

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/02/2020.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Heitor Albergoni da Silveira

**Caracterização imunoistoquímica comparativa de subgrupos de células
dendríticas e oncogênese viral no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo**

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Heitor Albergoni da Silveira

Caracterização imunoistoquímica comparativa de subgrupos de células dendríticas e oncogênese viral no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração: Diagnóstico e Cirurgia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para o título de Mestre em Ciências Odontológicas.
Orientador: Jorge Esquiche León

Araraquara

2020

Silveira, Heitor Albergoni da

Caracterização imunoistoquímica comparativa de subgrupos de células dendríticas e oncogênese viral no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo / Heitor Albergoni da Silveira. - Araraquara: [s.n.], 2020
88 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

1. Carcinoma de células escamosas 2. Boca 3. Orofaringe
4. Papillomaviridae 5. Imuno-histoquímica 6. Células dendríticas I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Heitor Albergoni da Silveira

Caracterização imunoistoquímica comparativa de subgrupos de células dendríticas e oncogênese viral no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência Odontológicas

Presidente e orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

3º Examinador: Profa. Dra. Ana Terezinha Marques Mesquita

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES

Heitor Albergoni da Silveira

NASCIMENTO: 20/06/1995 – Bernardino de Campos, São Paulo, Brasil

FILIAÇÃO: Ademilson Andrei da Silveira e Isabel Cristina Albergoni

2013-2016: Graduação em Odontologia, Universidade do Sagrado Coração, Bauru, São Paulo.

2017-2018: Aprimoramento em Estomatologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo.

2018-2020: Mestrado em Ciências Odontológicas – área de concentração: Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo.

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Heitor Albergoni da Silveira

**Caracterização imunoistoquímica comparativa de subgrupos de células
dendríticas e oncogênese viral no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo**

Orientador: Prof (a) Dr (a) Jorge Esquiche León

Assinatura Orientador (a):

Assinatura Aluno (a):

Araraquara, 19 de Fevereiro de 2020 .

Dedico esse trabalho à minha vózinha Josefa (in memorian)

Te amarei todos os dias da minha vida

AGRADECIMENTOS

À **Deus** em primeiro lugar, por sempre me iluminar e me dar proteção nos momentos mais difíceis da minha vida, sem Ele esse sonho não seria possível.

Aos meus avós **Osmar** e **Elza**, obrigado por tanto amor e carinho. Vocês são meus maiores exemplos.

Aos meus pais **Ademilson** e **Isabel Cristina** por sempre me apoiarem em todas minhas decisões, por não medirem esforços para me ajudar. Agradeço imensamente por todo amor e suporte. Gratidão e amor eterno por vocês.

À minha irmã **Amanda**, por toda amizade e cumplicidade, me acompanhou em todos os momentos bons e nem tão bons da vida e sempre esteve do meu lado me apoiando em todas as minhas decisões, e obrigado também por nos dar o presente mais lindo que é a **Isabela**. Amo muito vocês duas!

Ao meu orientador Prof. Dr. **Jorge Esquiche León**, obrigado por toda a paciência e amizade que construímos no decorrer desses anos, por toda a disponibilidade e vontade em me ensinar e me forçar a ser cada dia melhor, agradeço imensamente a confiança depositada em mim para o desenvolvimento desse projeto. Minha eterna admiração e gratidão.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representada pelo digníssimo Diretor Prof. Dr. **Edson Alves de Campos**.

À Profa. Dra. **Andreia Bufalino**, por ser um exemplo de profissional e por ser tão solícita a todos nós alunos da área do Diagnóstico bucal, sem a sua ajuda tudo seria mais difícil.

Aos meus grandes amigos **Darcy Fernandes**, **Vinicius Krieger Costa Nogueira** e **Igor Paulino Soares**, obrigado por toda irmandade nessa jornada, por todas as risadas e todo carinho. Levarei vocês sempre comigo.

À minha dupla de Pós-Graduação, **Camila de Oliveira Barbeiro** pela amizade e parceria por dividir todos esses momentos do mestrado comigo.

A todas as professoras da disciplina de Estomatologia, **Elaine Maria Sgavioli Massucato, Mirian Onofre, Claudia Maria Navarro e Luciana Yamamoto de Almeida.**

Aos meus amigos da Pós-Graduação, **Evânio Vilela da Silva, Tulio Morandin Ferrisse, Maria Leticia Lança, Larissa Natiele Miotto e Audrey Foster Lefort Rocha.**

A FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/12734-2) pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio financeiro (Processo nº 2016/11419-0).

