

Bianca Carla Bianco

**AValiação da Expressão das Metaloproteínas  
de Matriz -1, -2 e -9, Presença de Miofibroblastos e  
Índice de Proliferação Celular em Queilite  
Actínica e Carcinoma Epidermóide de Lábio**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia - Área de concentração em Diagnóstico Bucal.  
Orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelle Tillmann Biz

Florianópolis  
2015

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

Bianco, Bianca Carla

Avaliação da expressão das metaloproteinases de matriz - 1, -2 e -9, presença de miofibroblastos e índice de proliferação celular em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio / Bianca Carla Bianco ; orientador, Filipe Modolo Siqueira ; coorientadora, Michelle Tillmann Biz. - Florianópolis, SC, 2015.

92 p.

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

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Queilite actínica. 3. Carcinoma epidermóide de lábio. 4. Imuno-histoquímica. I. Siqueira, Filipe Modolo. II. Biz, Michelle Tillmann. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Bianca Carla Bianco

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES  
DE MATRIZ -1, -2 E -9, PRESENÇA DE MIOFIBROBLASTOS E  
ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM QUEILITE  
ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2014.

---

Prof.<sup>a</sup> Izabel Cristina Santos Almeida, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Carolina Amália Barcellos Silva, Dr.<sup>a</sup>  
Membro  
Universidade do Planalto Catarinense

---

Prof.<sup>a</sup> Elena Riet Correa Rivero, Dr.<sup>a</sup>  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, Dr.<sup>a</sup>  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha amada avó **Maria**, meu espelho de garra e coragem, como forma de agradecimento.



## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela companhia constante e por iluminar meus pensamentos durante esta caminhada.

Aos meus **avós**, em especial à minha avó **Maria**, pelo exemplo de vida. Por trás de cada história contada, uma aula de sabedoria. Sua simplicidade me encanta.

À minha mãe **Dalva**, primeira orientadora da minha vida, pelo zelo e firmeza em saber me conduzir, além do exemplo de caráter e coragem. Obrigada, mais uma vez, por abrir mão dos seus sonhos para eu poder realizar os meus.

Ao meu pai **Altair** por despertar minha curiosidade para a odontologia e pelos diversos ensinamentos durante a vida.

Aos meus irmãos e anjos da guarda, **Rodrigo e Fernando e Ana Julia**, e às minhas cunhadas **Caroline e Liliani**, por compreenderem e apoiarem minhas escolhas. Sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao meu namorado **Cassiano**, por toda paciência e compreensão, além das palavras de encorajamento nos momentos difíceis.

Aos meus **familiares** por todo carinho e parcela na minha criação e, em especial, aos meus **primos** por toda oração e torcida.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. **Filipe Modolo Siqueira** pela dedicação e compreensão incomparáveis, pela paciência e confiança em mim depositadas, por todos os ensinamentos importantes na orientação deste trabalho, na minha formação humana e profissional. Obrigada pelos sábios conselhos, por sempre me acalmar e enfrentar comigo cada dificuldade.

À Prof<sup>a</sup> **Michelle Tillmann Biz** pela co-orientação.

À Prof<sup>a</sup> **Elena Riet Correa Rivero** por toda atenção oferecida nos ensinamentos teórico-práticos de laboratório desde a graduação, pela agradável participação constante na minha rotina da pós-graduação e na execução deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> **Liliane Janete Grando** por ser uma das minhas inspirações na carreira acadêmica, por todas as conversas descontraídas e lições durante a minha caminhada.

Às professoras **Maria Inês Meurer, Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro** e aos professores **Rogério Gondak, Marcio Corrêa e Felipe Perozzo Daltoé e Filipe Ivan Daniel** por compartilharem comigo, de maneira tão generosa, seus conhecimentos científicos.

Às minhas futuras colegas de profissão e amigas **Soraia e Fernanda**, por participarem da elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado: **Karin, Kamile, Caroline, Mariana M., Débora, Letícia, Diogo, Mariana F., Emanuely, Abraão, Guilherme, Jussara e Adelino**, pela companhia e troca de conhecimentos. Com certeza foi mais agradável e proveitosa esta batalha ao lado de vocês.

À minha amiga **Sarah** que despertou meu interesse pela pós-graduação e, em especial, pela área de concentração em Diagnóstico bucal.

Aos meus **amigos** que, sempre que possível, me acompanharam nos momentos desta etapa, por compreenderem minha ausência e confiarem na minha amizade.

Aos **funcionários** da Universidade Federal de Santa Catarina pela ajuda sempre que necessitei.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Pessoal, pela concessão da bolsa de estudos.

À **Universidade Federal de Santa Catarina**, que pela segunda vez me recebeu, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos através do Programa de Pós-graduação em Odontologia.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Quem deseja aspirar o perfume das rosas deve  
aprender a lidar com os espinhos.  
Quem quer trilhar por estradas limpas tem que  
retirar as pedras do caminho.  
Nenhum obstáculo deve impedir sua marcha para  
conquista de dias melhores.  
Desistir, jamais!  
(Autor desconhecido)



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão das metaloproteinases de matriz (MMP) -1, -2 e -9, a presença de miofibroblastos (MF) e o índice de proliferação celular em queilite actínica (QA), carcinoma epidermóide de lábio (CEL) e mucocele (MUC). Trinta casos de QA, trinta de CEL e 20 de MUC foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para avaliação da expressão das proteínas MMP-1, MMP-2, MMP-9,  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e Ki-67. A imunomarcação de MMP-1 em tecido epitelial foi maior em QA quando comparado às outras lesões. No tecido conjuntivo observou-se maior expressão em CEL. A MMP-2 apresentou imunomarcação epitelial e estromal menor em CEL quando comparada às outras lesões. A marcação epitelial para MMP-9 foi maior em QA quando relacionada ao CEL. Já em tecido conjuntivo sua expressão foi menor em QA em comparação com as outras lesões. O índice de proliferação celular foi crescente de acordo com o aumento da severidade da displasia nas QA, enquanto para CEL foi maior nos casos bem diferenciados em relação aos moderadamente diferenciados. Não houve diferença na presença de MFs entre as lesões estudadas. Os resultados sugerem que as MMPs -1, -2 e -9 possam influenciar no comportamento biológico de QA e CEL participando do desenvolvimento e progressão da lesão pré-maligna em maligna.

**Palavras-chave:** Imuno-histoquímica. Metaloproteinase 1 da matriz. Metaloproteinase 2 da matriz. Metaloproteinase 9 da matriz. Miofibroblastos. Proliferação de células. Queilite. Carcinoma de células escamosas. Lábio.



## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the immunoexpression of matrix metalloproteinases (MMP) -1, -2 and -9, the presence of myofibroblasts (MF) and epithelial proliferation index in actinic cheilitis (AC) and lip squamous cell carcinoma (LSCC) and mucocele (MUC). Thirty cases of AC, thirty cases of LSCC and twenty cases of MUC were selected for immunohistochemical investigation of the proteins MMP-1, MMP-2, MMP-9,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and Ki-67. The MMP-1 expression in the epithelial component was higher in AC than MUC and CEL. In the connective tissue, the expression was higher in LSCC. MMP-2 showed lower epithelial and stromal immunostaining in LSCC when compared to AC and MUC. The epithelial staining for MMP-9 was higher in AC when compared to LSCC. However in connective tissue the expression was lower in AC compared to other lesions. The cell proliferation rate was increased according to the severity of dysplasia in AC, while in LSCC was higher in well differentiated lesions compared to moderate differentiated. There was no statistical significance of MFs in the studied lesions. The results suggest that MMPs could affect the biological behavior of AC and LSCC inasmuch as they participate of developing and progression from pre-malignant lesion to malignant lesion.

**Keywords:** Immunohistochemistry. Metalloproteinase 1 of the matrix. Metalloproteinase 2 of the matrix. Metalloproteinase 9 of the matrix. Myofibroblasts. Cell proliferation. Cheilitis. Squamous cell carcinoma. Lip.



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-9, Ki-67 e  $\alpha$ -SMA em queilite actínica, carcinoma epidermóide de lábio e mucocele (400X)..61

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Anticorpos utilizados.....	72
---------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Média e desvio-padrão para todos os anticorpos nas lesões estudadas em tecido epitelial e conjuntivo.....	55
Tabela 2 – Média e desvio-padrão de acordo com o grau de displasia epitelial em QA.....	57
Tabela 3 – Média e desvio-padrão de acordo com o grau de diferenciação histopatológica em CEL.....	59



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QA – Queilite actínica  
UV – Ultravioleta  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
DEL – Displasia epitelial leve  
DEM – Displasia epitelial moderada  
DEI – Displasia epitelial intensa  
CEL – Carcinoma epidermóide de lábio  
BD – Bem diferenciado  
PD – Pouco diferenciado  
MD – Moderadamente diferenciado  
MEC – Matriz extracelular  
MB – Membrana basal  
MMP – Metaloproteinase de matriz  
MF – Miofibroblastos  
 $\alpha$ -SMA – Alfa-actina de musculo liso  
TGF- $\beta$ 1 – Fator de crescimento transformador beta-1  
Ki-67 – Proteína não-histona de proliferação celular  
LPB – Laboratório de Patologia Bucal  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
SAP – Serviço de Anatomia Patológica  
HU – Hospital Universitário  
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
MUC - Mucocele  
HE – Hematoxilina e Eosina  
 $\mu$ m – Micrometro  
PBS – Tampão Fosfato Salina  
LSAB – Kit com anticorpo secundário e complexo estreptavidina-biotina  
DAB – Diaminobenzidina  
M – Molar  
TA – Temperatura ambiente  
pH – Potencial hidrogênico  
DPM – Desvio-padrão da média  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa  
IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 beta



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  – Beta

$\mu$  – Micro

% – Porcento

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius

$\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de hidrogênio



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
1.1	QUEILITE ACTÍNICA.....	25
1.2	CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO.....	26
1.3	MUCOCELE.....	27
1.4	METALOPROTEINASES DE MATRIZ.....	27
1.5	MIOFIBROBLASTOS.....	29
1.6	ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67.....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> .....	35
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63
	<b>APÊNDICES</b> .....	71
	APÊNDICE A - METODOLOGIA EXPANDIDA.....	71
	<b>ANEXOS</b> .....	77
	ANEXO A - TERMO COSUBSTANCIADO DO CEPESH.....	77
	ANEXO B - GUIA DE INFORMAÇÕES AO AUTOR.....	81



## INTRODUÇÃO

### 1.1 QUEILITE ACTÍNICA

A queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente malignizável, ou seja, que apresenta um risco aumentado de crescimento celular desordenado e de transformar-se em câncer, resultante da exposição crônica e prolongada à radiação ultravioleta (UV) (Silverman, Eversole e Truelove, 2004; Vieira *et al.*, 2012). Acomete, mais frequentemente, o lábio inferior de homens de pele clara com idade entre sexta a sétima décadas de vida, uma vez que os danos causados pela radiação UV são acumulativos (Kaugars *et al.*, 1999; Cavalcante, Anbinder e Carvalho, 2008; Vieira *et al.*, 2012). Esta lesão é semelhante à queratose actínica, doença cutânea potencialmente malignizável também relacionada à exposição crônica e excessiva à radiação UV (Neville *et al.*, 2009). No entanto, a epiderme, por possuir melanina e espessa camada de queratina, proporciona uma proteção natural contra os efeitos nocivos da radiação UV, já o lábio, por ser semimucosa, apresenta camada córnea mais delgada e menor quantidade de melanina quando comparado à pele, o que faz com que seja mais vulnerável aos efeitos nocivos da radiação UV (Kaugars *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2012).

A exposição crônica à radiação UV pode levar a alterações genótípicas e fenotípicas das células epiteliais, genericamente chamadas de atípicas ou displasias epiteliais, que podem ser consideradas alterações pré-malignas por estarem associadas a um aumento de 10 a 20% do risco para desenvolvimento do carcinoma epidermóide (Dos Santos *et al.*, 2003). Dentre estas alterações, destacam-se as alterações no ciclo celular e nos mecanismos de apoptose (Ouhitit *et al.*, 2000).

O diagnóstico da QA é baseado em achados clínicos e histopatológicos. Clinicamente, a lesão caracteriza-se por atrofia e ressecamento da semimucosa labial, escurecimento ou perda da nitidez da linha mucocutânea, descamação constante e até a formação de ulcerações (Neville e Day, 2002; Markopoulos, Albanidou-Farmaki e Kayavis, 2004b; Cavalcante, Anbinder e Carvalho, 2008). Histologicamente, é caracterizada por um epitélio de revestimento atrófico ou acantótico, hiperceratótico e com graus variados de displasia epitelial. A lâmina própria mostra degeneração basofílica do colágeno induzida pela radiação UV e, comumente, observa-se um infiltrado inflamatório crônico adjacente ao epitélio displásico (Markopoulos, Albanidou-Farmaki e Kayavis, 2004a; Silverman, Eversole e Truelove, 2004; Neville *et al.*, 2009).

