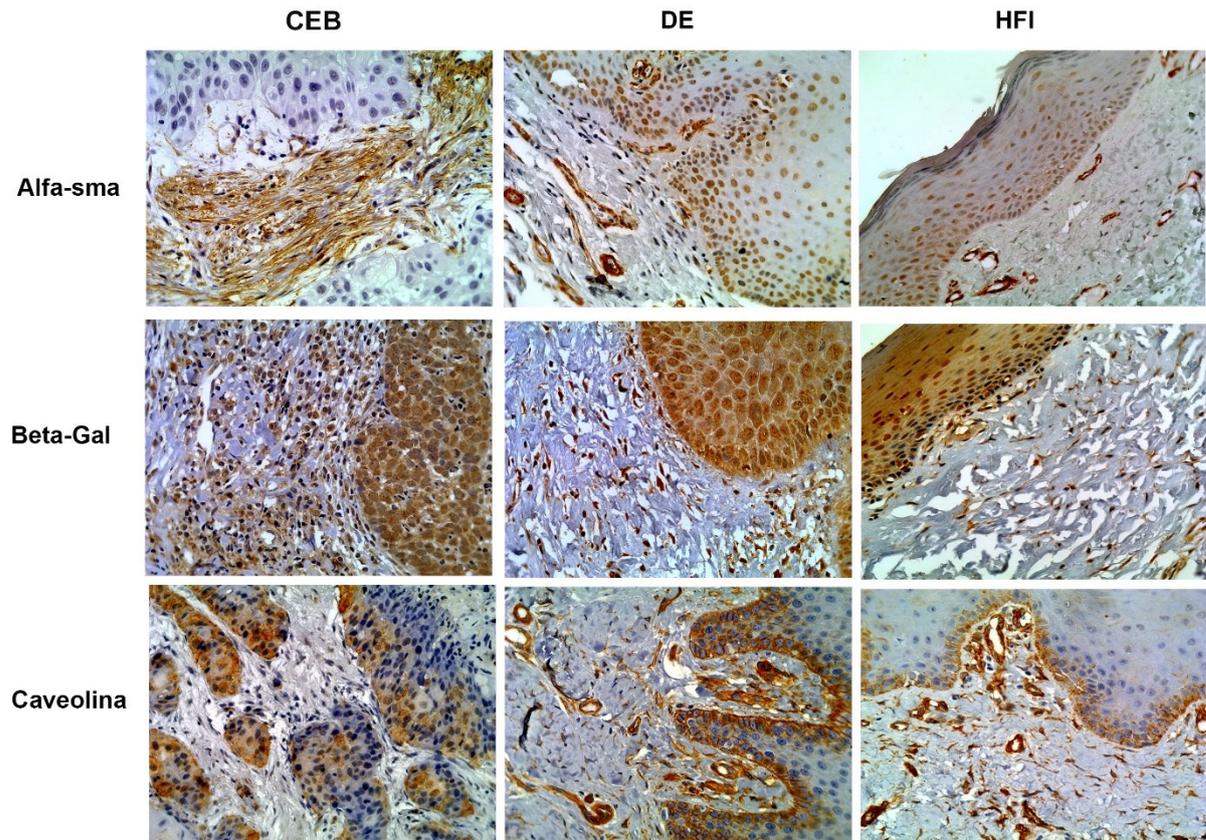
Também não houve diferença estatística entre os grupos para o marcador P16: HFI (Mediana=356; IQR=567), DE (Mediana=300; IQR=422) e CEB (Mediana=297.5; IQR=514),  $p>0.05$ . Uma síntese dos resultados pode ser observada no gráfico 1.

Para os testes de comparação entre os grupos de DEAR e DEBR, houve significância estatística apenas para IL-6 ( $p=0.044$ ), onde valor da média de expressão para o grupo DEBR

foi  $817,75 \pm 95,47$  e para o grupo DEAR foi  $538,94 \pm 77,59$  (gráfico 2). Para os demais marcadores, as diferenças não foram estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ).

A expressão dos marcadores nos diferentes grupos está representada nas figuras 1 e 2.

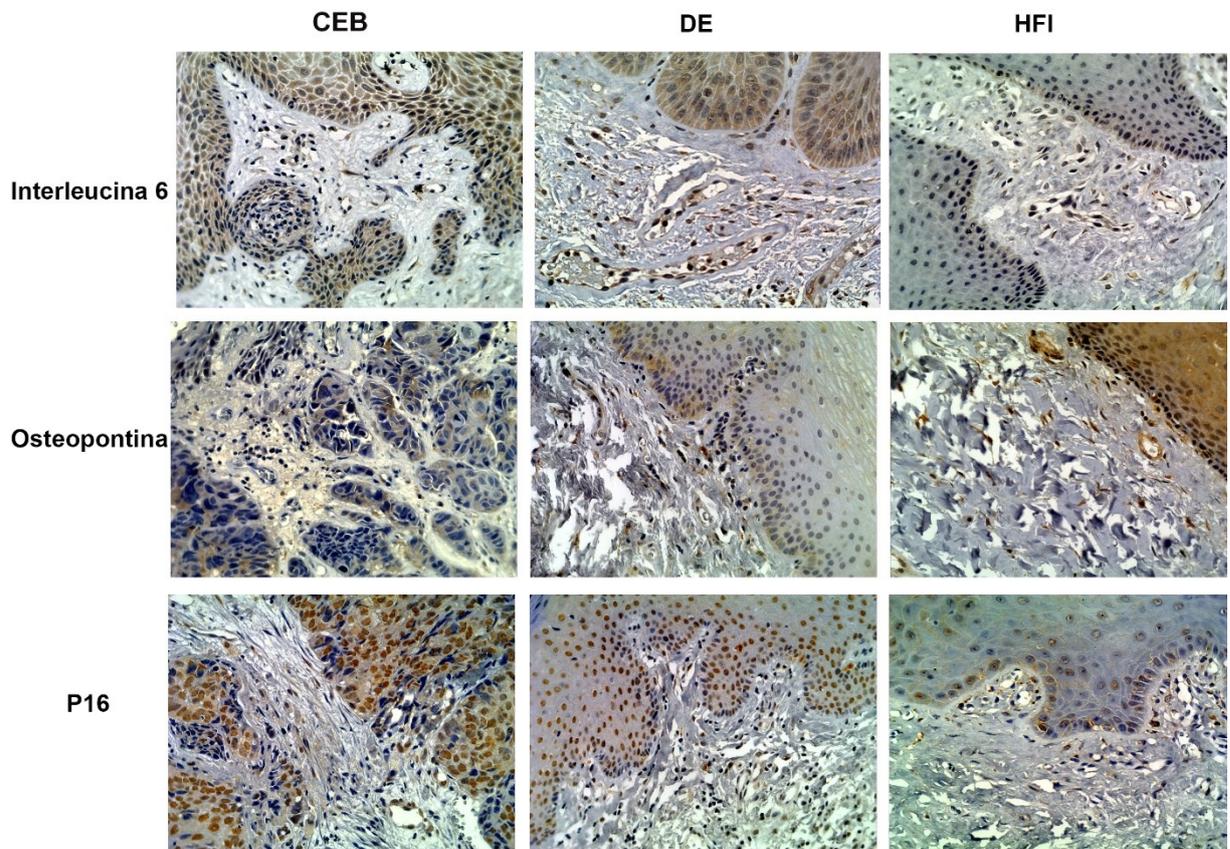
Figura 1 - Expressão dos marcadores  $\alpha$ -SMA  $\beta$ -gal e CAV-1 em fibroblastos na região justa-epitelial.