Silveira HA. Caracterização imunoistoquímica comparativa de subgrupos de células dendríticas e oncogênese viral no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço (CECCP) é o quinto tipo de câncer mais comum e a sexta causa de morte por câncer. Recentes estudos enfatizam o CEC oral (CECO) como uma entidade distinta do CEC de orofaringe (CECorof), com este último apresentando melhor prognóstico e estreitamente associado com infecção pelo papilomavírus humano (HPV). A etiologia do CECCP é multifatorial; porém, o CECO está relacionado com abuso do tabaco e álcool, enquanto o CECorof está frequentemente associado com infecção pelo HPV. As células dendríticas (CDs) são importantes células as quais regulam repostas imunes, incluindo aquelas vinculadas à tumorigênese, estabelecendo conexão entre o sistema imune inato e adaptativo. Estão divididas em dois grupos: CDs mielóides (CDmi) e CDs plasmocitóides (CDp), incluindo CDs imaturas (CDim) e CDs maduras (CDm). O objetivo do nosso estudo foi analisar comparativamente, através da técnica de imunoistoquímica (IQ) e hibridização in situ (HIS), a infiltração de CDmi e CDp, incluindo subgrupos de CDim e CDm, no CECO (n=109) e CECorof (n=126), bem como analisar a oncogênese viral (HPV amplo espectro, alto risco (ARHPV) e baixo risco (BRHPV) oncogênico e vírus Epstein-Barr [VEB]) por HIS. O CECorof (25%) comparado com o CECO (11%) mostrou associação significativa com o HPV. No CECorof e no CECO, 19 e 7 mostram positividade para ARHPV (somente), 6 e 3 BRHPV (somente) e 3 e 2 ARHPV/BRHPV (co-infecção), respectivamente. Os tumores HPV-positivos comparados com os HPV-negativos apresentaram índice proliferativo significativamente maior através dos marcadores Ciclina D1 e Ki-67. O CECO associado ao ARHPV e ao BRHPV apresentou maior taxa de sobrevida global. No geral, os marcadores para imDC, foram significativamente mais frequentes no CECorof do que no CECO. Diferentemente, CECO e CECorof apresentaram maior número de marcadores de CDs submucosas (CDsub). Ambas as neoplasias apresentaram quantidades semelhantes de CDp ativadas. O grupo HPV+ mostrou um número maior de CDs em ambas as neoplasias do que o grupo HPV-. Vale ressaltar que um número significativamente maior de células CD207+ e CD123+ foi observado no CECorof HPV+ do que no CECO HPV+. Concluímos que diferente do CECO, nossos resultados mostram no CECorof predominância de CDim, com perfil de ativação de células imunes. A presença do HPV parece mostrar associação com a infiltração de CDs em ambas as neoplasias, sugerindo respostas imunes antivirais no CECorof HPV+.

Palavras – chave: Carcinoma de células escamosas. Boca. Orofaringe. Papillomaviridae. Imuno-histoquímica. Células dendríticas.

Silveira HA. Comparative immunohistochemistry characterization of subgroups of dendritic cells and viral oncogenesis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (SCC) (HNSCC) is the fifth most common type of cancer and the sixth leading cause of cancer death. Recent studies emphasize oral SCC (OSCC) as an entity distinct from oropharyngeal SCC (OPSCC), with the latter having a better prognosis and closely associated with human papillomavirus (HPV) infection. The etiology of HNSCC is multifactorial; however, OSCC is related to tobacco and alcohol abuse, while OPSCC is often associated with HPV infection. Dendritic cells (DCs) are important cells that regulate immune responses, including those linked to tumorigenesis, establishing a connection between the innate and adaptive immune systems. They are divided into two groups: myeloid DCs (myCD) and plasmacytoid DCs (pDC), including immature DCs (imDC) and mature DCs (mDC). The aim of our study was to comparatively analyze, through the immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH) technique, the infiltration of myCD and pDC, including subgroups of imDC and mDC, in the OSCC (n= 109) and OPSCC (n= 126), as well as analyzing viral oncogenesis (wide-spectrum HPV, high-risk (HRHPV) and low-risk (LRHPV) oncogenic and Epstein-Barr virus [EBV]) by ISH. OPSCC (25%) compared to OSCC (11%) showed a significant association with HPV. In OPSCC and OSCC, 19 and 7 shows positivity for HRHPV (only), 6 and 3 LRHPV (only) and 3 and 2 HRHPV/LRHPV (co-infection), respectively. HPV-positive tumors compared to HPV-negative tumors showed a significantly higher proliferative index through the cyclin D1 and Ki-67 markers. The OSCC associated with HRHPV and LRHPV had the highest overall survival rate. Overall, markers for imDC were significantly more frequent in OPSCC than in OSCC. In contrast, OSCC and OPSCC had a higher number of subDC markers. Both neoplasms showed similar amounts of activated pDC. The HPV group showed a greater number of DCs in both neoplasms than the HPV-. It is noteworthy that a significantly higher number of CD207+ and CD123+ cells was observed in HPV-associated OPSCC than in HPV-associated OSCC. We concluded that unlike OSCC, our results show a predominance of imDCs, with an activation profile of immune cells, in OPSCC. The HPV status seems to show an association with the infiltration of DCs in both neoplasms, suggesting antiviral immune responses in the OPSCC associated with HPV.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Mouth. Oropharynx. Papillomaviridae. Immunohistochemistry. Dendritic cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
1.1 Carcinoma Espinocelular da Região de Cabeça e Pescoço:	
Epidemiologia	09
1.2 Fatores de Risco para o CECO e CECorof	10
1.3 Características Clinicopatológicas	11
1.3.1 Características clinicopatológicas do CECO	11
1.3.2 Características clinicopatológicas do CECorof.....	11
1.4 Prognóstico	13
1.5 Tratamento	13
1.6 Sistema Imune, Células Dendríticas e Oncogênese	14
1.6.1 Sistema imune.....	14
1.6.2 Células dendríticas.....	15
1.6.3 Células dendríticas da mucosa oral (CDMO)	16
1.6.3.1 Células de Langerhans (CLs) e células dendríticas submucosas (CDsub).....	16
1.6.3.2 Células dendríticas plasmocitóides	18
2 PROPOSIÇÃO	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 PUBLICAÇÃO	20
3.1 Publicação 1	20
3.2 Publicação 2	49
5 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma Espinocelular da Região de Cabeça e Pescoço: Epidemiologia