De acordo com Kaugars *et al.* (1999), é essencial que o grau de displasia epitelial seja determinado juntamente com o diagnóstico histopatológico da QA (Kaugars *et al.*, 1999). Segundo a mais recente classificação dos tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS), as displasias epiteliais são caracterizadas tanto pelo seu aspecto citológico quanto arquitetural

e, quando presentes em um epitélio alterado, podem ser classificadas em displasia leve (DEL), displasia moderada (DEM) e displasia intensa (DEI) (Barnes, 2005). O tratamento da QA pode ser cirúrgico e não cirúrgico dependendo, principalmente, do grau de displasia. Os pacientes necessitam de um contínuo monitoramento clínico e de educação em relação à proteção de seus lábios dos danos provenientes da exposição à radiação UV (Kaugars *et al.*, 1999).

## 1.2 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO

O Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer, por meio da publicação “Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil”, tendo informações de referência para 2014 e 2015, estimou a ocorrência de 15.290 casos novos de carcinoma epidermóide bucal em 2014 no país, sendo 11.280 em homens e 4.010 em mulheres (Brasil, 2014). O carcinoma epidermóide de lábio (CEL) corresponde a 25-30% desses casos (Luna-Ortiz *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2012; Brasil, 2014). É uma doença fortemente relacionada à exposição solar crônica e, por isso, apresenta grande relevância no Brasil, um país tropical com elevada incidência de radiação UV e elevada exposição populacional a essa radiação, tanto na área rural quanto urbana, devido principalmente à sua ocupação profissional (Prado e Passarelli, 2009; Sena *et al.*, 2010).

Acredita-se que o CEL seja precedido pela QA e, por isso, o perfil do paciente seja parecido: normalmente homens de pele clara, com idade entre a 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> décadas de vida, sendo o lábio inferior mais acometido (Neville e Day, 2002; Antunes e Antunes, 2004; Luna-Ortiz *et al.*, 2004; Regezi, Sciubba e Jordan, 2008). As características clínicas desta enfermidade são variáveis, dependendo do estágio em que a lesão se encontra. As lesões geralmente são assintomáticas e aparecem, inicialmente, sob a forma de uma úlcera crônica que não cicatriza ou como uma lesão exofítica que, ocasionalmente, possui uma natureza verrucosa (Antunes e Antunes, 2004; Silva *et al.*, 2006; Regezi, Sciubba e Jordan, 2008). Caracteriza-se, histologicamente, pela presença de cordões ou ilhas de epitélio neoplásico apresentando pleomorfismo nuclear e celular, hiper cromatismo nuclear, aumento no número de mitoses e mitoses atípicas, entre outras alterações. No estroma observa-se tecido conjuntivo denso exibindo degeneração basofílica do colágeno e infiltrado inflamatório crônico (Neville *et al.*, 2009).

Segundo a classificação histológica da OMS para os carcinomas epidermóides, estes podem ser graduados em bem diferenciados (BD), onde as células neoplásicas são muito similares ao epitélio de origem; pouco diferenciados (PD), onde o tecido neoplásico apresenta muitas alterações celulares e arquiteturais, tornando difícil identificação do tecido de origem; ou moderadamente diferenciados (MD), onde a neoplasia apresenta características entre esses dois extremos (Anneroth, Batsakis e Luna, 1987; De Araújo *et al.*,

1997; Barnes, 2005). A cirurgia, acompanhada ou não de radioterapia, continua a ser o padrão ouro de tratamento do CEL. Quando comparado com carcinoma epidermóide intra-oral, o prognóstico para o CEL é bom, com uma taxa de sobrevivência em cinco anos de 95% (Neville e Day, 2002; Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2012).

### 1.3 MUCOCELE

A mucoccele (MUC) é uma lesão benigna geralmente relacionada a trauma que resulta na ruptura de um ducto de glândula salivar e extravasamento de muco para os tecidos moles (Lee, Cho e Park, 2009; Neville *et al.*, 2009).

A lesão é assintomática e apresenta-se como um aumento de volume recorrente de consistência flutuante, com tamanho variando entre 1 e 2 cm e acomete principalmente o lábio inferior de crianças e adultos jovens, podendo ser relatadas em qualquer idade (Neville *et al.*, 2009; More *et al.*, 2014). Microscopicamente, apresenta-se como uma área de mucina extravasada circundada por tecido de granulação. A inflamação apresenta numerosos macrófagos espumosos (Neville *et al.*, 2009).

Muitas destas lesões rompem-se e cicatrizam sozinhas, porém, quando de natureza crônica, necessitam de intervenção cirúrgica para retirada da lesão e da glândula salivar relacionada para que se diminuam os riscos de recorrência (Neville *et al.*, 2009; Carlson, 2015).

### 1.4 METALOPROTEINASES DE MATRIZ

A matriz extracelular (MEC) é composta basicamente por colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas e participa da adesão e sinalização celular. A membrana basal (MB) é uma forma especializada de MEC que separa o epitélio do conjuntivo, proporcionando uma barreira de proteção contra a invasão dos carcinomas (Egeblad e Werb, 2002).

A invasão tumoral é um processo dinâmico e complexo, envolvendo degradação da MEC e da MB para que as células malignas deixem seu lugar de origem e adentrem outros tecidos e os canais linfo-vasculares (Amâlinei *et al.*, 2010; Pietras e Ostman, 2010). Portanto, a proteólise dos componentes da MB e da MEC é um processo fundamental para a invasão tecidual e, consequentemente, para a progressão neoplásica, função que as metaloproteinases de matriz (MMP) exercem com eficiência (Vilen *et al.*, 2013).

As MMPs são enzimas proteolíticas dependentes de cálcio e zinco que possuem a capacidade de degradar proteínas e desempenham funções em diversos processos fisiológicos e patológicos, que incluem embriogênese, reparo

de feridas, doenças inflamatórias e câncer (De Vicente *et al.*, 2005; Vilen *et al.*, 2013). São sintetizadas e secretadas na forma de pró-enzimas por fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, neutrófilos, linfócitos, miofibroblastos, ceratinócitos e células neoplásicas e necessitam de ativação no espaço extracelular para desempenharem suas funções (Visse e Nagase, 2003; Vered *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006; Amălinei *et al.*, 2010; Souza Freitas *et al.*, 2011).

A colagenase A ou MMP-1 degrada colágenos tipo I, II, III, VII, VIII e X, além de outras moléculas como a tenascina C. Ela participa de processos como migração de ceratinócitos e re-epitelização, aumento da proliferação celular e apresenta ação pró e anti-inflamatória. (Visse e Nagase, 2003; Amălinei *et al.*, 2010). As gelatinases A e B ou MMP-2 e MMP-9, respectivamente, degradam colágeno tipo IV e outros componentes da MEC, como colágeno tipo V, VII, X, gelatina tipo I e V, fibronectina e elastina (Visse e Nagase, 2003; Amălinei *et al.*, 2010). Ambas estão associadas à invasão de células neoplásicas por sua habilidade em degradar o colágeno do tipo IV da MB, que é considerado o primeiro obstáculo a ser vencido no processo de invasão tumoral (Visse e Nagase, 2003; De Vicente *et al.*, 2005; Amălinei *et al.*, 2010).

A expressão das MMPs é aumentada na maioria das neoplasias malignas humanas, quando em comparação com os tecidos de origem saudáveis ou sob outras condições patológicas. Acredita-se que as MMPs possam regular o microambiente do tumor (Bissell e Radisky, 2001; Egeblad e Werb, 2002; Amălinei *et al.*, 2010). Neste ínterim, durante o processo de invasão tumoral, as células neoplásicas interagem com as células do estroma e com os componentes da matriz extracelular (Kellermann *et al.*, 2008). Assim, as MMPs também seriam sintetizadas por células do estroma do tumor, incluindo fibroblastos, miofibroblastos (MF), células inflamatórias e endoteliais (Ziober *et al.*, 2000). Tal fato sugere que as células malignas induzem o estroma a produzir MMPs e utilizam-se destas proteases em sua progressão, indicando um papel ativo para o estroma na invasão tumoral (Ziober *et al.*, 2000; De Vicente *et al.*, 2005).

Atualmente, as decisões terapêuticas para o tratamento de lesões malignas fundamentam-se em parâmetros clínicos e patológicos, incluindo: idade do paciente, presença de metástases, fase e o grau de diferenciação histológica da neoplasia (Laimer *et al.*, 2008). No entanto, estes fatores não distinguem entre um tumor mais ou menos agressivo (Laimer *et al.*, 2008). Neste ínterim, marcadores específicos, como as MMPs, enzimas expressas em várias neoplasias malignas e relacionadas com todas as fases de progressão tumoral, poderiam constituir alvos específicos para uma estratégia terapêutica mais eficiente (Laimer *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2011).

## 1.5 MIOFIBROBLASTOS

Os miofibroblastos são células mesenquimais especializadas que compartilham características com fibroblastos e com células musculares lisas

(Dayan, Nasrallah e Vered, 2005; Eyden *et al.*, 2009). Apresentam-se, morfológicamente, com formato fusiforme ou estrelar e possuem alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) em sua composição, o que confere ao MF a capacidade contrátil, além de permitir a identificação destas células nos tecidos (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Eyden *et al.*, 2009; Kawashiri *et al.*, 2009).

Os MFs foram descritos primeiramente como participantes da cicatrização de feridas abertas (tecido de granulação), o que levou à conclusão de que estas células têm um papel na produção da força contrátil (Tomasek *et al.*, 2002). Posteriormente foram encontrados em tecidos normais que sofrem estresse mecânico, tais como: gengiva marginal, mucosa do palato, glândulas sudoríparas, vasos sanguíneos, vilosidades intestinais, mucosa uterina e estroma testicular (Eyden *et al.*, 2009). Sabe-se que estas células também estão presentes em lesões reativas, neoplasias benignas localmente agressivas, fibromatoses, sarcomas e carcinomas, incluindo os da cavidade oral (Dayan, Nasrallah e Vered, 2005)

Os MFs derivam principalmente de fibroblastos, e menos frequentemente de células do músculo liso, pericitos e células endoteliais (Eyden *et al.*, 2009; Thode *et al.*, 2011). Acredita-se que o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1) e as citocinas expressas por células tumorais estejam envolvidos na transição de fibroblasto em MF (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Eyden *et al.*, 2009; Vered *et al.*, 2009). Este processo é de fundamental importância na formação do tecido de granulação durante a cicatrização de feridas ou fibrose, na promoção e regulação da transformação epitelial maligna e na progressão do câncer (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Eyden *et al.*, 2009; Vered *et al.*, 2009). Os MFs secretam numerosos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios que estimulam a proliferação de células epiteliais, além de serem responsáveis pela síntese de MMPs, favorecendo a invasão e o desenvolvimento neoplásico (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Eyden *et al.*, 2009; Kawashiri *et al.*, 2009).

A relação entre as células epiteliais e o estroma é de fundamental importância na progressão neoplásica (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Kellermann *et al.*, 2007). Sabe-se que uma das características de muitas neoplasias epiteliais é a reação estromal, caracterizada pelo acúmulo local de células e de componentes do tecido conjuntivo, na qual é fundamental a participação dos MF (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004). No estroma de neoplasias, a contratilidade e a produção de colágeno pelos MF explica o fenômeno de retração e consistência firme vista em alguns carcinomas (Eyden *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que o aumento de MF no estroma de diversas neoplasias está relacionado a um pior prognóstico para o paciente (Kellermann *et al.*, 2007; Eyden *et al.*, 2009; Kawashiri *et al.*, 2009; Thode *et al.*, 2011).

## 1.6 ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67

A proliferação celular consiste em um processo biológico vital ao organismo e caracteriza-se por um aumento do número de células que tenham completado seu ciclo celular. O controle deste processo é perdido nas lesões neoplásicas malignas e a taxa de proliferação celular pode indicar a agressividade e o potencial de recidiva das neoplasias (Brown e Gatter, 2002; Tumuluri, 2002).

O antígeno de proliferação Ki-67 é uma proteína não-histona que é produzida no núcleo das células durante as fases G1, S, G2 e M e ausente na fase G0 do ciclo celular e, por isso, é considerada um dos marcadores mais confiáveis na identificação da atividade proliferativa de um tecido (Gerdes *et al.*, 1984; Brown e Gatter, 1990; Sittel *et al.*, 1999; Scholzen e Gerdes, 2000). Em patologia é utilizado na rotina como um marcador nuclear de proliferação que reflete a fração proliferativa total de um tecido (Gonzalez-Moles *et al.*, 2010; Birajdar *et al.*, 2014). Tal biomarcador também pode ser utilizado para prever o estado de crescimento e comportamento agressivo de lesões potencialmente malignas e carcinoma oral (Salvadori *et al.*, 2014).