Legenda: CEB=Carcinoma epidermóide bucal; DE=Displasia epitelial; HFI=Hiperplasia fibrosa inflamatória.

Fonte: elaborado pelos autores.

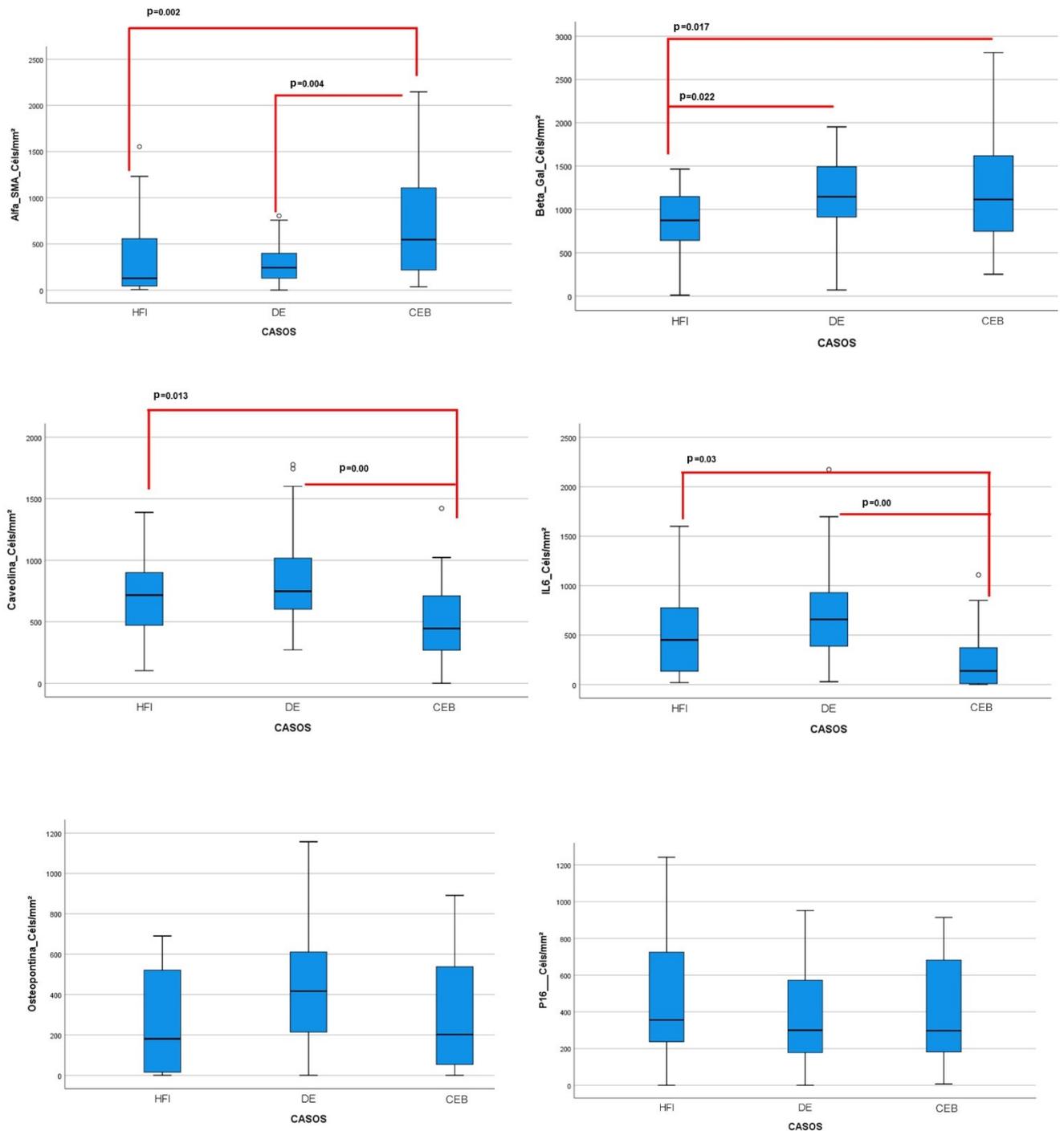
Figura 2 - Expressão dos marcadores IL-6, OPN e P16 em fibroblastos na região justa-epitelial.



Legenda: CEB=Carcinoma epidermóide bucal; DE=Displasia epitelial; HFI=Hiperplasia fibrosa inflamatória

Fonte: elaborado pelos autores.