O carcinoma espinocelular (CEC) da região de cabeça e pescoço (CECCP) é um grupo heterogêneo de neoplasias malignas provenientes da superfície mucosa da cavidade oral, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, laringe, seios paranasais e pele¹. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017)², tem classificado o CEC oral (CECO) e CEC de orofaringe (CECorof) como duas neoplasias distintas, principalmente devido as suas particularidades anatômicas de cada região, na prevalência de infecção pelo HPV e especialmente por diferenças no prognóstico entre estes dois tumores².

Para o Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA)³, estimam-se 11,200 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 3,500 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição; e de 3,28 para cada 100 mil mulheres, sendo o 12º mais frequente entre todos os cânceres³. Além disso, estimam-se 6,390 casos novos de câncer de laringe em homens e 1,280 em mulheres para cada ano do biênio 2018- 2019. O risco estimado será de 6,17 casos a cada 100 mil homens, ocupando a oitava posição; e a 16ª mais frequente com 1,20 casos a cada 100 mil mulheres³.

O CECO é considerado a sexta neoplasia epitelial maligna mais comum⁴. São tumores com comportamento clínico agressivo, apresentando altas taxas de morbimortalidade, apesar dos significativos avanços nos protocolos terapêuticos alcançados nas últimas décadas⁵. Os homens são afetados em maior proporção quando comparado com as mulheres, podendo ser precedidas por desordens potencialmente malignas (DPMs), dentre elas estão a leucoplasia oral (LO), leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), eritroplasia, incluindo ainda a fibrose submucosa, anemia fanconi e disqueratose congênita⁶. O CECO compreende aproximadamente 90-95% das lesões malignas que atingem a cavidade oral⁷. Aproximadamente, entre 10-30% dos casos de CECO apresentam infecção pelo HPV¹, com uma taxa de sobrevida geral em 5 anos de 50%⁸. Diferentemente, mais de 70% dos casos de CECorof estão associados com infecção pelo HPV, a

maioria deles (87%) positivos para HPV de alto risco (HPV16/18), sendo a taxa de sobrevida geral em 5 anos de 75-80%⁹⁻¹².

1.2 Fatores de Risco para o CECO e CECorof

A etiologia do CECCP é considerada multifatorial, mas está intimamente relacionada com o abuso do tabaco e álcool e a infecção pelo HPV, especialmente o tipo 16/18, que representam os subtipos de HPV de alto risco oncogênico^{13,14}. O consumo do tabaco e álcool parece ser dose/dependente e tempo/dependente e a combinação desses dois fatores leva ao efeito sinérgico, aumentando as chances de desenvolvimento do CEC^{7,15,16}. O tabaco foi considerado pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)*¹⁷ como um agente cancerígeno do grupo 1, que indica alto risco¹⁷. Outros fatores de risco vêm sendo investigados, tais como a desnutrição geral¹⁸, o baixo nível socioeconômico e uma higiene oral precária^{19,20}. Notavelmente, o fator de risco mais frequentemente associado com o CECorof HPV+ foi o comportamento sexual e para o CECorof HPV- foi o consumo de álcool e tabaco².