O Ki-67 participa do grupo de moléculas que estimulam o crescimento tumoral através da aceleração do ciclo celular e proliferação (Schliephake, 2003). Em lesões de mucosa oral, estudos demonstram que o número de células positivas para Ki-67 aumenta de acordo com o aumento da severidade do grau de displasia epitelial (Kurokawa *et al.*, 2003) e do grau de diferenciação histopatológica no carcinoma epidermóide oral (Tumuluri, Thomas e Fraser, 2002).

Diversos trabalhos estudaram a presença das MMPs em carcinoma epidermóide oral e QA de forma isolada (De Vicente *et al.*, 2005; Barros *et al.*, 2011; Mohtasham *et al.*, 2013; Pouloupoulos, Andreadis e Markopoulos, 2013), no entanto, ainda são escassos os estudos envolvendo a correlação da expressão destas proteases entre CEL e QA (Souza Freitas *et al.*, 2011). Sabendo da importância destas proteínas, bem como do Ki-67 e dos MF na progressão neoplásica, este estudo imuno-histoquímico buscou avaliar a associação entre a presença de MMPs -1, -2 e -9, MF e o índice proliferação celular em lesão pré-maligna (QA) e lesões malignas de lábio (CEL), quando comparadas a uma lesão de lábio não-neoplásica (MUC).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista a escassez de trabalhos relacionando as lesões de QA (potencialmente malignizável) e CEL (uma lesão maligna) quando em comparação ao tecido não-neoplásico (MUC) e sabendo-se da incidência destas lesões no Brasil, é essencial compreender melhor os mecanismos de desenvolvimento e invasão neoplásicos, bem como conhecer melhor a interação entre células epiteliais e tecido conjuntivo e sua possível relação com os tratamentos do câncer. Para isto, este trabalho buscou avaliar a expressão das MMPs, bem como a presença de MF e do índice de proliferação celular.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença das MMPs -1, -2 e -9, presença de MFs e o índice de proliferação epitelial em 30 casos de QA (lesão potencialmente malignizável), 30 casos de CEL (lesão maligna) e 20 mucocelos (MUC) por meio da técnica de imuno-histoquímica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar as QAs de acordo com seu grau de displasia epitelial e os CELs de acordo com seu grau de diferenciação histológica;
- Avaliar a expressão imuno-histoquímica das MMPs -1, -2 e -9 em QAs, CELs e MUCs;
- Avaliar a presença de MFs por meio da expressão imuno-histoquímica para  $\alpha$ -SMA em QAs, CELs e MUCs;
- Analisar o índice proliferativo das células epiteliais de QAs, CELs e MUCs por meio da marcação imuno-histoquímica para antígeno de proliferação celular Ki-67;
- Comparar a expressão de cada proteína estudada entre QA, CEL e MUC.



## 4 ARTIGO

Artigo formatado conforme normas da revista *Oral Oncology* (ANEXO B), com exceção do idioma e do formato das referências.

### TÍTULO

Expressão das metaloproteinases de matriz -1, -2 e -9, miofibroblastos e Ki-67 em queilites actínicas e carcinoma epidermóide de lábio

### RESUMO

**Objetivo:** Investigar a expressão das metaloproteinases de matriz (MMP) -1, -2 e -9, a presença de miofibroblastos (MFs) e o índice de proliferação celular em queilite actínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL).

**Materiais e métodos:** Trinta casos de QA, trinta de CEL e vinte de MUC foram selecionados para investigação imuno-histoquímica das proteínas MMP-1, MMP-2, MMP-9,  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e Ki-67.

**Resultados:** A imunomarcação de MMP-1 em tecido epitelial foi maior em QA quando comparados às outras lesões. No tecido conjuntivo observou-se maior expressão em CEL. A MMP-2 apresentou imunomarcação epitelial e estromal menor em CEL quando comparada às outras lesões. A marcação epitelial para MMP-9 foi maior em QA quando relacionada ao CEL. Já em tecido conjuntivo sua expressão foi menor em QA em comparação com as outras lesões. O índice de proliferação celular foi crescente de acordo com o aumento da severidade da displasia nas QA, enquanto para CEL foi maior nos casos bem diferenciados em comparação com os moderadamente diferenciados. Não houve diferença significativa na presença de MFs entre as lesões estudadas.

**Conclusão:** Os resultados sugerem que as MMPs -1, -2 e -9 possam influenciar no comportamento biológico de QA e CEL participando do desenvolvimento e progressão da lesão pré-maligna em maligna.

**Palavras-chave:** Imuno-histoquímica; Metaloproteinase 1 da matriz; Metaloproteinase 2 da matriz, Metaloproteinase 9 da matriz;

Miofibroblastos; Proliferação de células; Queilite; Carcinoma de células escamosas; Lábio.

## INTRODUÇÃO

A queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente malignizável resultante da exposição crônica e prolongada à radiação ultravioleta (UV) (Vieira *et al.*, 2012). A exposição à radiação UV leva a alterações genotípicas e fenotípicas das células epiteliais que podem ser associadas a um aumento de 10 a 20% do risco para desenvolvimento do carcinoma epidermóide (Dos Santos *et al.*, 2003). O carcinoma epidermóide de lábio (CEL) corresponde a 25-30% dos casos de carcinoma epidermóide bucal (Luna-Ortiz *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2012; Brasil, 2014) e constitui uma enfermidade de grande relevância no Brasil, um país tropical com elevada incidência de radiação UV (Prado e Passarelli, 2009; Sena *et al.*, 2010).

A progressão e invasão tumorais são processos dinâmicos e complexos, que envolvem a degradação da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal (MB) para que as células malignas deixem seu sítio de origem e adentrem outros tecidos e estruturas (Amãlinei *et al.*, 2010). Portanto, a proteólise dos seus componentes é fundamental para a invasão tecidual e, conseqüentemente, para a progressão neoplásica - função que as metaloproteinases de matriz (MMP) exercem com eficiência (Vilen *et al.*, 2013). As MMPs são enzimas proteolíticas que desempenham funções em diversos processos fisiológicos e patológicos, como doenças inflamatórias e câncer (De Vicente *et al.*, 2005; Vilen *et al.*, 2013). São sintetizadas e secretadas na forma de pró-enzimas por fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, neutrófilos, linfócitos, miofibroblastos, ceratinócitos e células neoplásicas e necessitam de ativação no espaço extracelular para desempenharem suas funções (Visse e Nagase, 2003; Vered *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006; Amãlinei *et al.*, 2010; Souza Freitas *et al.*, 2011).

A MMP-1 degrada colágenos tipo I, II, III, VII, VIII e X, além de outras moléculas como a tenascina C. Já as MMP-2 e -9 degradam colágeno tipo IV e outros componentes da MEC, como colágeno tipo V, VII, X, gelatina tipo I e V, fibronectina e elastina (Visse e Nagase, 2003; Amãlinei *et al.*, 2010). A expressão das MMPs é aumentada em neoplasias malignas humanas, quando em comparação com os tecidos de origem. Acredita-se que as MMPs possam regular o microambiente do tumor (Bissell e Radisky, 2001; Egeblad e Werb, 2002). Neste

interim, durante o processo de invasão tumoral as células neoplásicas interagem com as células do estroma e com os componentes da MEC, estimulando a produção de MMPs por fibroblastos, miofibroblastos (MF), células inflamatórias e endoteliais (Ziober *et al.*, 2000; De Vicente *et al.*, 2005; Kellermann *et al.*, 2008).

Os MFs são células mesenquimais especializadas que compartilham características com fibroblastos e com células musculares lisas (Dayan, Nasrallah e Vered, 2005; Eyden *et al.*, 2009). Acredita-se que o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1) e as citocinas expressas por células tumorais estejam envolvidos na transição de fibroblastos em MFs (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Eyden *et al.*, 2009; Vered *et al.*, 2009). Este processo é de fundamental importância na formação do tecido de granulação, na promoção e regulação da transformação epitelial maligna e na manutenção da progressão do câncer (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Eyden *et al.*, 2009; Vered *et al.*, 2009). Os MFs secretam numerosos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios que estimulam a proliferação de células epiteliais, além de serem responsáveis pela síntese de MMPs, favorecendo a invasão e o desenvolvimento neoplásico (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Eyden *et al.*, 2009; Kawashiri *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que o aumento de MF no estroma de diversas neoplasias está relacionado a um pior prognóstico para o paciente (Kellermann *et al.*, 2007; Eyden *et al.*, 2009; Kawashiri *et al.*, 2009; Thode *et al.*, 2011).

Finalmente, o controle da proliferação celular é perdido nas lesões neoplásicas malignas e a taxa de proliferação celular pode indicar a agressividade e o potencial de recidiva das neoplasias (Brown e Gatter, 2002; Tumuluri, 2002). Na mucosa oral, estudos demonstram que o número de células positivas para Ki-67, uma proteína não-histona de proliferação celular, aumenta com a presença e de acordo com o aumento da severidade do grau de displasia epitelial (Kurokawa *et al.*, 2003) e do grau de diferenciação histopatológica no carcinoma epidermóide oral (Tumuluri, Thomas e Fraser, 2002).

Sabendo da importância destas proteínas na progressão neoplásica, alguns artigos estudaram seus papéis na carcinogênese de lábio de modo que este estudo imuno-histoquímico foi desenhado para avaliar a associação entre a presença de MMPs -1, -2 e -9, MF e o índice proliferação celular em lesão pré-maligna (QA) e lesões malignas

de lábio (CEL), quando comparadas a uma lesão de lábio não-neoplásica (MUC).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Seleção da amostra

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras foram selecionadas a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC e divididas em: QA, composto por 30 casos de QA; CEL, composto por 30 casos de carcinoma epidermóide de lábio; e MUC, contendo 20 casos de biópsias oriundas de mucocèle que continham revestimento epitelial, como fonte de epitélio não neoplásico. A utilização de mucocèles ocorreu devido à inviabilidade de obtenção de fragmentos de lábio normal.

### Análise histológica

As lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) foram analisadas simultaneamente por três examinadores para determinação do grau de displasia epitelial nas QAs e grau de diferenciação histopatológica dos CELs, seguindo os critérios estabelecidos pela OMS (Barnes, 2005). As displasias epiteliais foram classificadas em leves quando a presença de alterações displásicas se restringia somente ao terço inferior do epitélio; moderadas, quando estas alterações eram encontradas até o terço médio; e intensas, quando as alterações displásicas ultrapassavam o terço médio e estendiam-se ao terço superior (Barnes *et al.*, 2005). Os carcinomas foram classificados bem diferenciados (muito similar ao seu epitélio de origem), pouco diferenciada (uma lesão em que predominam células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas, além de mínima ceratinização, tornando muitas vezes, difícil identificar seu tecido de origem) ou moderadamente diferenciada, com características entre esses dois extremos (Anneroth, Batsakis e Luna, 1987; De Araújo *et al.*, 1997; Barnes *et al.*, 2005)

## Imuno-histoquímica

As amostras foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos (Quadro 1) e o controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário. Das amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina foram obtidos cortes de 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro silanizadas (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Foi realizada a desparafinização e reidratação dos cortes, seguidas de imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato 0,01M a 96°C. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado pela incubação dos cortes em solução de leite desnatado a 5% em tampão fosfato salina (PBS), por 40 minutos. A incubação com os anticorpos primários (Quadro 1) foi realizada em câmara úmida mantida sob refrigeração (4 a 8°C), overnight.

A seguir foi utilizado o Kit LSAB (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) com anticorpo secundário biotilado, e complexo estreptavidina-peroxidase. As lâminas então foram coradas com solução cromógena DAB (Dako, Corporation, Carpinteria, CA, EUA) e contra coradas com Hematoxilina de Harris. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Controle positivo
<b>MMP-1</b>	Policlonal	DBS	1:300	Placenta
<b>MMP-2</b>	Policlonal	Sigma	1:50	Carcinoma de mama
<b>MMP-9</b>	Policlonal	Sigma	1:250	Medula
<b>α-SMA</b>	Policlonal	Sigma	1:1000	Vasos sanguíneos
<b>Ki-67</b>	Monoclonal – SP6	Biocare	1:75	Carcinoma epidermóide intra-oral

Quadro 1: Anticorpos utilizados

### Análise das reações de imuno-histoquímica

As lâminas tiveram sua identificação mascarada, de forma que a avaliação das reações foi realizada por um examinador cegado e calibrado ( $Kappa > 0,8$ ) que utilizou o software NIH ImageJ 1.410

(National Institute of Health, Bethesda, EUA). Foram obtidas, por meio de câmera fotográfica (Cannon, A620, San Jose, CA, EUA) acoplada a microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), 5 imagens equidistantes da interface entre epitélio e conjuntivo de cada caso, com magnitude de 400X. A interface entre epitélio e conjuntivo foi a área escolhida para este estudo, pois é nesta que se encontra o fronte de invasão dos CEL, foco principal de interesse no estudo das MMPs (Barros *et al.*, 2011; Souza Freitas *et al.*, 2011) e assim possibilitou um padrão de comparação com QA e MUC.