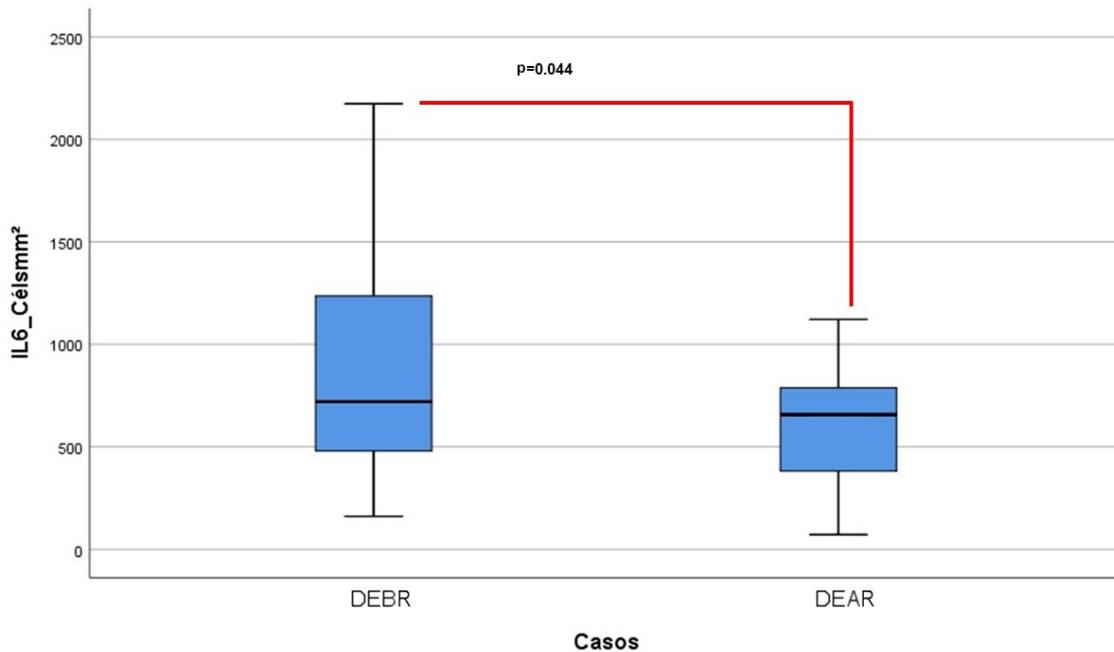
Gráfico 1 - Boxplot: comparação entre grupos



Legenda: HFI=Hiperplasia Fibrosa Inflamatória; DE=Displasias epiteliais; CEB=Carcinoma epidermóide bucal IL6=Interleucina-6; p=Nível de significância estatística.

Fonte: elaborado pelos autores.

Gráfico 2 – Boxplot: expressão de IL-6 em Displasias epiteliais de alto e baixo risco de malignização.



Legenda: DEAR=Displasia epitelial de alto risco de malignização; DEBR=Displasia epitelial de baixo risco de malignização; IL6=Interleucina-6; p=Nível de significância estatística.  
Fonte: elaborado pelos autores.

#### 5.4 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENTRE OS GRUPOS

O teste de correlação de Spearman mostrou uma correlação positiva fraca entre a expressão de CAV-1 e  $\beta$ -Gal em amostras de HFI ( $r=0.394$ ;  $p=0.042$ ), DE ( $r=0.393$ ;  $p=0.008$ ) e CEB ( $r=0.413$ ;  $p=0.010$ ). Para IL-6, observou-se uma correlação positiva moderada com a expressão de CAV-1 em amostras de HFI ( $r=0.600$ ;  $p=0.004$ ). Houve também correlação positiva moderada entre a expressão de OPN e  $\alpha$ -SMA em HFI ( $r=0.533$ ;  $p=0.005$ ) e fraca entre OPN e  $\beta$ -Gal ( $r=0.437$ ;  $p=0.026$ ). Uma correlação positiva e moderada foi observada entre a expressão de CAV-1 e P16 em amostras de DE ( $r=0.578$ ;  $p=0.000$ ). As demais análises a respeito da correlação não apresentaram significância estatística ( $p>0.05$ ). Os valores de coeficiente de correlação e significância estatística estão disponíveis da Tabela 3.

Tabela 3 – Teste de correlação de Spearman

		$\alpha$ -SMA			$\beta$ -Gal			CAV-1			IL-6			OPN			P16		
		HFI	DE	CEB	HFI	DE	CEB	HFI	DE	CEB	HFI	DE	CEB	HFI	DE	CEB	HFI	DE	CEB
$\alpha$ -SMA	HFI	----			r=0,324 p=0,099			r=-0,030 p=0,881			r=0,34 p=0,884			<b>r=0,533</b> <b>p=0,005</b>			r=-0,115 p=0,636		
	DE		----			r=0,06 p=0,821			r=0,064 p=0,683			r=0,122 p=0,443			r=0,079 p=0,612			r=-0,016 p=0,921	
	CEB			----			r=0,301 p=0,066			r=-0,10 p=0,954			r=0,208 p=0,319			r=0,186 p=0,631			r=0,069 p=0,703
$\beta$ -Gal	HFI				----			<b>r=0,394</b> <b>p=0,042</b>			r=0,379 p=0,090			<b>r=0,437</b> <b>r=0,026</b>			r=0,248 p=0,213		
	DE					-----			<b>r=0,393</b> <b>p=0,008</b>			r=-0,096 p=0,541			r=-0,056 p=0,710			r=0,383 p=0,11	
	CEB						----			<b>r=0,413</b> <b>p=0,010</b>			r=0,208 p=0,319			r=-0,119 p=0,761			r=0,257 p=0,623
CAV-1	HFI							-----			<b>r=0,600</b> <b>p=0,004</b>			r=0,124 p=0,547			r=0,327 p=0,096		
	DE											r=-0,212 p=0,163			r=0,047 p=0,749			<b>r=0,578</b> <b>p=0,000</b>	
	CEB									----			r=0,258 p=0,161			r=-,644 p=0,061			r=-0,42 p=0,907
IL-6	HFI										-----			r=0,213 p=0,354			r=0,310 p=0,171		
	DE											----			r=-0,81 p=0,591			r=-0,155 p=0,323	
	CEB												----			r=-0,516 p=0,373			r=0,54 p=0,777
OPN	HFI													-----			r=0,199 p=0,330		
	DE														-----			r=0,173 p=0,251	
	CEB															-----			r=0,107 p=0,819

Legenda: r = coeficiente de correlação; p = nível de significância estatística; CEB = Carcinoma Epidermoide; HFI = Hiperplasia fibrosa inflamatória; DE = Displasia epitelial.

Fonte: elaborada pelos autores.