Existem mais de 200 tipos de HPV identificados, os quais são classificados em grupo de alto ou baixo risco, de acordo com o seu potencial tumorigênico^{21,22}. O HPV é um pequeno vírus de DNA com tropismo específico para o epitélio escamoso. Em uma infecção persistente, a proteína E2 viral controla rigorosamente a expressão das principais oncoproteínas virais E6 e E7. Estas proteínas são os principais impulsionadores da tumorigênese por inativação de duas importantes moléculas supressoras de tumores, proteína retinoblastoma (pRb) e p53. A inibição das proteínas supressoras de tumores p53 e pRb altera as vias do ciclo celular que regulam a proliferação celular, a apoptose, bem como a estabilidade genética, o que pode levar à formação de lesões epiteliais¹.

Interessantemente, o CECorof afeta preferencialmente uma população mais jovem, não fumante e que não consomem álcool¹³. Além disto, o CEC orof HPV+ mostra uma resposta mais eficiente aos tratamentos anti-neoplásicos, principalmente a radioterapia, quando comparados com CEC orof HPV-^{7,23,24}. Com base em estudos envolvendo infecção cervical pelo HPV, a maioria dos indivíduos infectados terá um curso assintomático, com a liberação do vírus ocorrendo em 90% deles dentro de 1 ou 2 anos, já os outros 10% terão infecção persistente e um

risco aumentado em desenvolver câncer. Destes 10%, cerca de metade destes casos desenvolverá neoplasia maligna²⁵.

Assim, diante do exposto, é evidente que vários estudos mostram que o CECO e CECorof apresentam etiopatogenia, características clínicas, fatores de risco, protocolos terapêuticos e prognóstico diferentes^{7,26}.

1.3 Características Clinicopatológicas

1.3.1 Características clinicopatológicas do CECO

O CECO pode apresentar diversas formas clínicas variando de uma placa branca até lesões ulcerativas, exofíticas, com bordas elevadas e base endurecida. Nas fases iniciais é assintomática e, posteriormente com o avanço da doença, podem-se observar sinais e sintomas de desconforto, como dor e mobilidade reduzida da língua. A região de maior acometimento na cavidade oral é a língua, soalho e mucosa jugal^{2,27,28}.

O exame histopatológico do CECO mostra proliferação atípica das células epiteliais, seguindo um percurso de invasão do tecido conjuntivo. Pérolas de queratina, pleomorfismo celular, figuras de mitoses atípicas são frequentemente observadas, aumentando com o grau histológico do tumor²⁹. A classificação do grau de diferenciação do CECO segue os critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), podendo ser bem diferenciados (grau I), moderadamente diferenciados (grau II) e pobremente diferenciados (grau III). Algumas vezes são necessários estudos complementares como a IQ, HIS e/ou genética molecular, para estabelecer o grau de diferenciação e tipo histopatológico².

1.3.2 Característica clinicopatológicas do CECorof

Os tumores que atingem a região de orofaringe são frequentemente encontrados na base da língua, região tonsilar e palato mole, clinicamente se apresentando como massas ulceradas ou extensas ulcerações delimitadas por mucosa eritematosa e irregular. Os principais sintomas relatados por pacientes com CECorof incluem dor de garganta e disfagia⁷.

Histologicamente, a orofaringe apresenta epitélio escamoso, tecido linfóide e glândulas salivares menores, o que acaba possibilitando o desenvolvimento de diferentes tipos histológicos de neoplasias. Nessa região, aproximadamente 90-95% dos tumores malignos são CEC. Interessantemente, os CECorof HPV+ surgem do epitélio das criptas ou reticular o qual reveste as criptas tonsilares. O tumor prolifera envolvendo o revestimento epitelial de superfície, sendo a displasia epitelial raramente identificada. Os ninhos tumorais infiltrativos são frequentemente incorporados no estroma linfático e podem ser permeados por células linfóides. As células tumorais apresentam uma alta taxa mitótica e/ou apoptótica, sendo que a sua morfologia lhe confere uma aparência basalóide. A classificação histopatológica do CECorof inclui CEC convencionais tais como ceratinizante, não ceratinizante e híbrido, e variantes tais como basaloide, papilar e linfoepitelial, entre outros^{30,31}. Interessantemente, existem trabalhos considerando que o CECorof HPV+, pelo comportamento clínico e prognóstico, pode ser melhor considerado como um CEC bem diferenciado, apesar da aparência imatura e da falta de produção de queratina^{30,31}.

Em relação à infecção por HPV em CECorof deve se levar em consideração a região geográfica em que o estudo é realizado, trabalhos com população norte americana mostraram resultados de positividade do HPV nessas neoplasias em uma porcentagem de 54,7%, enquanto na América central e do Sul esses valores representaram 14,9%, evidenciando um perfil de baixa infecção pelo HPV. Os continentes da Ásia, Oceania e Europa demonstraram taxas de positividade para o vírus de 45%, 42.1% e 36.2%, respectivamente. Segundo uma revisão sistemática realizada por Ndiaye et. al.³² (2014). Trabalhos realizados com a população brasileira mostra que a associação entre o CECorof e o HPV representam de 5,6% a 25,6%, sendo semelhante aos achados de países como Cuba (15.4%), Tailândia (14.5%) e Polônia (10.7%)³³⁻³⁸.