A avaliação para MMP-1, -2 e -9, caracterizada pela coloração castanha no citoplasma e MEC, foi obtida individualmente no tecido epitelial e tecido conjuntivo. A análise do tecido epitelial foi realizada através da média da porcentagem de células positivas dos 5 campos equidistantes. Já a análise do tecido conjuntivo deu-se por meio da média da porcentagem da área marcada (pixels positivos) em relação à área total do tecido conjuntivo de cada campo (pixels totais) das 5 imagens obtidas de cada caso.

Para verificar a presença de MFs foi observada a expressão de  $\alpha$ -SMA nos MFs presentes no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio. Esta avaliação foi realizada através da média de células positivas dos 5 campos para cada caso. Foram consideradas positivas as células que apresentaram marcação castanha no citoplasma, excluindo-se as células inflamatórias, células endoteliais e células nas proximidades dos vasos sanguíneos (positivas para  $\alpha$ -SMA).

A avaliação da imunopositividade para Ki-67, caracterizada pela coloração castanha do núcleo nas células epiteliais, foi obtida pela média da porcentagem de núcleos positivos por campo analisado. Para cada caso foram contadas pelo menos 1000 células epiteliais (positivas e negativas) somadas nos 5 campos equidistantes.

#### Análise estatística

Foi realizada a estatística descritiva para cada variável analisada, e a comparação da expressão dessas variáveis entre os grupos analisados QA, CEL e MUC por meio do teste t não pareado utilizando-se o programa Microsoft Excel (Microsoft Office Corporation, Washington, EUA). Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas ou área corada  $\pm$  desvio-padrão da média (DPM). Considerou-se valor de  $p < 0,05$  para dados com significância estatística.

## RESULTADOS

### Análise Histológica

A análise dos casos estudados para determinação do grau de displasia epitelial nas QA e grau de diferenciação histopatológica dos CEL, seguindo os critérios estabelecidos pela OMS (Barnes, 2005) e resultou em 9 casos de QA apresentando displasia epitelial leve (DEL), 14 apresentando displasia epitelial moderada (DEM) e 7 apresentando displasia epitelial intensa (DEI) (Tabela 2). Já dentre os 30 CEL estudados, 12 casos apresentavam-se bem diferenciados (BD), 8 casos eram moderadamente diferenciados (MD) e 10 casos pouco diferenciados (PD) (Tabela 3).

### Análise Imuno-histoquímica

Todos os resultados da avaliação imuno-histoquímica encontram-se detalhados nas tabelas 1, 2 e 3.

### MMPs

A imunomarcação das MMPs mostrou um padrão de marcação que dividia o epitélio em terços basal, médio e superior, sendo que a marcação foi sempre presente de forma mais intensa no terço inferior. A marcação em tecido conjuntivo ocorreu tanto no citoplasma das células presentes neste tecido, quanto na MEC, exceto em áreas com degeneração basofílica do colágeno (Figura 1A-I).

A imunomarcação para a enzima MMP-1 foi significativamente mais presente no epitélio dos casos de QA quando comparados com MUC ( $p=0,023$ ) e com CEL ( $p=0,029$ ). Já no caso da expressão em tecido conjuntivo, observou-se significância estatística somente na comparação entre CEL e MUC ( $p=0,013$ ), porém ela foi quantitativamente mais expressa em CEL ( $7,29\% \pm 6,21$ ) quando comparado com a QA ( $4,80\% \pm 4,24$ ). Importante ressaltar a maior média de marcação para MMP-1 nas QA com DEI ( $6,18\% \pm 5,77$ ) em comparação com DEL ( $2,84\% \pm 1,92$ ) e DEM ( $4,88\% \pm 3,81$ ) apesar da ausência de significância.

A enzima MMP-2 apresentou imunomarcação epitelial

significativamente menor em CEL quando comparado com QA ( $p=0,003$ ) e MUC ( $p=0,004$ ). No caso da expressão em tecido conjuntivo observou-se significância estatística somente na comparação entre QA e MUC ( $p=0,029$ ), sendo a expressão maior em MUC.

Finalmente, no caso da MMP-9, a marcação epitelial foi significativamente mais presente em QA quando comparado com CEL ( $p=0,003$ ), não havendo diferença estatística entre QA e MUC, apesar da diferença de expressão entre ambas ( $59,07\% \pm 28,84$  para QA e  $41,68\% \pm 38,43$  para MUC). No entanto, quando analisada a expressão da enzima em tecido conjuntivo verificou-se uma menor expressão em QA quando comparado com CEL ( $p<0,001$ ) e com MUC ( $p=0,033$ ).

Não foram observadas diferenças estatísticas significantes em nenhum dos outros parâmetros estudados para as MMPs.

### Proliferação Celular (Ki-67)

A imunomarcagem do anticorpo Ki-67 foi observada no núcleo das células epiteliais das camadas basal e parabasal do epitélio de MUC e QA e dispersa nas áreas de invasão de CEL (Figura 1J-L). Não se observou diferença significativa entre os MUC, QA e CEL estudados entre o percentual de células positivas para o anticorpo Ki-67. No entanto, observou-se que o índice de proliferação celular foi crescente de acordo com aumento da severidade da displasia. Já para os casos de CEL, houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre CEL BD e MD, sendo maior em BD ( $p=0,004$ ).

### Miofibroblastos ( $\alpha$ -SMA)

A presença de MFs foi observada no tecido conjuntivo adjacente a todas as lesões (Figura 1M-O). Não foram observadas diferenças estatísticas significantes em nenhum dos parâmetros estudados para a análise dos MF a partir do estudo imuno-histoquímico com o anticorpo  $\alpha$ -SMA.

## DISCUSSÃO

Diversos trabalhos estudaram a presença das MMPs em carcinoma epidermóide oral e QA de forma isolada (De Vicente *et al.*, 2005; Barros *et al.*, 2011; Mohtasham *et al.*, 2013; Pouloupoulos,

Andreadis e Markopoulos, 2013), no entanto, ainda são escassos os estudos envolvendo a correlação da expressão destas proteases entre CEL e QA (Souza Freitas *et al.*, 2011). Neste estudo, avaliou-se a expressão das MMPs -1, -2 e -9, Ki-67 e  $\alpha$ -SMA nos componentes epitelial e conjuntivo de CEL, uma neoplasia maligna de comportamento invasivo, bem como de QA, uma lesão com potencial de transformação em CEL. Como parâmetro de comparação, avaliou-se a expressão das mesmas proteínas em uma lesão labial não-neoplásica, a mucocela (MUC). Vale ressaltar que MUC não é a melhor fonte de comparação para este tipo de estudo, pois apresenta componente inflamatório variável e, conseqüentemente, diversas citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), que podem estimular a produção de MMPs (Hoque, Azuma e Sato, 1998). No entanto, frente à ausência de tecido labial normal nos arquivos de coleta das amostras e aos conflitos éticos envolvidos na aquisição cirúrgica de tecido labial normal, MUC foi a fonte de epitélio labial não-neoplásico mais viável.

Sabe-se que QA e CEL têm relação com a exposição crônica e prolongada à radiação UV (Sena *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012) que, por sua vez, pode ativar as MMPs, levando à degradação da MEC (Pillai, Oresajo e Hayward, 2005). O padrão de imunomarcagem das MMPs no epitélio das lesões estudadas foi mais evidente no terço basal e sua expressão em tecido conjuntivo ocorreu tanto no citoplasma das células ali presentes, quanto na MEC. Levando-se em conta que a relação entre as células epiteliais e o tecido conjuntivo subjacente (seja ele denominado lâmina própria nos casos de MUC e QA ou estroma nos casos de CEL) é de fundamental importância na progressão tumoral (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Kellermann *et al.*, 2007), este padrão de marcação, quando evidenciado principalmente em QA e CEL, é condizente com as funções determinadas para estas proteínas na progressão e invasão neoplásica (De Vicente *et al.*, 2005; Kellermann *et al.*, 2008; Pietras e Ostman, 2010).

A MMP-1 exerce papel fundamental na remodelação da MEC, degradando diretamente vários de seus componentes, principalmente o colágeno intersticial (tipo I) e ativando, indiretamente, a MMP-2, uma das principais enzimas responsáveis pela invasão tumoral (De Vicente *et al.*, 2005; Cao, Xiang e Li, 2009). Assim, a MMP-1 parece exercer importantes funções nas fases pré-malignas e em lesões *in situ*, fato que condiz com sua maior expressão epitelial na fase pré-maligna (QA),

principalmente quando esta apresentava DEI.

No entanto, a análise da expressão de MMP-1 no tecido conjuntivo revelou predomínio nos casos de CEL. Isto também pode ser explicado pela capacidade da MMP-1 de clivar colágeno do tipo I, componente abundante no estroma circundante do tumor e, portanto, participar do fenômeno da invasão, uma constante no comportamento das neoplasias malignas (Shimizu *et al.*, 2008). Barros *et al.* (2011) também encontraram marcação de MMP-1 de moderada a intensa no estroma da maioria dos CEL estudados e sugeriram que tal fato diz respeito à indução da produção estromal de MMPs pelas células neoplásicas (Barros *et al.*, 2011).

A imunoeexpressão, tanto de MMP-2 quanto de MMP-9, foi menor no parênquima dos CELs quando comparada ao epitélio de QAs e MUCs. Inomata *et al.* (2003) encontraram relação positiva entre a exposição à radiação UV e a degeneração da MB por gelatinases (Inomata *et al.*, 2003). As MMPs -2 e -9 degradam componentes da MB e MEC, afim de que as células neoplásicas penetrem no tecido conjuntivo (De Vicente *et al.*, 2005; Pietras e Ostman, 2010) e isso poderia justificar a maior expressão de MMP -2 e -9 no epitélio da QA, lesão em que ainda não houve a destruição da MB, sendo necessária maior expressão epitelial das gelatinases quando comparado com CEL, doença já invasiva. Souza Freitas *et al.* (2011), utilizando método semi-quantitativo baseado em porcentagem de imunorreatividade e intensidade de marcação, encontraram imunoeexpressão maior em células epiteliais do CEL quando comparado a QA (Souza Freitas *et al.*, 2011), no entanto, devido às diferenças metodológicas na avaliação, não existem parâmetros seguros de comparação com os resultados encontrados no presente estudo.

Em tecido conjuntivo, observou-se predomínio da expressão imuno-histoquímica das MMPs -2 e -9 em CEL quando comparado com QA, mostrando um quadro inverso quando comparado com a expressão epitelial. Esse resultado pode ser explicado, pois após a degradação pela MMP-1, o colágeno tipo I (principal componente do estroma) é transformado em gelatina, componente a ser clivado pelas gelatinases (MMPs -2 e -9), sendo estas essenciais na progressão e invasão tumoral (Cotrim *et al.*, 2002; De Vicente *et al.*, 2005; Pietras e Ostman, 2010).

Finalmente, as MMPs estudadas mostraram tendência de expressão predominante no epitélio quando na fase pré-maligna (QA) e predominância em tecido conjuntivo na fase maligna (CEL). Tal fato faz crer que na QA, doença não invasiva, as MMPs seriam um dos fatores envolvidos diretamente na progressão do componente epitelial para a

malignidade, provavelmente exercendo a sua capacidade de regulação do microambiente alterado, proliferação epitelial e degradação da MB (Bissell e Radisky, 2001; Egeblad e Werb, 2002; Visse e Nagase, 2003; De Vicente *et al.*, 2005; Amălinei *et al.*, 2010) e assim colaborariam na progressão neoplásica. Já, quando a malignidade estivesse estabelecida (CEL), essas MMPs exerceriam um papel preponderante na viabilização da invasão tecidual, a partir da indução da sua produção pelo estroma (Ziober *et al.*, 2000; De Vicente *et al.*, 2005).

A marcante presença das MMPs -1, -2 e -9 em MUC, tanto no componente epitelial, quanto no componente de tecido conjuntivo, pode ser explicada pelo fato das mucocelas apresentarem diversas citocinas inflamatórias, que podem estimular a produção de MMPs, além de abundantes quantidades de MMP-1 em macrófagos, o que pode levar à expressão de MMP-2 por fibroblastos e MMP-9 também por macrófagos (Hoque, Azuma e Sato, 1998; Pesce *et al.*, 2003).

No presente estudo, a comparação da presença de MFs entre a lesão maligna, lesão pré-maligna e não-neoplásica não apresentou diferença estatisticamente significativa. Uma das hipóteses para explicar tal ausência de diferença estatística seria a influência negativa da degeneração basofílica do tecido conjuntivo presente em QA e CEL sobre a atividade de MFs, já que sabe-se que a exposição excessiva à radiação UV leva à degradação do tecido conjuntivo, por meio de mudanças celulares e mudanças no perfil proteico da sua MEC, com alterações ultra-estruturais e deposição de substância exógenas (Suwabe *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2008). Além disso, os fibroblastos, que constituem uma das fontes de origem para os MFs, quando expostos a UV passam a exibir diversas alterações fenotípicas (Ma *et al.*, 2008). Não está claro na literatura se essas mudanças afetam a presença e a atividade dos MFs, mas devem ser consideradas para estudos futuros.