## 6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos muitos estudos tem avaliado a relação entre as células do estroma e o desenvolvimento de tumores malignos de origem epitelial, uma vez que modificações no perfil secretor e no metabolismo destas células influenciam e participam nos processos de crescimento e invasão tumoral<sup>9; 24; 29</sup>. Portanto, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de marcadores específicos nos fibroblastos da região justa-epitelial associados em lesões reativas da mucosa, lesões orais potencialmente malignas e CEB, buscando compreender melhor o perfil secretor destas células em lesões reativas da mucosa e na progressão do CEB.

No presente estudo, a expressão de  $\alpha$ -SMA nos fibroblastos foi estatisticamente maior em CEB do que em DE e HFI, além de não haver diferença estatística entre os grupos de DE alto e baixo risco, este resultado vai de acordo com a revisão sistemática publicada por Coletta e Salo em 2018<sup>38</sup>, que reuniu os estudos que avaliaram a presença de miofibroblastos em lesões cancerizáveis e CEB, neste estudo a maior parte das amostras de DE apresentaram baixa expressão de  $\alpha$ -SMA, além de não haver diferença estatística entre o grupo DE e amostras de mucosa oral normal. Esses resultados sugerem que os miofibroblastos identificados através marcador  $\alpha$ -SMA são pouco frequentes em estágios mais iniciais das lesões sugerindo que é necessário a interação das células tumorais com os fibroblastos para a ativação em miofibroblastos<sup>38; 84</sup>. A baixa expressão de  $\alpha$ -SMA em HFI também vai de acordo com outros estudos que relataram uma expressão baixa ou negativa de  $\alpha$ -SMA em lesões de hiperplasia fibrosa inflamatória da mucosa oral<sup>22; 23</sup>.

Na avaliação do marcador  $\beta$ -Gal, os resultados mostram que pode haver uma indução da senescência durante a progressão tumoral, uma vez que houve uma maior marcação de  $\beta$ -Gal em CEB e em DE do que em HFI, esse resultado vai de acordo com outros resultados encontrados na literatura, que detectaram maior expressão de  $\beta$ -Gal em amostras de fibrose submucosa oral, uma lesão oral potencialmente maligna em comparação a fibroblastos de amostras de mucosa oral normal<sup>85</sup>, sugerindo que os fibroblastos senescentes tem participação no processo de transformação maligna da fibrose submucosa oral<sup>86</sup>. Assim como os miofibroblastos, os fibroblastos senescentes também possuem um perfil secretor ativo, atuando na secreção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, contribuindo na progressão e invasão tumoral<sup>31</sup>.

Quanto ao marcador CAV-1, que apresentou uma expressão maior em HFI e DE do que em CEB, este resultado corrobora com algumas teorias a respeito do metabolismo do câncer propostas na literatura<sup>87</sup>, baseados no efeito Warburg reverso onde as células neoplásicas estimulam a produção de metabólitos como o lactato e o piruvato pelos fibroblastos, essas alterações no metabolismo celular induzem estresse oxidativo que levam a uma degradação autofágica de CAV-1<sup>88</sup>, sendo assim, os CAFs podem agir como provedores de nutrientes para as células tumorais, contribuindo para o crescimento do tumor, nesse sentido estudos também apontam que a redução de CAV-1 nas lesões malignas pode estar relacionada com recidiva, linfonodos metastáticos e um pior prognóstico<sup>89</sup>. Por outro lado, nosso estudo revelou uma correlação positiva fraca entre a expressão de  $\beta$ -Gal e CAV-1 em todos os grupos, este resultado vai de acordo com alguns estudos na literatura que relatam a participação da CAV-1 no processo de senescência celular por diversos mecanismos<sup>90</sup>.

A avaliação imuno-histoquímica da IL-6 revelou uma menor expressão nas amostras de CEB do que em DE e HFI. A baixa expressão em CEB contraria os relatos encontrados na literatura, que mostram um aumento de IL-6 nos CAFs estimulado pelas células epiteliais malignas<sup>91</sup>, no caso de lesões de carcinoma de intestino, a IL-6 é responsável pela ativação do fator de crescimento STAT3 que está associado a proliferação celular. Em estudos que avaliaram a expressão de IL-6 por CAFs em lesões malignas da região de cabeça e pescoço, a IL-6 foi relacionada com o aumento da expressão de OPN pelas células tumorais, a presença de OPN está relacionada com o crescimento tumoral e metástase<sup>68</sup>, além de estar ligado também a um aumento na expressão do fator de crescimento vascular VEGF que também está relacionado ao crescimento tumoral<sup>92</sup>.

A expressão de IL-6 nos casos de DE ainda é pouco relatado na literatura, Babiuch e colaboradores avaliaram a expressão de IL-6 no estroma de lesões orais potencialmente malignas, porém não diferenciaram a expressão entre fibroblastos e outras células inflamatórias presentes no estroma<sup>93</sup>. O presente estudo mostrou uma maior expressão de IL-6 em DEBR do que em DEAR e uma menor expressão em CEB, sugerindo que há uma redução de IL-6 na progressão do CEB, porém estes resultados devem ser interpretados com cautela devido ao tamanho reduzido da amostra do grupo DEAR e também a dificuldade da avaliação do marcador IL-6 em casos onde há a presença de muitas células inflamatórias positivas para este marcador que podem dificultar a identificação dos fibroblastos.

Por outro lado, estudos mostram alta expressão de IL-6 no tecido conjuntivo em lesões de hiperplasia gengival em casos de fibromatose gengival medicamentosa<sup>70</sup>, apesar de os casos de hiperplasia avaliados no nosso estudo serem de origem traumática e não terem relação com o uso de medicamentos, a alta expressão encontrada nas amostras de HFI vai de acordo com a literatura, a IL-6 atua também em lesões de caráter fibroso em pele como na formação de fibrose cicatricial e queloides, onde a IL-6 aumenta a produção de fatores de crescimento, colágeno tipo I e fibronectina, além promover a ativação dos fibroblastos caracterizada pela expressão de  $\alpha$ -SMA<sup>94</sup>, é interessante ressaltar que as lesões de HFI do presente estudo e também de outros trabalhos apresentaram baixa expressão de  $\alpha$ -SMA, o que sugere que a influência da IL-6 no caráter fibroso desta lesão não está relacionada exclusivamente à ativação dos miofibroblastos.