O vírus Epstein-Barr (VEB) também demonstra um potencial carcinogênico, estando associado com CEC nasofaringe e linfoma não-Hodgkin³⁹. Szkaradkiewicz et al.³⁹ (2002) realizaram um estudo para identificação de VEB-DNA em amostras de CECorof, e revelou uma taxa de 86% mostraram positividade para o VEB, sugerindo que as persistências desse vírus nas células orofaríngeas, sob

condições genéticas e ambientais, podem promover a carcinogênese³⁹. No entanto, neste estudo, não foi realizado HIS (em tecidos) para a detecção do VEB.

No presente estudo, diferentemente do estudo de Szkaradkiewicz et al.³⁹ (2002), avaliamos por HIS (EBER) todos os CECCP incluídos na amostra, focando especialmente resultados nos CECs indiferenciados HPV-.

1.4 Prognóstico

Atualmente os tumores primários de cavidade oral e orofaringe são classificados segundo o sistema de estadiamento clínico, proposto pelo Comitê Americano de Câncer (*American Joint Committee on Cancer – AJCC*), conhecido com TNM, o qual leva em consideração o tamanho do tumor primário (T), linfonodos envolvidos (N) e metástase a distância (M)⁷. Tal classificação tem sido utilizada como ferramentas no estabelecimento do tratamento e prognóstico destes tumores. Contudo, o CECorof HPV+ parece apresentar um prognóstico mais favorável quando comparado com o CECorof HPV- e CECO associado ao uso de tabaco e/ou álcool, mesmo quando existe o comprometimento de linfonodos regionais^{7,40,41}. Assim, tem sido sugerido que se faça parte do estadiamento clínico a história do uso de tabaco e/ou álcool e a presença de HPV^{7,40}.

De forma geral, o CECO é agressivo e apresenta propensão à invasão local e metástase para linfonodos; sendo que a presença de características histopatológicas como padrão de invasão não coesivo, invasão perineural e linfovascular, revelam um pior prognóstico. Além disso, os indivíduos fumantes e etilistas apresentam um risco 20 vezes maior para o desenvolvimento de recidivas ou segundos tumores primários na cavidade bucal ou no trato aerodigestivo quando comparados aos indivíduos não fumantes e não etilistas, especialmente, quando mantêm o consumo de tabaco e álcool após o diagnóstico do tumor primário^{42,43}.

1.5 Tratamento

O tratamento do CECO e CECorof deve ser planejado a partir do seu estadiamento clínico. As lesões primárias de orofaringe têm como tratamento indicado a cirurgia e a radioterapia isoladas, e as lesões mais avançadas exigem

combinações das terapias anti- neoplásicas como cirurgia seguida de radioterapia ou radioterapia inicial e quimioterapia concomitante⁷. Estudos mostram que a radioterapia isolada em CECorof HPV+ tem melhor resultado quando comparado com o CECorof HPV-^{9,44,45,46,47}. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo *in vivo*, o qual mostrou que os CECs HPV+ foram mais sensíveis à radioterapia e quimioterapia em camundongos imunocompetentes, quando comparados com CECs HPV-^{23,48}. Outros estudos mostraram também que o CECorof HPV+ tem uma melhor resposta à radioterapia, e sugerem que essa característica pode estar associada à imunovigilância vírus-específica e à ausência de campos cancerizáveis e não exclusivamente ao fato dessas lesões serem mais radiosensíveis^{9,44}.

O tratamento do CECO é planejado de acordo com o seu estadiamento clínico. Geralmente, esses tumores se apresentam em estágios avançados devido à demora do paciente na busca do tratamento. A cirurgia isolada ou radioterapia é indicada para as lesões iniciais. Quando a neoplasia está em estágio mais avançado o tratamento é a cirurgia radical associada à radioterapia, podendo ser empregada também a quimioterapia em pacientes com envolvimento sistêmico após a realização do procedimento cirúrgico⁴⁹.

1.6 Sistema Imune, Células Dendríticas e Oncogênese

1.6.1 Sistema imune

Nos últimos anos estudos mostraram que o sistema imune desempenha um papel fundamental no controle e progressão do tumor. Células imunes infiltrantes nos tumores, incluindo linfócitos T e B, macrófagos e neutrófilos podem regular respostas imunes, inibindo ou estimulando o crescimento tumoral^{24,50}. De fato, a caracterização da resposta imune adaptativa mostrou ser uma ferramenta prognóstica importante em uma ampla gama de carcinomas, potencialmente ainda mais relevante devido ao desenvolvimento de protocolos imunoterapêuticos^{51,52}.