A presença elevada de MFs em MUCs pode ser explicada pelo fato de os primeiros eventos de diferenciação dos fibroblastos em MFs ocorrerem em resposta a alterações na composição e organização do microambiente associado com citocinas liberadas localmente por células inflamatórias, normalmente presentes em MUC (Vered *et al.*, 2009).

No entanto, apesar da ausência de significância, ressalta-se que a média de células marcadas para QA e CEL foi maior que para MUC. Este achado condiz com diversos estudos, que encontraram maior presença de MFs em carcinoma epidermóide oral em comparação com tecidos sadios ou não neoplásicos (Kellermann *et al.*, 2007; Etemad-

Moghadam *et al.*, 2009; Seifi *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2015). Este padrão de apresentação deve-se ao fato dos MFs secretarem numerosos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios que estimulam a proliferação de células epiteliais, além de serem responsáveis pela síntese de MMPs, favorecendo o desenvolvimento neoplásico (Desmoulière, Guyot e Gabbiani, 2004; Eyden *et al.*, 2009; Kawashiri *et al.*, 2009; Lúcio *et al.*, 2013). Importante ressaltar também a maior presença de MFs nas lesões de CEL menos diferenciadas, dado compatível com estudo de Rodrigues *et al.* (2015) que detectaram maior densidade de MFs no estroma de carcinomas epidermóides orais MD e PD em comparação com BD (Rodrigues *et al.*, 2015).

Da mesma forma a avaliação da proliferação celular, por meio da avaliação do antígeno de proliferação celular Ki-67, nas doenças estudadas não resultou em diferenças estatisticamente significantes. No entanto, quando as médias de células positivas entre as lesões são levadas em conta, observou-se maior índice de proliferação celular nas lesões de CEL, quando comparada à MUC e à QA. Sabe-se que o desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral é um processo de múltiplas fases, que compreende etapas de iniciação, promoção e progressão tumoral (Chen *et al.*, 2011). A perda do controle da proliferação celular é considerada um dos mecanismos biológicos da carcinogênese (Tumuluri, Thomas e Fraser, 2002; Gonzalez-Moles *et al.*, 2010), por isso espera-se maior taxa de proliferação epitelial em lesões malignas.

A presença marcante de Ki-67 em MUC pode ser explicada pela resposta inflamatória presente na lâmina própria desta doença, que aumentaria a quantidade de mediadores inflamatórios, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, e levaria ao aumento da proliferação epitelial (Lin, Huang e Rosenberg, 2007).

Além disso, observou-se aumento da taxa de proliferação de acordo com o grau de displasia presente em QA, dados que já haviam sido relatados em estudo com QAs e com lesões displásicas intra-orais (Kurokawa *et al.*, 2003; Birajdar *et al.*, 2014; Salvadori *et al.*, 2014). Para CEL, a expressão de Ki-67 mostrou diferença estatisticamente apenas entre BD e MD. Este dado, conflitante com outros estudos, que normalmente encontravam aumento de proliferação de acordo com a diminuição da diferenciação (Tumuluri, Thomas e Fraser, 2002; Kurokawa *et al.*, 2003; Birajdar *et al.*, 2014; Salvadori *et al.*, 2014), pode ser produto da análise comparativa entre 2 grupos com baixo número de casos, a saber: BD com 12 casos e MD com 8 casos.

## CONCLUSÃO

Conclui-se, por meio da expressão em tecido epitelial e tecido conjuntivo, que as MMPs -1, -2 e -9 participam do comportamento biológico de QA e CEL e podem estar envolvidas no desenvolvimento e progressão da lesão pré-maligna em maligna e, na malignidade estabelecida, favorecer a progressão e invasão por meio da indução do estroma. Conclui-se também que a proliferação celular e a presença de miofibroblastos não apresentaram influência significativa na amostra analisada.

## REFERÊNCIAS

AMĂLINEI, C. et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol**, v. 51, n. 2, p. 215-28, 2010. ISSN 1220-0522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495735> >.

ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res**, v. 95, n. 3, p. 229-49, Jun 1987. ISSN 0029-845X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3299675> >.

BARNES, L., EVERSON, J.W., REICHART, P., SIDRANSKY, D. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. 327.

BARNES, L. et al. **Head and Neck Tumors**. 2005.

BARROS, S. S. et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 8, p. 752-60, Aug 2011. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21255765> >.

BIRAJDAR, S. S. et al. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 18, n. 2, p. 169-76, May 2014. ISSN 0973-029X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25328294> >.

BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 1, p. 46-54, Oct 2001. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900251> >.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2-11, Jan 2002. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11903593> >.

CAO, Z.; XIANG, J.; LI, C. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinase-1 in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n. 8, p. 880-5, Aug 2009. ISSN 1399-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372030> >.

CHEN, Y. K. et al. Aberrant expression in multiple components of the transforming growth factor- $\beta$ 1-induced Smad signaling pathway during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinogenesis. **Oral Oncol**, v. 47, n. 4, p. 262-7, Apr 2011. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356605> >.

COTRIM, P. et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the development of rat first molar tooth germ. **Braz Dent J**, v. 13, n. 2, p. 97-102, 2002. ISSN 0103-6440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12238810> >.

DAYAN, D.; NASRALLAH, V.; VERED, M. Clinico-pathologic correlations of myofibroblastic tumors of the oral cavity: 1. Nodular fasciitis. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 7, p. 426-35, Aug 2005. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011613> >.

DE ARAÚJO, V. C. et al. p53 In biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system.

**Oral Oncol**, v. 33, n. 1, p. 5-9, Jan 1997. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192545> >.

DE VICENTE, J. C. et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 41, n. 3, p. 283-93, Mar 2005. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743691> >.

DESMOULIÈRE, A.; GUYOT, C.; GABBIANI, G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **Int J Dev Biol**, v. 48, n. 5-6, p. 509-17, 2004. ISSN 0214-6282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15349825> >.

DOS SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **J Cutan Pathol**, v. 30, n. 4, p. 237-41, Apr 2003. ISSN 0303-6987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12680953> >.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-74, Mar 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990853> >.

ETEMAD-MOGHADAM, S. et al. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n. 8, p. 639-43, Sep 2009. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19473444> >.

EYDEN, B. et al. The myofibroblast and its tumours. **J Clin Pathol**, v. 62, n. 3, p. 236-49, Mar 2009. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930983> >.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. **Oral Oncol**, v. 46, n. 7, p. 525-30, Jul 2010. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400362> >.

HOQUE, M. O.; AZUMA, M.; SATO, M. Significant correlation between matrix metalloproteinase activity and tumor necrosis factor-alpha in salivary extravasation mucocoeles. **J Oral Pathol Med**, v. 27, n. 1, p. 30-3, Jan 1998. ISSN 0904-2512. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466732\\_>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466732_>).

INOMATA, S. et al. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. **J Invest Dermatol**, v. 120, n. 1, p. 128-34, Jan 2003. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535209>>.

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 1097-0347. Disponível em: < [>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373786).

KELLERMANN, M. G. et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. **Oral Oncol**, v. 44, n. 5, p. 509-17, May 2008. ISSN 1368-8375. Disponível em: < [>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826300).

\_\_\_\_\_. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 849-53, Dec 2007. ISSN 0309-0167. Disponível em: < [>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042073).

KUROKAWA, H. et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 9, p. 513-21, Oct 2003. ISSN 0904-2512. Disponível em: < [>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12969225).

LIN, L. M.; HUANG, G. T.; ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **J Endod**, v. 33, n. 8, p. 908-16, Aug 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < [>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878074).

LIN, M. H. et al. Functional role of matrix metalloproteinase-28 in the oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 42, n. 9, p. 907-13, Oct 2006. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730219> >.

LUNA-ORTIZ, K. et al. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. **Oral Oncol**, v. 40, n. 10, p. 992-9, Nov 2004. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509490> >.

LÚCIO, P. S. et al. Myofibroblasts and their relationship with oral squamous cell carcinoma. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 79, n. 1, p. 112-8, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1808-8686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23503917> >.

MA, W. et al. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 26, n. 7, p. 592-599, 2008.

MOHTASHAM, N. et al. Immunohistochemical study of p53, Ki-67, MMP-2 and MMP-9 expression at invasive front of squamous cell and verrucous carcinoma in oral cavity. **Pathol Res Pract**, v. 209, n. 2, p. 110-4, Feb 2013. ISSN 1618-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23273944> >.

PESCE, C. et al. Tissue repair and remodelling in extravasation mucocele. **Histopathology**, v. 42, n. 5, p. 516-7, May 2003. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713634> >.

PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Exp Cell Res**, v. 316, n. 8, p. 1324-31, May 2010. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211171> >.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix

degradation - a review. **Int J Cosmet Sci**, v. 27, n. 1, p. 17-34, Feb 2005. ISSN 1468-2494. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492178>>.

POULOPOULOS, A. K.; ANDREADIS, D.; MARKOPOULOS, A. K. Expression of matrix metalloproteinases 9 and 12 in actinic cheilitis. **World J Exp Med**, v. 3, n. 3, p. 43-9, Aug 2013. ISSN 2220-315X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520545>>.

RODRIGUES, P. C. et al. Stromal myofibroblasts in potentially malignant and malignant lesions of the oral cavity. **Oncol Lett**, v. 9, n. 2, p. 667-670, Feb 2015. ISSN 1792-1074. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25621035>>.

SALVADORI, G. et al. Ki-67, TGF- $\beta$ 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. **Tumour Biol**, v. 35, n. 8, p. 7635-44, Aug 2014. ISSN 1423-0380. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798972>>.

SEIFI, S. et al. Myofibroblast stromal presence and distribution in squamous epithelial carcinomas, oral dysplasia and hyperkeratosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 11, n. 2, p. 359-64, 2010. ISSN 1513-7368. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843116>>.

SENA, M. F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 1, p. 93-102, 2010.

SHIMIZU, Y. et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in tongue cancer. **Auris Nasus Larynx**, v. 35, n. 3, p. 381-9, Sep 2008. ISSN 0385-8146. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276095>>.

SOUZA FREITAS, V. et al. Mast cells and matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, n. 3, p. 342-8, Sep 2011. ISSN 1528-395X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612954>>.

SUWABE, H. et al. Degenerative processes of elastic fibers in sun-protected and sun-exposed skin: immunoelectron microscopic observation of elastin, fibrillin-1, amyloid P component, lysozyme and alpha1-antitrypsin. **Pathol Int**, v. 49, n. 5, p. 391-402, May 1999. ISSN 1320-5463. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417681> >.

THODE, C. et al. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 3, p. 201-7, Mar 2011. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21342271> >.

TUMULURI, V. The relationship between cell proliferation and prognosis in oral cancer. **Ann R Australas Coll Dent Surg**, v. 16, p. 158-9, Oct 2002. ISSN 0158-1570. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507167> >.

TUMULURI, V.; THOMAS, G. A.; FRASER, I. S. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 31, n. 10, p. 598-604, Nov 2002. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406305> >.

VERED, M. et al. Stromal myofibroblasts accompany modifications in the epithelial phenotype of tongue dysplastic and malignant lesions. **Cancer Microenviron**, v. 2, n. 1, p. 49-57, Dec 2009. ISSN 1875-2284. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19424824> >.

\_\_\_\_\_. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. **Oral Oncol**, v. 41, n. 10, p. 1028-33, Nov 2005. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139563> >.

VIEIRA, R. A. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 87, n. 1, p. 105-14, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481658> >.

VILEN, S. T. et al. Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 920595, 2013. ISSN 1537-744X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23365550>>.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2003. ISSN 1524-4571. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730128>>.

ZIOBER, B. L. et al. Type I collagen degradation by invasive oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 36, n. 4, p. 365-72, Jul 2000. ISSN 1368-8375. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899676>>.

Tabela 1 – Média e desvio-padrão para todos os anticorpos nas lesões estudadas em tecido epitelial e conjuntivo.