Há muitos relatos na literatura da expressão e função da OPN em células epiteliais de CE e DE, estando possivelmente relacionada a transformação maligna, e progressão da doença além de prognósticos desfavoráveis<sup>62; 95; 96</sup>, entretanto a sua expressão nas células do estroma dessas lesões tem sido pouco explorada. A baixa expressão de OPN no grupo das HFI no presente estudo vai de acordo com estudos que avaliaram este marcador em lesões reativas da mucosa<sup>97; 98</sup>. Entretanto, chama a atenção a alta expressão de OPN no grupo das DE, apesar de não haver diferença estatística em relação aos outros grupos, a OPN atua no processo de ativação de fibroblastos em miofibroblastos<sup>59</sup>, sugerindo que pode ter uma participação no processo de transformação maligna das displasias epiteliais.

O marcador P16 é um gene supressor tumoral que atua na regulação do ciclo celular, que tem como principal função inibir a proliferação celular<sup>99</sup>, a participação do P16 nas lesões malignas ainda é controverso na literatura e sua presença em lesões de CE em orofaringe está ligada principalmente à carcinomas relacionados a infecção pelo vírus HPV, por outro lado infecção pelo vírus apresenta uma baixa relação com os casos de CEB<sup>100</sup>, além disso estudos também apontam que sua expressão pelas células epiteliais malignas não tem relação com fatores prognósticos<sup>101; 102</sup>. Já a expressão de P16 nos fibroblastos e no microambiente tumoral está associada ao processo de senescência celular<sup>103</sup>. Jovanovic e colaboradores (2021) detectaram a expressão de P16 nos CAFs em carcinoma de mama, sugerindo que os fibroblastos positivos para P16 tem uma participação no desenvolvimento tumoral<sup>104</sup>. No presente estudo não houve diferença estatística na expressão de P16 entre os três grupos avaliados, este resultado sugere que P16 não pode ser considerado um marcador específico para CAF na amostra estudada.

O presente estudo apresenta limitações que devem ser levadas em consideração ao interpretar os resultados, as avaliações imuno-histoquímicas devem ser interpretadas com cautela, uma vez que as lâminas histológicas representam um único momento do processo de desenvolvimento das lesões, podendo haver diferença na expressão dos marcadores nos diferentes estágios da carcinogênese, além de que em alguns casos os fibroblastos podem se assemelhar a outras células presentes no estroma, como macrófagos ou outras células do infiltrado inflamatório, o que pode dificultar a identificação dos mesmos nas lâminas histológicas. Por outro lado, nosso estudo traz uma ampla análise do papel dos fibroblastos a partir de diferentes marcadores imuno-histoquímicos, comparando a atividade dos fibroblastos no desenvolvimento das lesões malignas e lesões reativas da mucosa, os resultados deste trabalho podem servir como norteador para estudos futuros.

## 7. CONCLUSÕES

O marcador  $\alpha$ -SMA é importante na identificação de fibroblastos ativados em lesões de CEB, porém parece não ter envolvimento nos mecanismos de ativação dos fibroblastos em lesões reativas da mucosa.

A  $\beta$ -Gal pode ser considerada um importante marcador na identificação de células senescentes que tem um papel no desenvolvimento e progressão do CEB.

A redução da expressão de CAV-1 pode estar relacionada a progressão do câncer e a transformação maligna de lesões orais.

A IL-6 tem uma participação importante nas lesões reativas da mucosa oral, provavelmente estimulando a produção de fatores de crescimento, colágeno tipo I e fibronectina. Além disso, houve uma maior expressão de IL-6 no grupo das DEBR do que em DEAR, sugerindo que há uma redução de IL-6 na progressão do CEB.

Não houve diferença estatística na expressão dos marcadores OPN e P16 nos diferentes grupos, portanto não podem ser considerados marcadores específicos para CAFs ou para os fibroblastos que atuam nas lesões reativas da mucosa.

## REFERÊNCIAS

- 1 TRACY, L. E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E. J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 5, n. 3, p. 119-136, Mar 1 2016. ISSN 2162-1918
- 2 DRISKELL, R. R.; WATT, F. M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. **Trends Cell Biol**, v. 25, n. 2, p. 92-9, Feb 2015. ISSN 0962-8924.
- 3 CHANG, H. Y. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 20, p. 12877-82, Oct 1 2002. ISSN 0027-8424
- 4 RINN, J. L. et al. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. **PLoS Genet**, v. 2, n. 7, p. e119, Jul 2006. ISSN 1553-7390.
- 5 KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 9, p. 582-98, Aug 23 2016. ISSN 1474-175x.
- 6 BARRETT, R.; PURÉ, E. Cancer-associated fibroblasts: key determinants of tumor immunity and immunotherapy. **Curr Opin Immunol**, v. 64, p. 80-87, May 10 2020. ISSN 0952-7915.
- 7 KOLIARAKI, V. et al. The mesenchymal context in inflammation, immunity and cancer. **Nat Immunol**, v. 21, n. 9, p. 974-982, Sep 2020. ISSN 1529-2908.
- 8 LEE, H. G.; EUN, H. C. Differences between fibroblasts cultured from oral mucosa and normal skin: implication to wound healing. **J Dermatol Sci**, v. 21, n. 3, p. 176-82, Nov 1999. ISSN 0923-1811.
- 9 VIJAYASHREE, R. J.; SIVAPATHASUNDHARAM, B. The diverse role of oral fibroblasts in normal and disease. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 26, n. 1, p. 6-13, Jan-Mar 2022. ISSN 0973-029X
- 10 ENOCH, S. et al. Increased oral fibroblast lifespan is telomerase-independent. **J Dent Res**, v. 88, n. 10, p. 916-21, Oct 2009. ISSN 0022-0345.
- 11 MOHD NOR, N. H. et al. Identification and Characterization of Intraoral and Dermal Fibroblasts Revisited. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 12, n. 8, p. 675-681, 2017. ISSN 1574-888x.
- 12 KABAKOV, L. et al. Fibroblasts from the oral masticatory and lining mucosa have different gene expression profiles and proliferation rates. **J Clin Periodontol**, v. 48, n. 10, p. 1393-1401, Oct 2021. ISSN 0303-6979.