Os linfócitos T regulatórios (LTregs) são responsáveis não somente pelo controle de linfócitos autoreativos, mas também pela redução da resposta imune ao antígeno tumoral. Os LTregs (CD4+/CD25+/Foxp3+) representam 2-4% do total de LTCD4+, sendo fundamentais na manutenção da autotolerância periférica.

Embora o mecanismo de ação não seja completamente compreendido, LTregs regulam as funções de LTCD4+, LTCD8+, células natural killer (NK), CDs e macrófagos durante a resposta imune contra patógenos, autoantígenos e tumores²⁴. Similar com LTregs, porém diferentemente dos macrófagos M1, os macrófagos M2 também têm mostrado um perfil anti- inflamatório e pró-tumoral⁵³. Vários estudos avaliando o envolvimento dos LTregs e macrófagos M2 na progressão tumoral, mostram um aumento no número de destas células no sangue periférico de pacientes com câncer de pulmão, próstata, mama e cabeça e pescoço^{24,53,54}, usualmente associado com prognóstico ruim⁵³. Outros estudos têm demonstrado que a depleção de LTregs e macrófagos M2 tem potencial terapêutico nos pacientes com câncer^{53,55,56}. Em pacientes com tumores de cabeça e pescoço, a resposta imune antitumoral é prejudicada e a progressão está associada à disfunção imune grave⁵⁷.

1.6.2 Células dendríticas

As CDs são importantes na iniciação e regulação das respostas imunes. Estão presentes em quase todos os tecidos periféricos, incluindo pele e mucosa⁵⁸⁻⁶¹. As CDs não somente ativam linfócitos T e B, mas também células NK e produzem interferons (IFNs), estabelecendo uma conexão entre o sistema imune inato e adaptativo (Han et al., 2017). A ativação (ou maturação) de CDs resulta em imunidade, uma vez que, dependendo da natureza do estímulo de ativação, as CDs podem induzir respostas imunes mediadas por LTh1 e células de langerhans (CLs)⁶². Em contraste, CDs inativas ou CDs recebendo estímulos inibitórios, como IL-10 e/ou corticosteróides, induzem tolerância imunológica via depleção de linfócitos T e proliferação de LTregs. Assim, a resposta imunológica é dependente do estado de ativação da CDs: as CDs maduras (CDm) protegem o organismo de neoplasias ou patógenos, enquanto as CDs imaturas (CDim) induzem tolerância imunológica⁶³. O processo de vigilância imunológica do câncer é um importante processo de proteção do hospedeiro para inibir a carcinogênese e para manter a homeostase celular⁶⁴. Neste contexto, as CDs são conhecidas por desempenhar um papel central na regulação de respostas imunológicas inatas e adaptativas, incluindo imunidade antitumoral⁶⁵.

1.6.3 Células dendríticas da mucosa oral (CDMO)

Vários estudos sugerem que as CDMO possuem propriedades tolerogênicas, tais como a produção de citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β), geração de LTregs e alteração da resposta Th1/Th2⁶⁶. Imunidade atenuada nesse contexto faz sentido, porque as superfícies mucosas estão expostas continuamente a diversas substâncias inócuas⁶⁷. Mascarell et al.⁶⁸ (2008) realizaram análises mais detalhadas das CDMO e identificaram quatro subconjuntos de CDMO: (i) CLs CD207+ na mucosa, duas populações de células dendríticas mielóides (CDm) (ii) CD11b+/CD11c- e (iii) CDm CD11b+/CD11c+ na interface mucosa e submucosa, e (iv) CDp na submucosa. As duas últimas CDMO induzem a produção de IFN- γ e IL-10 por LTCD4+, sugerindo propriedades tolerogênicas das mesmas. No entanto, as CDs alteram seu fenótipo entre a mucosa oral e os linfonodos regionais até onde elas migram⁶⁸. Durante o processo de migração aos linfonodos regionais, as CDMO expressam altos níveis de marcadores de maturação tais como o CD40, CD80, CD86, assim como CD83 e CD208 (DC-LAMP)^{69,70}.

Há um reconhecimento crescente de que processos inflamatórios podem propiciar o desenvolvimento e progressão tumoral, através de citocinas produzidas por células tumorais e por células da imunidade inata (CDs e macrófagos)⁷¹. Este processo inflamatório tipicamente falha na estimulação da imunidade mediada por CLs e contribui com a progressão tumoral via supressão ativa da imunidade adaptativa (linfócitos)⁷².