Anticorpo	Tecido	QA (n=30)	CEL (n=30)	MUC (n=20)
MMP-1	Epitélio	92,26% ( $\pm 11,10$ ) <sup>a,b</sup>	83,36% ( $\pm 18,60$ ) <sup>b</sup>	76,91% ( $\pm 27,47$ ) <sup>a</sup>
	Conjuntivo	4,80% ( $\pm 4,24$ )	7,29% ( $\pm 6,21$ ) <sup>c</sup>	3,91% ( $\pm 2,89$ ) <sup>c</sup>
MMP-2	Epitélio	52,28% ( $\pm 24,81$ ) <sup>b</sup>	33,06% ( $\pm 23,33$ ) <sup>b,c</sup>	55,83% ( $\pm 27,33$ ) <sup>c</sup>
	Conjuntivo	1,39% ( $\pm 1,63$ ) <sup>a</sup>	1,91% ( $\pm 1,62$ )	2,47% ( $\pm 1,65$ ) <sup>a</sup>
MMP-9	Epitélio	59,07% ( $\pm 28,84$ ) <sup>b</sup>	35,32% ( $\pm 30,67$ ) <sup>b</sup>	41,68% ( $\pm 38,43$ )
	Conjuntivo	0,19% ( $\pm 0,14$ ) <sup>a,b</sup>	0,84% ( $\pm 0,70$ ) <sup>b</sup>	0,58% ( $\pm 0,76$ ) <sup>a</sup>
Ki-67	Epitélio	19,64% ( $\pm 10,87$ )	24,10% ( $\pm 15,52$ )	21,17% ( $\pm 10,90$ )
$\alpha$ -SMA	Conjuntivo	13,51% ( $\pm 11,43$ )	11,45% ( $\pm 12,25$ )	8,67% ( $\pm 8,27$ )

QA: queilite actínica; CEL: carcinoma epidermóide de lábio; MUC: mucocela.

<sup>a</sup> Relação entre MUC e QA com  $p < 0,05$ .<sup>b</sup> Relação entre QA e CEL com  $p < 0,05$ .<sup>c</sup> Relação entre MUC e CEL com  $p < 0,05$ .



Tabela 2 – Média e desvio-padrão da expressão das proteínas de interesse de acordo com o grau de displasia epitelial em QA.

QA	Tecido	DEL (n=9)	DEM (n=14)	DEI (n=7)
MMP-1	Epitélio	95,19% ( $\pm 4,58$ )	88,87% ( $\pm 14,99$ )	95,25% ( $\pm 5,25$ )
	Conjuntivo	2,84% ( $\pm 1,92$ )	4,88% ( $\pm 3,81$ )	6,18% ( $\pm 5,77$ )
MMP-2	Epitélio	45,24% ( $\pm 16,12$ )	58,20% ( $\pm 24,47$ )	48,52% ( $\pm 33,10$ )
	Conjuntivo	1,34% ( $\pm 1,64$ )	1,29% ( $\pm 1,08$ )	1,58% ( $\pm 2,39$ )
MMP-9	Epitélio	59,11% ( $\pm 28,04$ )	62,39% ( $\pm 31,87$ )	59,11% ( $\pm 28,04$ )
	Conjuntivo	0,12% ( $\pm 0,99$ )	0,22% ( $\pm 0,17$ )	1,77% ( $\pm 1,22$ )
Ki-67	Epitélio	15,92% ( $\pm 8,97$ )	19,98% ( $\pm 12,56$ )	22,59% ( $\pm 9,78$ )
	Conjuntivo	9,44% ( $\pm 10,14$ )	16,82% ( $\pm 11,96$ )	12,11% ( $\pm 11,45$ )

QA: queilite actínica; DEL: displasia epitelial leve; DEM: displasia epitelial moderada; DEI: displasia epitelial intensa.



Tabela 3 – Média e desvio-padrão da expressão das proteínas de interesse de acordo com o grau de diferenciação histopatológica em CEL.

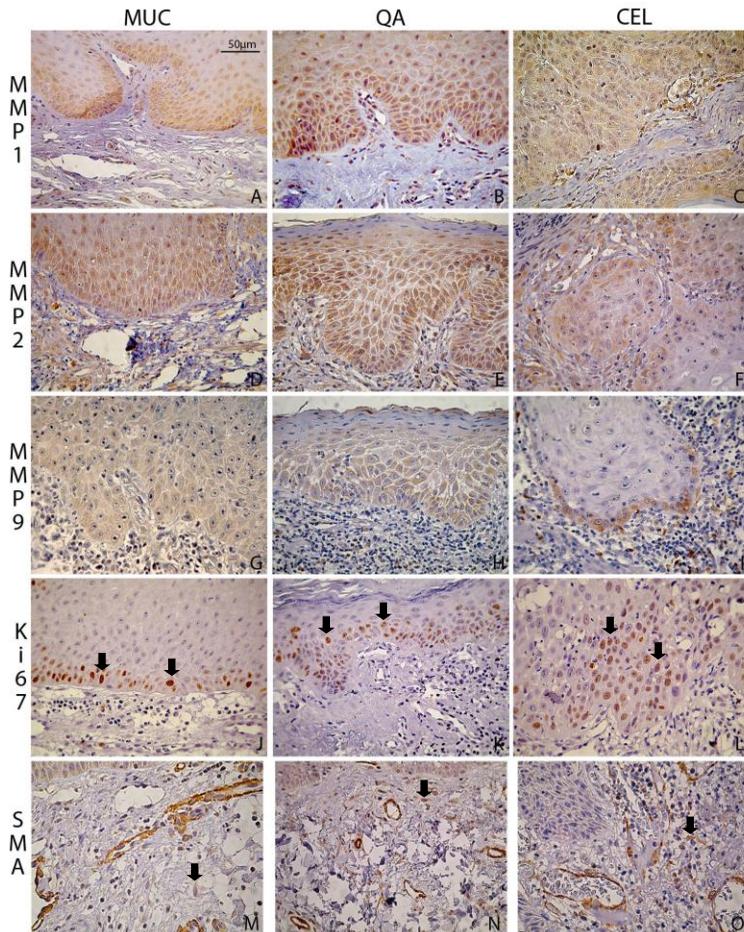
CEL	Tecido	BD (n=12)	MD (n=8)	PD (n=10)
MMP-1	Epitélio	80,86% ( $\pm 23,74$ )	89,58% ( $\pm 9,89$ )	80,46% ( $\pm 17,87$ )
	Conjuntivo	6,28% ( $\pm 3,88$ )	10,32% ( $\pm 8,90$ )	5,57% ( $\pm 4,99$ )
MMP-2	Epitélio	36,60% ( $\pm 23,45$ )	34,46% ( $\pm 30,69$ )	26,91% ( $\pm 14,57$ )
	Conjuntivo	1,91% ( $\pm 1,27$ )	2,40% ( $\pm 2,42$ )	1,41% ( $\pm 0,94$ )
MMP-9	Epitélio	38,03% ( $\pm 29,03$ )	38,07% ( $\pm 38,62$ )	28,94% ( $\pm 26,36$ )
	Conjuntivo	0,73% ( $\pm 0,33$ )	1,05% ( $\pm 1,01$ )	0,75% ( $\pm 1,74$ )
Ki-67	Epitélio	33,82% ( $\pm 17,83$ ) <sup>a</sup>	14,71% ( $\pm 5,16$ ) <sup>a</sup>	21,38% ( $\pm 12,26$ )
	Conjuntivo	6,86% ( $\pm 4,12$ )	10,55% ( $\pm 6,06$ )	18,46% ( $\pm 19,91$ )

CEL: carcinoma epidermóide de lábio; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado.

<sup>a</sup> Relação entre carcinoma BD e MD com  $p < 0,05$ .



Figura 1: expressão imuno-histoquímica das MMP-1, MMP-2 e MMP-9, Ki-67 e  $\alpha$ -SMA em queilite actínica, carcinoma epidermóide de lábio e mucocele (400X). A – I: Marcação das MMPs mais intensa no terço inferior do epitélio e dispersa pelo tecido conjuntivo. J-L: Marcação nuclear de Ki-67 concentrada principalmente em camada basal e parabasal do epitélio de MUC e QA e dispersa nas áreas de invasão de CEL (seta). M-O: Marcação de  $\alpha$ -SMA em MFs presentes no tecido conjuntivo (seta).





## REFERÊNCIAS

- AMÁLINEI, C. et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol**, v. 51, n. 2, p. 215-28, 2010. ISSN 1220-0522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495735> >.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res**, v. 95, n. 3, p. 229-49, Jun 1987. ISSN 0029-845X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3299675> >.
- ANTUNES, A. A.; ANTUNES, A. P. Lips' tumours retrospective study and literature review: a twenty-eight-year experience. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 4, p. 295-300, 2004.
- BARNES, L., EVERSON, J.W., REICHART, P., SIDRANSKY, D. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. 327.
- BARNES, L. et al. **Head and Neck Tumors**. 2005.
- BARROS, S. S. et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 8, p. 752-60, Aug 2011. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21255765> >.
- BIRAJDAR, S. S. et al. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 18, n. 2, p. 169-76, May 2014. ISSN 0973-029X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25328294> >.
- BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 1, p. 46-54, Oct 2001. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900251> >.
- BRASIL, M. D. S. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. INCA, 2014.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, n. 6, p. 489-503, Dec 1990. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2076881> >.
- \_\_\_\_\_. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2-11, Jan 2002. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11903593> >.

CAO, Z.; XIANG, J.; LI, C. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinase-1 in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n. 8, p. 880-5, Aug 2009. ISSN 1399-0020. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372030> >.

CARLSON, E. R. Diagnosis and Management of Salivary Lesions of the Neck. **Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 23, n. 1, p. 49-61, Mar 2015. ISSN 1558-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25707565> >.

CAVALCANTE, A. S.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. Actinic cheilitis: clinical and histological features. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 3, p. 498-503, Mar 2008. ISSN 1531-5053. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280383> >.

CHEN, Y. K. et al. Aberrant expression in multiple components of the transforming growth factor- $\beta$ 1-induced Smad signaling pathway during 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinogenesis. **Oral Oncol**, v. 47, n. 4, p. 262-7, Apr 2011. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356605> >.

COTRIM, P. et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the development of rat first molar tooth germ. **Braz Dent J**, v. 13, n. 2, p. 97-102, 2002. ISSN 0103-6440. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12238810> >.

DAYAN, D.; NASRALLAH, V.; VERED, M. Clinico-pathologic correlations of myofibroblastic tumors of the oral cavity: 1. Nodular fasciitis. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 7, p. 426-35, Aug 2005. ISSN 0904-2512. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011613> >.

DE ARAÚJO, V. C. et al. p53 In biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. **Oral Oncol**, v. 33, n. 1, p. 5-9, Jan 1997. ISSN 1368-8375. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192545> >.

DE VICENTE, J. C. et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 41, n. 3, p. 283-93, Mar 2005. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743691> >.

DESMOULIÈRE, A.; GUYOT, C.; GABBIANI, G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **Int J Dev Biol**, v. 48, n. 5-6, p. 509-17, 2004. ISSN 0214-6282. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15349825> >.

DOS SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **J Cutan Pathol**, v. 30, n. 4, p. 237-41, Apr 2003. ISSN 0303-6987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12680953> >.

EGBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-74, Mar 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990853> >.

ETEMAD-MOGHADAM, S. et al. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n. 8, p. 639-43, Sep 2009. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19473444> >.

EYDEN, B. et al. The myofibroblast and its tumours. **J Clin Pathol**, v. 62, n. 3, p. 236-49, Mar 2009. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930983> >.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol**, v. 133, n. 4, p. 1710-5, Oct 1984. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6206131> >.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. **Oral Oncol**, v. 46, n. 7, p. 525-30, Jul 2010. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400362> >.

GUTIÉRREZ-PASCUAL, M. et al. Squamous cell carcinoma of the lip. A retrospective study of 146 patients. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26, n. 9, p. 1116-21, Sep 2012. ISSN 1468-3083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21923660> >.

HOQUE, M. O.; AZUMA, M.; SATO, M. Significant correlation between matrix metalloproteinase activity and tumor necrosis factor-alpha in salivary extravasation mucocoeles. **J Oral Pathol Med**, v. 27, n. 1, p. 30-3, Jan 1998. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466732> >.

INOMATA, S. et al. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. **J Invest Dermatol**, v. 120, n. 1, p. 128-34, Jan 2003. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535209> >.

KAUGARS, G. E. et al. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 88, n. 2, p. 181-6, Aug 1999. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468463> >.

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 1097-0347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373786> >.

KELLERMANN, M. G. et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. **Oral Oncol**, v. 44, n. 5, p. 509-17, May 2008. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826300> >.

\_\_\_\_\_. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 849-53, Dec 2007. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042073> >.

KUROKAWA, H. et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 9, p. 513-21, Oct 2003. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12969225> >.

LAIMER, K. et al. EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity: frequency and relationship to clinicopathologic features. **Oral Oncol**, v. 44, n. 1, p. 72-7, Jan 2008. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418618> >.

LEE, E.; CHO, S. H.; PARK, C. J. Clinical and immunohistochemical characteristics of mucoceles. **Ann Dermatol**, v. 21, n. 4, p. 345-51, Nov 2009. ISSN 2005-3894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20523822> >.

LIN, L. M.; HUANG, G. T.; ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. **J Endod**, v. 33, n. 8, p. 908-16, Aug 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878074> >.

LIN, M. H. et al. Functional role of matrix metalloproteinase-28 in the oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 42, n. 9, p. 907-13, Oct 2006. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730219> >.