- 13 THULABANDU, V.; CHEN, D.; ATIT, R. P. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 7, n. 2, Mar 2018. ISSN 1759-7684.
- 14 DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab Invest**, v. 63, n. 1, p. 21-9, Jul 1990. ISSN 0023-6837.
- 15 FORREST, L. Current concepts in soft connective tissue wound healing. **Br J Surg**, v. 70, n. 3, p. 133-40, Mar 1983. ISSN 0007-1323
- 16 TUAN, T. L. et al. In vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. **Exp Cell Res**, v. 223, n. 1, p. 127-34, Feb 25 1996. ISSN 0014-4827.
- 17 ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Dev Biol**, v. 341, n. 1, p. 126-40, May 1 2010. ISSN 0012-1606.
- 18 LI, B.; WANG, J. H. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. **J Tissue Viability**, v. 20, n. 4, p. 108-20, Nov 2011. ISSN 0965-206X.
- 19 TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 5, p. 349-63, May 2002. ISSN 1471-0072.
- 20 OKAZAKI, M. et al. Elevated expression of hepatocyte and keratinocyte growth factor in cultured buccal-mucosa-derived fibroblasts compared with normal-skin-derived fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 30, n. 2, p. 108-115, 2002/11/01/2002. ISSN 0923-1811.
- 21 HUNASGI, S. et al. Assessment of reactive gingival lesions of oral cavity: A histopathological study. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 21, n. 1, p. 180, Jan-Apr 2017. ISSN 0973-029X
- 22 DAMASCENO, L. S. et al. Stromal myofibroblasts in focal reactive overgrowths of the gingiva. **Braz Oral Res**, v. 26, n. 4, p. 373-7, Jul-Aug 2012. ISSN 1806-8324.
- 23 PASCU, E. I. et al. Heterogeneity of collagen secreting cells in gingival fibrosis--an immunohistochemical assessment and a review of the literature. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56, n. 1, p. 49-61, 2015. ISSN 1220-0522.
- 24 MUGHEES, M. et al. Mechanism of tumour microenvironment in the progression and development of oral cancer. **Mol Biol Rep**, v. 48, n. 2, p. 1773-1786, Feb 2021. ISSN 0301-4851.

- 25 NOMURA, S. A.-O. H. O. O. Identification, Friend or Foe: Vimentin and alpha-Smooth Muscle Actin in Cancer-Associated Fibroblasts. **Ann Surg Oncol.**, n. 1534-4681 (Electronic), 2019.
- 26 PULA, B. et al. Podoplanin expression by cancer-associated fibroblasts predicts poor outcome in invasive ductal breast carcinoma. **Histopathology**, v. 59, n. 6, p. 1249-60, Dec 2011. ISSN 0309-0167.
- 27 EYDEN, B. et al. The myofibroblast and its tumours. **J Clin Pathol**, v. 62, n. 3, p. 236-49, Mar 2009. ISSN 0021-9746.
- 28 GRAIZEL, D. et al. Oral cancer-associated fibroblasts predict poor survival: Systematic review and meta-analysis. n. 1601-0825 (Electronic), 2020.
- 29 BIENKOWSKA, K. J.; HANLEY, C. J.; THOMAS, G. J. Cancer-Associated Fibroblasts in Oral Cancer: A Current Perspective on Function and Potential for Therapeutic Targeting. **Front Oral Health**, v. 2, p. 686337, 2021. ISSN 2673-4842.
- 30 OU, H. L. et al. Cellular senescence in cancer: from mechanisms to detection. **Mol Oncol**, Sep 27 2020. ISSN 1574-7891.
- 31 PRIME, S. S. et al. Fibroblast activation and senescence in oral cancer. **J Oral Pathol Med**, v. 46, n. 2, p. 82-88, Feb 2017. ISSN 0904-2512.
- 32 SMITHA, A. et al. Immunohistochemical study of  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 23, n. 1, p. 59-64, Jan-Apr 2019. ISSN 0973-029X
- 33 LUKSIC, I. et al. Significance of myofibroblast appearance in squamous cell carcinoma of the oral cavity on the occurrence of occult regional metastases, distant metastases, and survival. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, n. 9, p. 1075-80, Sep 2015. ISSN 0901-5027.
- 34 DOURADO, M. R. et al. Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. **J Oral Pathol Med**, v. 47, n. 5, p. 443-453, May 2018. ISSN 0904-2512.
- 35 DE-ASSIS, E. M. et al. Stromal myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n. 5, p. e733-8, Sep 1 2012. ISSN 1698-4447
- 36 CHAUDHARY, M. et al. Comparison of myofibroblasts expression in oral squamous cell carcinoma, verrucous carcinoma, high risk epithelial dysplasia, low risk epithelial dysplasia and normal oral mucosa. **Head Neck Pathol**, v. 6, n. 3, p. 305-13, Sep 2012. ISSN 1936-055X
- 37 JOSHI, P. et al. Evaluation of stromal myofibroblasts in epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. **Clinical Cancer**

**Investigation Journal**, v. 5, n. 5, p. 441-446, September 1, 2016 2016. ISSN 2278-0513.

- 38 COLETTA, R. D.; SALO, T. Myofibroblasts in oral potentially malignant disorders: Is it related to malignant transformation? **Oral Dis**, v. 24, n. 1-2, p. 84-88, Mar 2018. ISSN 1354-523x.
- 39 MAIER, A. B.; WESTENDORP, R. G.; D, V. A. N. H. Beta-galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1100, p. 323-32, Apr 2007. ISSN 0077-8923.
- 40 KANAJI, N. et al. Fibroblasts that resist cigarette smoke-induced senescence acquire profibrotic phenotypes. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 307, n. 5, p. L364-73, Sep 1 2014. ISSN 1040-0605.
- 41 CHIDLOW, J. H., JR.; SESSA, W. C. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. **Cardiovasc Res**, v. 86, n. 2, p. 219-25, May 1 2010. ISSN 0008-6363.
- 42 KRUGLIKOV, I. L.; SCHERER, P. E. Caveolin-1 as a possible target in treatment for acne. **Exp Dermatol**, Nov 26 2019. ISSN 0906-6705.
- 43 TOURKINA, E. et al. Antifibrotic properties of caveolin-1 scaffolding domain in vitro and in vivo. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 294, n. 5, p. L843-61, May 2008. ISSN 1040-0605
- 44 SANDERS, Y. Y. et al. SMAD-independent down-regulation of caveolin-1 by TGF-beta: effects on proliferation and survival of myofibroblasts. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0116995, 2015. ISSN 1932-6203.
- 45 GVARAMIA, D. et al. Role of caveolin-1 in fibrotic diseases. **Matrix Biol**, v. 32, n. 6, p. 307-15, Aug 8 2013. ISSN 0945-053x.
- 46 LEE, S. Y. et al. Expression of Caveolin-1 in Periodontal Tissue and Its Role in Osteoblastic and Cementoblastic Differentiation In Vitro. **Calcif Tissue Int**, v. 98, n. 5, p. 497-510, May 2016. ISSN 0171-967x.
- 47 WANG, J. et al. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation and caveolin-1 in healthy and inflamed human gingiva. **J Periodontal Res**, v. 49, n. 2, p. 197-204, Apr 2014. ISSN 0022-3484.
- 48 JAAFARI-ASHKAVANDI, Z.; ASLANI, E. Caveolin-1 expression in oral lichen planus, dysplastic lesions and squamous cell carcinoma. **Pathol Res Pract**, v. 213, n. 7, p. 809-814, Jul 2017. ISSN 0344-0338.
- 49 XUE, J. et al. Expression of caveolin-1 in tongue squamous cell carcinoma by quantum dots. **Eur J Histochem**, v. 54, n. 2, p. e20, Apr 14 2010. ISSN 1121-760X