1.6.3.1 Células de Langerhans (CLs) e células dendríticas submucosas (CDsub)

As CLs pertencem à família de CDs e são células apresentadoras de antígenos para linfócitos T localizados no epitélio⁷². As CLs são derivadas da medula óssea e representam 2-3% da população celular total de epitélio normal da pele e da mucosa. Estas CDs imaturas expressam S110, CD1a e CD207^{65,73}. Estudos mostraram que o número de CDs está aumentado e está associado a eventos de supressão tumoral em pacientes com carcinomas de pulmão, nasofaríngeo, gástrico, esofágico e de mama⁷⁴. Neste contexto, alguns estudos avaliaram a presença de CDs e sua relação com o CECO e DPMs⁷⁴. CDs CD1a+ foram observadas em uma concentração maior na região intratumoral de CECO e

CEC de lábio (em íntima associação com células neoplásicas) ou em localização intraepitelial nas DPMs⁷⁴. Interessantemente, estudos mostram que infecção pelo HPV modula o ambiente imune tumoral. Assim, Nguyen et al.⁷⁵ (2016) relataram que o número de CLs (CD1a+) está reduzido no estroma tumoral de pacientes jovens com CECorof HPV+. Kindt et al.⁷⁶ (2016) mostraram em seu estudo que houve um maior número de CLs na região intratumoral de CECO do que CECorof e não foram observadas diferenças no estroma tumoral. Goldman et al.⁷⁷ (1998) avaliaram a correlação entre recidiva e sobrevida de pacientes com CECO (língua) e a quantidade de CLs no tumor e em áreas adjacentes. Os resultados desse estudo mostraram que pacientes com expressão positiva de CD1a nas CDs adjacentes ao tumor apresentaram maior sobrevida e menor taxa de recidiva. Gallo et al.⁷⁸ (1991) avaliaram a expressão de CLs em 88 espécimes de CEC de laringe e observaram que houve uma correlação positiva entre a densidade de CLs e a sobrevida dos pacientes. Além disso, a marcada presença de infiltrado linfóide junto ao tumor também pode ser considerada um bom fator prognóstico para pacientes com CEC de laringe⁷⁸. Recentemente, Jardim et al.⁶⁵ (2018) associaram que a depleção de CDs CD1a+ peritumorais é um fator prognóstico independente, relacionando-as com altas taxas de recorrência, metástase linfonodal e pior sobrevida em CECO.

O'Donnell et al.⁷⁹ (2007) avaliaram a distribuição de CDim (CD207, CD209), CDm (CD208) e CDp (CD123) em 63 casos de CECO e 8 metástases linfonodais através da expressão imunistoquímica dos anticorpos contra esses subgrupos de CDs. Os resultados mostraram que CDim estavam presentes no tumor primário; no entanto, raramente encontravam-se infiltrando o tumor. A presença de CDm e CDp foi escassa e geralmente estava associada a pior prognóstico. Esses resultados sugerem que a resposta deficiente das CDs em lesões tumorais parece estar relacionada à função alterada e não a falha no recrutamento dessas células. Portanto, uma estratégia mais eficaz para reestabelecer a função imunológica em resposta ao CEC seria manter o equilíbrio dos fatores secretados no microambiente tumoral, ao invés de restaurar somente uma única população de CDs. Em estudo realizado para avaliar CDsub (FXIIIa+/CD209+) em DPMs, CECO e CEC de lábio inferior, desenvolvido pelo nosso grupo, foi possível identificar um aumento progressivo de CDsub em displasia epitelial de alto grau das DPMs,

seguido pelo CECO e CEC de lábio inferior. Os resultados sugerem uma participação das CDsub na patogênese dessas lesões, possivelmente induzindo tolerância imunológica, mesmo em estágios iniciais da carcinogênese oral e do lábio inferior⁸⁰.

1.6.3.2. Células dendríticas plasmocitóides

As CDp compreendem um subgrupo de CDs que produzem grandes quantidades de interferon tipo 1 (IFN-1), classificada como citocina supressora de tumores⁷⁹Donell et al., 2007). De fato, essa liberação de grande quantidade de IFN-1 está associada com uma variedade de agentes, incluindo DNA viral, desempenhando um papel crítico nas respostas imunológicas naturais antivirais iniciais⁸¹⁻⁸³. As CDp podem ser avaliadas através dos imunomarcadores CD123 e CD303. Este último se encontra frequentemente expresso em CDp em processo de maturação. Pellicoli et al. (2017) observaram um aumento significativo de CDp CD303+ em CECO, quando comparados com displasia epitelial oral. O'Donell et al.⁷⁹ (2007) avaliaram a presença de CDp CD123+ e observaram que houve uma significativa associação com a diminuição da sobrevida de pacientes com CECO e metástase linfonodal. Recentemente, mostrando a importância do papel do sistema imune. Abolhalaj et al.⁸² (2018) realizaram um estudo comparativo de CDm (CD11c+) e CDp (CD123+) com CECorof e tecido normal da mesma região, demonstrando que CD123+ teve uma menor expressão em CECorof do que em tecido normal da região, enquanto que a presença de CDm foi significativamente mais alta em CECorof⁸².