LUNA-ORTIZ, K. et al. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. **Oral Oncol**, v. 40, n. 10, p. 992-9, Nov 2004. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509490> >.

LÚCIO, P. S. et al. Myofibroblasts and their relationship with oral squamous cell carcinoma. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 79, n. 1, p. 112-8, 2013 Jan-Feb 2013.

ISSN 1808-8686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23503917> >.

MA, W. et al. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 26, n. 7, p. 592-599, 2008.

MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Diseases**, v. 10, n. 4, p. 212-216, 2004a. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01004.x> >.

\_\_\_\_\_. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Dis**, v. 10, n. 4, p. 212-6, Jul 2004b. ISSN 1354-523X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196142> >.

MOHTASHAM, N. et al. Immunohistochemical study of p53, Ki-67, MMP-2 and MMP-9 expression at invasive front of squamous cell and verrucous carcinoma in oral cavity. **Pathol Res Pract**, v. 209, n. 2, p. 110-4, Feb 2013. ISSN 1618-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23273944> >.

MORE, C. B. et al. Oral mucocele: A clinical and histopathological study. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 18, n. Suppl 1, p. S72-7, Sep 2014. ISSN 0973-029X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25364184> >.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3a. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002 Jul-Aug 2002. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139232> >.

OUHTIT, A. et al. Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. **Am J Pathol**, v. 156, n. 1, p. 201-7, Jan 2000. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623668> >.

PESCE, C. et al. Tissue repair and remodelling in extravasation mucocele. **Histopathology**, v. 42, n. 5, p. 516-7, May 2003. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713634> >.

PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Exp Cell Res**, v. 316, n. 8, p. 1324-31, May 2010. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211171> >.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. **Int J Cosmet Sci**, v. 27, n. 1, p. 17-34, Feb 2005. ISSN 1468-2494. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492178> >.

POULOPOULOS, A. K.; ANDREADIS, D.; MARKOPOULOS, A. K. Expression of matrix metalloproteinases 9 and 12 in actinic cheilitis. **World J Exp Med**, v. 3, n. 3, p. 43-9, Aug 2013. ISSN 2220-315X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520545> >.

PRADO, B. N.; PASSARELLI, D. H. C. Uma nova visão sobre prevenção do câncer bucal no consultório odontológico. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 79-85, 2009.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia Oral: Correlações clínicopatológicas**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 420.

RODRIGUES, P. C. et al. Stromal myofibroblasts in potentially malignant and malignant lesions of the oral cavity. **Oncol Lett**, v. 9, n. 2, p. 667-670, Feb 2015. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25621035> >.

SALVADORI, G. et al. Ki-67, TGF- $\beta$ 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. **Tumour Biol**, v. 35, n. 8, p. 7635-44, Aug 2014. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798972> >.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 32, n. 3, p. 233-45, Jun 2003. ISSN 0901-5027. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767868> >.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol**, v. 182, n. 3, p. 311-22, Mar 2000. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653597> >.

SEIFI, S. et al. Myofibroblast stromal presence and distribution in squamous epithelial carcinomas, oral dysplasia and hyperkeratosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 11, n. 2, p. 359-64, 2010. ISSN 1513-7368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843116> >.

SENA, M. F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Láblio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 1, p. 93-102, 2010.

SHIMIZU, Y. et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in

tongue cancer. **Auris Nasus Larynx**, v. 35, n. 3, p. 381-9, Sep 2008. ISSN 0385-8146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276095> >.

SILVA, F. D. et al. Prevalence of Lips Pathologies in Fishermen Of Santa catarina Island. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 51, p. 37 - 42, 2006.

SILVERMAN, S.; EVERSOLE, L. R.; TRUELOVE, E. L. **Fundamentos de Medicina Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 384.

SITTEL, C. et al. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncol**, v. 35, n. 6, p. 583-9, Nov 1999. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10705094> >.

SOUZA FREITAS, V. et al. Mast cells and matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, n. 3, p. 342-8, Sep 2011. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612954> >.

SUWABE, H. et al. Degenerative processes of elastic fibers in sun-protected and sun-exposed skin: immunoelectron microscopic observation of elastin, fibrillin-1, amyloid P component, lysozyme and alpha1-antitrypsin. **Pathol Int**, v. 49, n. 5, p. 391-402, May 1999. ISSN 1320-5463. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417681> >.

THODE, C. et al. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 3, p. 201-7, Mar 2011. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21342271> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988769> >.

TUMULURI, V. The relationship between cell proliferation and prognosis in oral cancer. **Ann R Australas Coll Dent Surg**, v. 16, p. 158-9, Oct 2002. ISSN 0158-1570. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507167> >.

TUMULURI, V.; THOMAS, G. A.; FRASER, I. S. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 31, n. 10, p. 598-604, Nov 2002. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406305> >.

VERED, M. et al. Stromal myofibroblasts accompany modifications in the epithelial phenotype of tongue dysplastic and malignant lesions. **Cancer**

**Microenviron**, v. 2, n. 1, p. 49-57, Dec 2009. ISSN 1875-2284. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19424824> >.

\_\_\_\_\_. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. **Oral Oncol**, v. 41, n. 10, p. 1028-33, Nov 2005. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139563> >.

VIEIRA, R. A. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 87, n. 1, p. 105-14, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481658> >.

VILEN, S. T. et al. Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 920595, 2013. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23365550> >.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2003. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730128> >.

ZIOBER, B. L. et al. Type I collagen degradation by invasive oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 36, n. 4, p. 365-72, Jul 2000. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899676> >.

## APÊNDICE A – Metodologia Expandida

### Delineamento de estudo

O estudo proposto é do tipo observacional descritivo, retrospectivo.

### Aspectos legais e éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEPSH), CAAE: 16963413.3.0000.0121 (Anexo A).

### Seleção da amostra

As amostras estudadas foram selecionadas a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC. Foram selecionados, por conveniência, lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) e os blocos de parafina contendo fragmentos de tecido obtido por meio de biópsia incisional ou excisional e diagnosticados como MUC, QA e CEL. As lâminas foram analisadas simultaneamente por três examinadores para determinação do grau de displasia epitelial nas QAs, bem como para determinação do grau de diferenciação histopatológica dos CELs, seguindo os critérios estabelecidos pela OMS (Barnes, 2005). As displasias epiteliais foram classificadas em leves quando a presença de alterações displásicas se restringia somente ao terço inferior do epitélio; moderadas, quando estas alterações eram encontradas até o terço médio; e intensas, quando as alterações displásicas ultrapassavam o terço médio e estendiam-se ao terço superior (Barnes *et al.*, 2005). Os carcinomas foram classificados bem diferenciados (muito similar ao seu epitélio de origem), pouco diferenciada (uma lesão em que predominam células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas, além de mínima ceratinização, tornando muitas vezes, difícil identificar seu tecido de origem) ou moderadamente diferenciada, com características entre esses dois extremos (Anneroth, Batsakis e Luna, 1987; De Araújo *et al.*, 1997; Barnes *et al.*, 2005)

Amostras em que houve discordância entre os examinadores quanto ao diagnóstico histopatológico e amostras em que não foi possível a execução de todas as etapas referente à preparação histológica e à técnica de imuno-histoquímica foram excluídas do trabalho.

Ao final do processo de seleção, os casos foram divididos em: QA, composto por 30 casos de queilite actínica; CEL, composto por 30 casos de carcinoma epidermóide de lábio; e MUC, composto por 20 casos de biopsias oriundas de mucocelos que continham revestimento epitelial. Optou-se pela utilização das mucocelos como fonte de epitélio não-neoplásico devido à inviabilidade de obtenção de fragmentos de lábio normal.

#### Procedimentos laboratoriais

Os procedimentos de imuno-histoquímica foram executados no LPB-UFSC. As amostras foram submetidas ao método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos (Quadro 1) e o controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Controle positivo</b>
<b>MMP-1</b>	Policlonal	DBS	1:300	Placenta
<b>MMP-2</b>	Policlonal	Sigma	1:50	Carcinoma de mama
<b>MMP-9</b>	Policlonal	Sigma	1:250	Medula
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Policlonal	Sigma	1:1000	Vasos sanguíneos
<b>Ki-67</b>	Monoclonal – SP6	Biocare	1:75	Carcinoma epidermóide intra-oral

Quadro 1: Anticorpos utilizados

Das amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina foram obtidos cortes semi-seriados com 3 $\mu$ m de espessura, estendidos em lâminas de vidro preparadas com a solução de 3-aminopropyltriethoxylene (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A desparafinização dos cortes foi realizada mantendo as lâminas em estufa a 65°C, durante 3 horas, seguido de dois banhos em xilol em

temperatura ambiente (TA), o primeiro overnight e o segundo durante 20 minutos. Para a reidratação dos cortes foram realizados 3 banhos em álcool etílico absoluto, 1 banho em álcool etílico 95%, 1 banho em álcool etílico 85% e 2 banhos em água destilada, todos de 5 minutos cada. Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram imersas na solução de peróxido de hidrogênio 3% (90 ml de álcool metílico + 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 20 minutos. A reativação antigênica foi realizada mantendo as lâminas em solução de tampão citrato 0,01M, pH 6,0, em banho-maria durante 40 minutos a temperatura constante de 96°C. Em seguida, a solução tampão com as lâminas foi retirada do banho-maria e aguardou-se até que atingisse a TA. Posteriormente, 2 banhos de 5 minutos em PBS foram realizados. A incubação com os anticorpos primários (Quadro 1) foi realizada em câmara úmida mantida sob refrigeração (4 a 8°C), overnight. Mais 2 banhos de PBS de 5 minutos foram realizados e seguiu-se a incubação com o Kit LSAB (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), composto de anticorpo secundário anti-IgG biotinado durante 30 minutos e complexo estreptavidina-biotina-peroxidase durante mais 30 minutos. Posteriormente, outros 2 banhos de PBS de 5 minutos foram realizados e as lâminas foram submetidas à coloração com a solução cromógena diaminobenzidina-DAB (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), com exposição de cada corte por 2,5 minutos, além de 1 banho em água destilada por 5 minutos e a contracoloração com Hematoxilina de Harris, com exposição de 2,5 minutos. A remoção do pigmento formólico deu-se por rápida imersão das lâminas em solução aquosa de hidróxido de amônia 1%, e subsequente lavagem em água corrente durante 2 minutos. Os cortes foram novamente desidratados com uma sequência de 1 banho em álcool etílico 85%, 1 banho em álcool etílico 95% e 3 banhos em álcool etílico absoluto, durante 5 minutos cada. Por fim, a diafanização deu-se com 2 banhos em xilol durante 20 minutos cada, e a montagem das lâminas foi realizada com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após montadas, as lâminas foram mantidas em estufa (40°C) por no mínimo 24 horas.

### Análise imuno-histoquímica

As lâminas tiveram sua identificação mascarada de forma que a captura das fotomicrografias e a análise da imunorreatividade foi feita por um examinador às cegas quanto ao grupo a que cada lâmina

pertencia. Foram capturados cinco campos equidistantes de cada caso, com aumento de 400x, envolvendo sempre a interface entre epitélio e conjuntivo, por meio de microscópio de luz binocular (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital (A620, Cannon, Lake Success, NY, EUA), e a um microcomputador (HP Compaq 6005, São Paulo, Brasil), onde foram armazenadas as imagens.

A análise da imunorreatividade deu-se por um examinador previamente calibrado e os valores foram registrados em uma planilha do Microsoft Excel (Microsoft Office Corporation, Washington, EUA). Para avaliação, utilizou-se o software para análise de imagens digitalizadas "ImageJ" versão 1.410 (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Para cada anticorpo, em cada caso, foi avaliada a frequência e local de expressão, bem como a análise quantitativa da expressão.

A avaliação da expressão das MMPs -1, -2 e -9, caracterizada pela coloração castanha no citoplasma, foi obtida individualmente no epitélio e tecido conjuntivo. A análise do tecido epitelial foi realizada pela média da porcentagem de células positivas dos 5 campos. Já a análise do tecido conjuntivo deu-se através da média da porcentagem da área marcada (pixels positivos) em relação à área total do tecido conjuntivo de cada campo (pixels totais) das 5 imagens obtidas de cada caso.

Para verificar a presença de MFs foi observada a expressão de  $\alpha$ -SMA nos MFs presentes no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio. A avaliação do antígeno  $\alpha$ -SMA foi realizada através da contagem do total de células positivas por campo, em 5 campos equidistantes para cada caso. Posteriormente, foi calculada a média de células positivas para cada caso, somando-se o total de células positivas em todos os campos e dividindo-se pelo total de campos. Foram consideradas positivas as células que tiveram marcação castanha no citoplasma, excluindo-se as células inflamatórias, células endoteliais e células nas proximidades dos vasos sanguíneos, pois essas células podem interferir nos resultados devido à expressão de  $\alpha$ -SMA.