- 50 ZHANG, H. et al. Restoration of caveolin-1 expression suppresses growth and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 99, n. 10, p. 1684-94, Nov 18 2008. ISSN 0007-0920
- 51 FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochem J**, v. 232, n. 3, p. 715-24, Dec 15 1985. ISSN 0264-6021
- 52 HUNTER, G. K. et al. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. **Biochem J**, v. 317 ( Pt 1), p. 59-64, Jul 1 1996. ISSN 0264-6021.
- 53 BROWN, L. F. et al. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. **Mol Biol Cell**, v. 3, n. 10, p. 1169-80, Oct 1992. ISSN 1059-1524.
- 54 LUND, S. A.; GIACHELLI, C. M.; SCATENA, M. The role of osteopontin in inflammatory processes. **J Cell Commun Signal**, v. 3, n. 3-4, p. 311-22, Dec 2009. ISSN 1873-9601.
- 55 KARIUKI, S. N. et al. Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. **Genes Immun**, v. 10, n. 5, p. 487-94, Jul 2009. ISSN 1466-4879.
- 56 SENNELS, H. et al. Circulating levels of osteopontin, osteoprotegerin, total soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, and high-sensitivity C-reactive protein in patients with active rheumatoid arthritis randomized to etanercept alone or in combination with methotrexate. **Scand J Rheumatol**, v. 37, n. 4, p. 241-7, Jul-Aug 2008. ISSN 0300-9742
- 57 COMABELLA, M. et al. Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 158, n. 1-2, p. 231-9, Jan 2005. ISSN 0165-5728.
- 58 MORI, R.; SHAW, T. J.; MARTIN, P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. **J Exp Med**, v. 205, n. 1, p. 43-51, Jan 21 2008. ISSN 0022-1007.
- 59 LENGHA, Y. et al. Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. **Circ Res**, v. 102, n. 3, p. 319-27, Feb 15 2008. ISSN 0009-7330.
- 60 ICER, M. A.; GEZMEN-KARADAG, M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. **Clin Biochem**, v. 59, p. 17-24, Sep 2018. ISSN 0009-9120.
- 61 ZHAO, H. et al. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. **Cell Death Dis**, v. 9, n. 3, p. 356, Mar 2 2018.

- 62 ARAVIND, T. et al. Immunolocalization of osteopontin in dysplasias and squamous cell carcinomas arising from oral epithelium. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 21, n. 1, p. 18-23, Jan-Apr 2017. ISSN 0973-029X
- 63 LUO, S. D. et al. Osteopontin Involves Cisplatin Resistance and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 508587, 2015.
- 64 PAZOLLI, E. et al. Senescent stromal-derived osteopontin promotes preneoplastic cell growth. **Cancer Res**, v. 69, n. 3, p. 1230-9, Feb 1 2009. ISSN 0008-5472.
- 65 TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The biology and medical implications of interleukin-6. **Cancer Immunol Res**, v. 2, n. 4, p. 288-94, Apr 2014. ISSN 2326-6066.
- 66 MATSUKI, Y.; YAMAMOTO, T.; HARA, K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. **Immunology**, v. 76, n. 1, p. 42-7, May 1992. ISSN 0019-2805.
- 67 NIBALI, L. et al. Interleukin-6 in oral diseases: a review. **Oral Dis**, v. 18, n. 3, p. 236-43, Apr 2012. ISSN 1354-523x.
- 68 QIN, X. et al. Cancer-associated Fibroblast-derived IL-6 Promotes Head and Neck Cancer Progression via the Osteopontin-NF-kappa B Signaling Pathway. **Theranostics**, v. 8, n. 4, p. 921-940, 2018. ISSN 1838-7640.
- 69 WILLIAMSON, M. S. et al. Cyclosporine A upregulates interleukin-6 gene expression in human gingiva: possible mechanism for gingival overgrowth. **J Periodontol**, v. 65, n. 10, p. 895-903, Oct 1994. ISSN 0022-3492
- 70 GANESH, P. R. Immunoexpression of interleukin-6 in drug-induced gingival overgrowth patients. **Contemp Clin Dent**, v. 7, n. 2, p. 140-5, Apr-Jun 2016. ISSN 0976-237X
- 71 NAKAO, K.; YONEDA, K.; OSAKI, T. Enhanced cytokine production and collagen synthesis of gingival fibroblasts from patients with denture fibromatosis. **J Dent Res**, v. 74, n. 4, p. 1072-8, Apr 1995. ISSN 0022-0345.
- 72 XUE, H.; MCCAULEY, R. L.; ZHANG, W. Elevated interleukin-6 expression in keloid fibroblasts. **J Surg Res**, v. 89, n. 1, p. 74-7, Mar 2000. ISSN 0022-4804
- 73 LIGGETT, W. H., JR.; SIDRANSKY, D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 3, p. 1197-206, Mar 1998. ISSN 0732-183X
- 74 RIVLIN, N. et al. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. **Genes Cancer**, v. 2, n. 4, p. 466-74, Apr 2011. ISSN 1947-6019.

- 75 PETITJEAN, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum Mutat**, v. 28, n. 6, p. 622-9, Jun 2007. ISSN 1059-7794.
- 76 SERRA, S.; CHETTY, R. p16. **J Clin Pathol**, v. 71, n. 10, p. 853-858, Oct 2018. ISSN 0021-9746.
- 77 ANGIERO, F. et al. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. **Anticancer Res**, v. 28, n. 5a, p. 2535-9, Sep-Oct 2008. ISSN 0250-7005.
- 78 TARAKJI, B.; KUJAN, O.; NASSANI, M. Z. An immunohistochemical study of the distribution of p 16 protein in oral mucosa in smokers, non-smokers and in frictional keratosis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 5, p. e681-4, Sep 1 2010. ISSN 1698-4447.
- 79 TANAKA, A. et al. Expression of p53 family in scars. **J Dermatol Sci**, v. 34, n. 1, p. 17-24, Feb 2004. ISSN 0923-1811
- 80 LIU, J. F. et al. [The expression and interaction of cyclin D1 and p16 in fibroblasts of pathologic scars]. **Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi**, v. 20, n. 4, p. 265-7, Jul 2004. ISSN 1009-4598
- 81 JACOBS, J. J.; DE LANGE, T. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. **Curr Biol**, v. 14, n. 24, p. 2302-8, Dec 29 2004. ISSN 0960-9822.
- 82 KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, v. 42, n. 10, p. 987-93, Nov 2006. ISSN 1368-8375
- 83 EMBALÓ, B. et al. Evaluation of two classification systems for oral epithelial dysplasia. **Oral Dis**, v. 29, n. 1, p. 100-104, Jan 2023. ISSN 1354-523x.
- 84 KAWASHIRI, S. et al. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Head Neck**, v. 31, n. 10, p. 1346-53, Oct 2009. ISSN 1043-3074.
- 85 PITIYAGE, G. N. et al. Senescent mesenchymal cells accumulate in human fibrosis by a telomere-independent mechanism and ameliorate fibrosis through matrix metalloproteinases. **J Pathol**, v. 223, n. 5, p. 604-17, Apr 2011. ISSN 0022-3417.
- 86 BIJAI, L. K.; MUTHUKRISHNAN, A. Potential role of fibroblast senescence in malignant transformation of oral submucous fibrosis. **Oral Oncol**, v. 127, p. 105810, Apr 2022. ISSN 1368-8375.

- 87 PAVLIDES, S. et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. **Cell Cycle**, v. 8, n. 23, p. 3984-4001, Dec 2009. ISSN 1551-4005.
- 88 WILDE, L. et al. Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. **Semin Oncol**, v. 44, n. 3, p. 198-203, Jun 2017. ISSN 0093-7754.
- 89 WITKIEWICZ, A. K. et al. An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. **Am J Pathol**, v. 174, n. 6, p. 2023-34, Jun 2009. ISSN 0002-9440.
- 90 VOLONTE, D.; GALBIATI, F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. **Cancer Metastasis Rev**, v. 39, n. 2, p. 397-414, Jun 2020. ISSN 0167-7659
- 91 KINOSHITA, H. et al. Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60914, 2013. ISSN 1932-6203.
- 92 MIRKESHAVARZ, M. et al. Interleukin-6 secreted by oral cancer- associated fibroblast accelerated VEGF expression in tumor and stroma cells. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 63, n. 10, p. 131-136, Oct 31 2017. ISSN 0145-5680.
- 93 BABIUCH, K. et al. Evaluation of Proinflammatory, NF-kappaB Dependent Cytokines: IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  in Tissue Specimens and Saliva of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders. **J Clin Med**, v. 9, n. 3, Mar 21 2020. ISSN 2077-0383
- 94 LI, Y. et al. The Role of IL-6 in Fibrotic Diseases: Molecular and Cellular Mechanisms. **Int J Biol Sci**, v. 18, n. 14, p. 5405-5414, 2022. ISSN 1449-2288.
- 95 AVIROVIĆ, M. et al. Osteopontin expression is an independent factor for poor survival in oral squamous cell carcinoma: a computer-assisted analysis on TMA sections. **J Oral Pathol Med**, v. 42, n. 8, p. 620-6, Sep 2013. ISSN 0904-2512.
- 96 DOS SANTOS, E. S. et al. The role of osteopontin in oral cancer: A brief review with emphasis on clinical applications. **Oral Dis**, v. 28, n. 2, p. 326-335, Mar 2022. ISSN 1354-523x.
- 97 NARWAL, A.; BALA, S. Osteopontin expression and clinicopathologic correlation of oral hyperplastic reactive lesions: An institutional 6-year retrospective study. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 21, n. 3, p. 382-386, Sep-Dec 2017. ISSN 0973-029X
- 98 ELANAGAI, R.; VEERAVARMAL, V.; NIRMAL, R. M. Osteopontin expression in reactive lesions of gingiva. **J Appl Oral Sci**, v. 23, n. 1, p. 26-32, Jan-Feb 2015. ISSN 1678-7757

- <sup>99</sup> WITKIEWICZ, A. K. et al. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. **Cell Cycle**, v. 10, n. 15, p. 2497-503, Aug 1 2011. ISSN 1538-4101
- <sup>100</sup> LINGEN, M. W. et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, v. 49, n. 1, p. 1-8, Jan 2013. ISSN 1368-8375.
- <sup>101</sup> NI, Y. et al. Relationship between p16 expression and prognosis in different anatomic subsites of OSCC. **Cancer Biomark**, v. 26, n. 3, p. 375-383, 2019. ISSN 1574-0153.
- <sup>102</sup> SCHNEIDER, K. et al. Impact of p16-overexpression on overall and progression-free survival outcomes in oral cavity squamous cell carcinomas: A semi-national, population-based study. **Oral Oncol**, v. 111, p. 105031, Dec 2020. ISSN 1368-8375.
- <sup>103</sup> TAKASUGI, M.; YOSHIDA, Y.; OHTANI, N. Cellular senescence and the tumour microenvironment. **Mol Oncol**, v. 16, n. 18, p. 3333-3351, Sep 2022. ISSN 1574-7891.
- <sup>104</sup> JOVANOVIC, D. V. et al. Breast Cancer and p16: Role in Proliferation, Malignant Transformation and Progression. **Healthcare (Basel)**, v. 9, n. 9, Sep 21 2021. ISSN 2227-9032.