A avaliação da imunopositividade para Ki-67, caracterizada pela coloração castanha do núcleo nas células epiteliais, foi obtida pela média da porcentagem de células coradas por campo analisado. Para cada caso foram contadas pelo menos 1000 células epiteliais (positivas e negativas) dos 5 campos equidistantes. Posteriormente, foi realizada a média de células positivas para cada caso.

### Calibração do examinador

O examinador responsável pela análise imuno-histoquímica foi submetido a uma calibração, analisando 15 lâminas (cinco de cada grupo), três vezes, com intervalos de uma semana. Os resultados foram comparados para determinação do índice Kappa, que teve valores acima de 0,8.

### Análise estatística

Foi realizada a estatística descritiva para cada variável analisada, e a comparação da expressão dessas variáveis entre os grupos analisados QA, CEL e MLN por meio do teste t não pareado utilizando-se o programa Microsoft Excel (Microsoft Office Corporation, Washington, EUA). Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas ou área corada  $\pm$  desvio-padrão da média (DPM). Considerou-se valor de  $p < 0,05$  para dados com significância estatística.



## ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP SH

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DOS FENÔMENOS DE PROLIFERAÇÃO E INVASÃO TECIDUAL EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO

**Pesquisador:** Filipe Modolo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 16963413.3.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 725.665

**Data da Relatoria:** 21/07/2014

#### Apresentação do Projeto:

**\*AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ -2 E -9 EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO\*.** Projeto que visa estudar a presença das MMPs -2 e -9 na queilite actínica (QA), uma lesão potencialmente malignizável, ou seja, que apresenta um risco aumentado de apresentar crescimento celular desordenado e transformação em câncer. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de cálcio e zinco, que desempenham funções em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embrionário, morfogênese do tecido, reparo de feridas, doenças inflamatórias e câncer. Em condições patológicas a expressão das MMPs pode apresentar-se alterada.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário é investigar o papel das metaloproteinases de matriz (MMPs) -2 e -9 no comportamento biológico de 30 casos de QA e 30 casos de CEL diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) em comparação com 20 casos de mucosa labial normal (MLN) oriundos de biópsias de mucocel.

Secundariamente: - promover o levantamento de 30 casos de QA e 30 casos de CEL diagnosticados no (LPB-UFSC); - avaliar a expressão imunohistoquímica das proteinases de matriz

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-0206 Fax: (48)3721-0696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 725.005

do MMPs -2 e -9 em QAs, evidenciando a localização e a Intensidade de marcação; -avaliar a expressão Imunistoquímica das MMPs -2 e -9 em CELs, evidenciando a localização e a Intensidade de marcação; - avaliar a expressão do carcinoma epidermóide de lábio (CEL) uma enfermidade de grande importância no Brasil, um país tropical com elevada incidência de radiação ultravioleta (UV), onde a população sofre constante exposição solar tanto na área rural quanto urbana, devido principalmente à sua ocupação profissional.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores não existe risco para os sujeitos da pesquisa, uma vez que o estudo será executado em material anteriormente biopsado e armazenado no Laboratório; e como benefícios indireto, um melhor entendimento das doenças pesquisadas, levando a melhorias na prevenção, tratamento e prognóstico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata o presente de uma Emenda do Projeto de pesquisa PIBIC/UFSC de uma aluna do Curso de Odontologia da UFSC "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ -2 E -9 EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO". O projeto original incluía somente as MMP-2 e 9, as duas metaloproteinases consagradas na literatura como as principais envolvidas na progressão neoplásica. No entanto, durante a análise dos resultados prévios observou-se que seria necessário incluir a MMP-1, pois descobriu-se que esta participa ativamente dos processos de invasão neoplásica juntamente com as MMPs-2 e -9, e também incluir a localização imunistoquímica das principais células produtoras de MMPs, os miofibroblastos (MF), por meio da imunistoquímica utilizando o anticorpo anti-actina de músculo liso. Finalmente concluiu-se que seria pouco proveitoso estudar proteínas relacionadas a invasão tecidual sem fazer a correlação com o nível de proliferação celular que as lesões exibem (afinal a invasão não aconteceria sem a proliferação exacerbada), a ser estudada por meio da imunistoquímica com o anticorpo ki67. Seguro de que esse grupo de 5 anticorpos resultara num panorama de resultados muito mais valioso e seguro, aumentando o valor científico do trabalho. Um novo TCLE, respeitando na íntegra a Resolução CNS nº466/12 foi apresentado para obtenção da autorização de uso do material anteriormente coletado. Assim, recomendamos a aprovação desta Emenda.

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-0208 Fax: (48)3721-0698 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 725.605

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não se aplica.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram detectadas pendências ou Inadequações nesta Emenda.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 23 de Julho de 2014

Assinado por:

Washington Portela de Souza  
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Rector João David Ferreira Lima  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-0206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br



## ANEXO B – Guia de Informações ao Autor



### ORAL ONCOLOGY

A Journal Related to Head & Neck Oncology

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.5



ISSN: 1368-8375

#### DESCRIPTION

*Oral Oncology* is an international interdisciplinary journal which publishes high quality original research, clinical trials and review articles, editorials, and commentaries relating to the etiopathogenesis, epidemiology, prevention, clinical features, diagnosis, treatment and management of patients with **neoplasms** in the **head and neck**.

*Oral Oncology* is of interest to head and neck surgeons, radiation and medical oncologists, maxillo-facial surgeons, oto-rhino-laryngologists, plastic surgeons, pathologists, scientists, oral medical specialists, special care dentists, dental care professionals, general dental practitioners, public health physicians, palliative care physicians, nurses, radiologists, radiographers, dieticians, occupational therapists, speech and language therapists, nutritionists, clinical and health psychologists and counselors, professionals in end of life care, as well as others interested in these fields.

Basic, translational, or clinical Research or Review papers of high quality and that make a contribution to new knowledge are invited on the following aspects of neoplasms arising in the head and neck (including lip, tongue, oral cavity, oropharynx, salivary glands, sinuses, nose, nasopharynx, larynx, skull base, thyroid, and craniofacial region, and the related hard and soft tissues and lymph nodes):

- **Etiopathogenesis:** natural history of cancer and pre-cancer; basic pathology, metastatic mechanisms; genetic changes; cellular and molecular changes; microorganisms; growth factors, adhesion and other molecules
- **Epidemiology;** risk factors; biomarkers; protective factors; geographic factors; prevention; screening and intervention
- Clinical features; **orofacial** effects of neoplasms at both local and distant sites; tumor staging and grading
- Diagnosis; **detection of cancer** and pre-cancer; cellular and molecular markers for diagnosis; advances in **imaging** and other functional diagnostic modalities for cancer and pre-cancer
- **Management and Prognosis;** clinical, cellular and molecular markers for prognosis; **treatment** options including surgical, lasers, photodynamic therapy, cryosurgery, micro-vascular and other forms of surgery, medical, radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy, biological and gene therapy advances; molecular targets and new therapeutics (new cytotoxics and molecular-targeted therapies); multimodality treatment; advances in reconstruction and rehabilitation, including flaps and grafts, alloplasty, bone and connective tissue biology; multidisciplinary teamwork in cancer care and **oral health care**.
- Quality of life issues; issues of consent; psychosocial aspects; patient and health professional information; patient involvement; psychological interventions, improving outcomes; the prevention,

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### *Types of paper*

Oral Oncology accepts the following article types for publication:

#### **Editorial:**

Authors who are considering submitting an editorial should contact the Editor-in-Chief with a brief outline of the proposed contribution before submission. Editorials are welcome on any topic; however, they may also be related to work previously published in Oral Oncology. Editorials have no abstract and no keywords, and are usually restricted to 1500 words, up to 10 references and up to 2 tables or figures if not agreed otherwise with the Editor-in-Chief. The Editor-in-Chief can be contacted at [ooncology@elsevier.com](mailto:ooncology@elsevier.com).

#### **Original Research Articles:**

Original research articles which have not been published previously, except in a preliminary form, may be submitted as original full length research papers. Research articles must contain an abstract, a list of up to ten keywords, and are limited to 3,500 words in length.

#### **Review Articles:**

Review articles which are topical and are a critical assessment of any aspect of head and neck are welcome. Review articles must contain an abstract, a list of up to ten keywords, and are limited to 5,000 words in length. Authors whose manuscripts exceed 5,000 words are advised to contact the Editorial Office prior to submission ([ooncology@elsevier.com](mailto:ooncology@elsevier.com)).

#### **Letters to the Editor:**

Letters to the Editor relating to published work in Oral Oncology are welcome. Letters should be closely related to the contents of the article they refer to. No other (unrelated) letters will be considered for publication.

After reading the Guide for Authors, please visit our online submission system to submit your manuscript: <http://ees.elsevier.com/oo>.

#### *Page charges*

This journal has no page charges.

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

#### *Human and animal rights*

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

#### *Conflict of Interest*

By means of a "Conflict of interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, please state "None declared". This document should be found as a separate page within the manuscript and placed directly below the title page.

#### *Role of the Funding Source*

All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text.

#### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible

authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossRef <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

#### **Authorship and acknowledgments**

All authors must meet the ICMJE authorship criteria ([http://www.icmje.org/ethical\\_1author.html](http://www.icmje.org/ethical_1author.html)). The corresponding author must submit a completed Author Form with their revised submission if the manuscript makes it through the peer review process. The form must be signed by the corresponding author on behalf of all authors and can be scanned and uploaded to EES. If you are unable to upload your Author Form to EES, please contact the Editorial Office ([oncology@elsevier.com](mailto:oncology@elsevier.com)) for further information. No subsequent change in authorship will be possible.

#### **Reporting clinical trials**

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram can be found on <http://www.consort-statement.org>.

#### **Registration of clinical trials**

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, <http://www.icmje.org>) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

#### **Article transfer service**

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

#### **Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

##### *For subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

##### *For open access articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

**Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.  
Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

**Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

**Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

**Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

**Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

**Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### **Informed consent and patient details**

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the *Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals*, <http://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

#### **Submit your article**

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/oo>.

### **Referees**

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

### **Online-only publication**

Oral Oncology offers authors the opportunity to select online-only publication as their preferred option for publishing original research papers in the journal, rather than print publication. Letters to the Editor which are accepted for publication and errata and corrigenda will be published online-only and will not appear in print.

Any material which is published online-only will be published online on ScienceDirect as paginated and fully citable electronic article. It will be listed in the contents page of a printed issue and the full citation and abstract will be published in print. The citation and abstract of the paper will also still appear in the usual abstracting and indexing databases, including PubMed/Medline, Current Contents/Clinical Medicine and the Science Citation Index.

Authors will be asked to select which publication option they would prefer when submitting their paper to the Editorial Office.

### **Prior to Submission**

Oral Oncology will consider manuscripts prepared according to the guidelines adopted by the International Committee of Medical Journal Editors ("Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals", available as a PDF from <http://www.icmje.org>). Authors are advised to read these guidelines.

## **PREPARATION**

### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each

individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class `elsarticle.cls` (<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography. For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see <http://www.elsevier.com/latex>.

### Article structure

#### Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

#### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### Results

Results should be clear and concise.

#### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract of no more than 250 words is required. The abstract must be **structured for original research articles and articles reporting the results of clinical trials**. The abstract should be divided by subheadings as follows: Objectives, Materials and Methods, Results and Conclusion.

The abstract **should not be structured for review articles**. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### Keywords

Immediately after the abstract provide a maximum of ten keywords, to be chosen from the Medical Subject Headings from Index Medicus. These keywords will be used for indexing purposes. It is usually necessary to include keywords such as Oral Cancer, or Head and Neck cancer.

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

##### Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

*Non-electronic artwork*

Provide all illustrations as high-quality printouts, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly mark all illustrations on the back (or - in case of line drawings - on the lower front side) with the figure number and the author's name and, in cases of ambiguity, the correct orientation. Mark the appropriate position of a figure in the article.

*Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

**Illustration services**

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

*Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

**Table footnotes**

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

**Figure Captions, Tables, Figures and Schemes**

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file.

## References

### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

### Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

### Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### Reference style

**Text:** Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

**List:** Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

### Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Henraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

### Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

### Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the

link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

##### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

#### **Word limits**

Original research articles submitted to the journal must be 3,500 words in length or less (excluding the abstract, keywords, references, tables and figures). Review articles submitted to the journal must be 5,000 words or less in length (excluding the abstract, keywords, references, tables and figures).

#### **Presentation of Manuscript**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Language Polishng

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions: [http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws\\_home/termsconditions](http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions)

Provide the following data on the title page:

**Title:** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

**Author names and affiliations:** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

**Corresponding Author:** Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

**Present/permanent address:** If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## AFTER ACCEPTANCE

### *Use of the Digital Object Identifier*

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### *Online proof correction*

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### *Offprints*

The corresponding author, at no cost, will be provided with 25 free paper offprints, or, alternatively, a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, more paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop

(<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

#### **AUTHOR INQUIRIES**

You can track your submitted article at [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/89/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/).

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>