5 CONCLUSÃO

Em resumo, além dos casos típicos associados ao ARHPV, nossos resultados mostram que os casos associados ao HPVBR e ao HPVBR/HPVBR (co-infecção) podem ser detectados no CECO e CECOróf, com um aparente impacto na sobrevida. Os mecanismos patogênicos da infecção múltipla por HPV, no entanto, ainda permanecem incertos. Mais estudos são necessários para entender melhor o comportamento clínico-patológico e o impacto prognóstico desses subgrupos de tumores.

Diferentemente do CECO, nossos resultados mostram predominância de imDCs, com perfil de ativação de células imunes, no CECOróf. O estatus do HPV parece mostrar associação com a infiltração de DC em ambas as neoplasias, sugerindo respostas imunes antivirais no CECOróf associado ao HPV. Estudos futuros com foco em aspectos moleculares para avaliar o status funcional dos subtipos das DCs, bem como seus mecanismos de ativação no microambiente tumoral, provavelmente oferecerão um maior entendimento das estratégias de imunoterapia no tratamento de pacientes com CECCP associado ao HPV e não associado ao HPV.

REFERÊNCIAS*

1. Hübbers CU, Akgül B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*. 2015; 6(3): 244-8.
2. El-Naggar A.K, Takata T. Tumours of the oropharynx: base of tongue, tonsils, adenoids. In: El-Naggar A.K., Chan J.K.C, Grandis J.R, Takata T, Slootweg P. J editors. WHO Classification of head and neck tumours. 4th ed.: Lyon: IARC; 2017. p. 136-8
3. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2017. [acesso 14 de jun. 2018]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>.
4. Han N, Zhang Z, Liu S, Ow A, Ruan M, Yang W, Zhang C. Increased tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*. 2017;78: 129-134.
5. Alam H, Bhate AV, Gangadaran P, Sawant SS, Salot S, Sehgal L, et al. Fascin overexpression promotes neoplastic progression in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 20;12: 32.
6. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017. pii: S2212-4403(17): 31248-8.
7. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-- an update. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(5): 401-21.
8. Montoro JR, Ricz HA, Souza Ld, Livingstone D, Melo DH, Tiveron RC, Mamede RC. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008;74(6): 861-6.
9. Hong AM, Dobbins TA, Lee CS, Jones D, Harnett GB, Armstrong BK, et al. Human papillomavirus predicts outcome in oropharyngeal cancer in patients treated primarily with surgery or radiation therapy. *Br J Cancer*. 2010;103(10): 1510-7.
10. Vu HL, Sikora AG, Fu S, Kao J. HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy. *Cancer Lett*. 2010;288(2): 149-55.
11. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363(1): 24-35.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Rietbergen MM, Brakenhoff RH, Bloemena E, Witte BI, Snijders PJ, Heideman DA, et al. Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. *Ann Oncol*. 2013;24(11): 2740-5.
13. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 2013;31(36): 4550-9.
14. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2): 87-108.
15. Anantharaman D, Marron M, Laggiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlman H, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*. 2011;47(8): 725-31.
16. Brown JS, Shaw RJ, Bekiroglu F, Rogers SN. Systematic review of the current evidence in the use of postoperative radiotherapy for oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012;50(6): 481-9.
17. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. List of Classifications by Cancer Site. monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php. Accessed February 22, 2018.
18. McDowell JD. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am*. 2006;39(2): 277-94.
19. Hoffmannová J, Foltán R, Vlk M, Sipos M, Horká E, Pavlíková G et al. Hemimandibulectomy and therapeutic neck dissection with radiotherapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma involving mandible: a critical review of treatment protocol in the years 1994-2004. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(6): 561-7.
20. Carnelio S, Rodrigues GS, Shenoy R, Fernandes D. A brief review of common oral premalignant lesions with emphasis on their management and cancer prevention. *Indian J Surg*. 2011;73(4): 256-61
21. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers-a brief historical account. *Virology*. 2009;384: 260-265.
22. Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(1): 57-81.
23. Partlová S, Bouček J, Kloudová K, Lukešová E, Zábrodský M, Grega M, et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 2015;4(1): e965570.

24. Lechner A, Schlößer H, Rothschild SI, Thelen M, Reuter S, Zentis P, et al. Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(27): 44418-433.
25. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103: 368-383.
26. Deschler DG, Richmon JD, Khariwala SS, Ferris RL, Wang MB. The "new" head and neck cancer patient-young, nonsmoker, nondrinker, and HPV positive: evaluation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;151(3): 375-80.
27. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*. 2010; 46(6):414-7.
28. Dantas TS, de Barros Silva PG, Sousa EF, da Cunha Mdo P, de Aguiar AS, Costa FW, et al. Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Jan;95(3):e2314.
29. Bewley AF, Farwell DG. Oral leukoplakia and oral cavity squamous cell carcinoma. *Clin Dermatol*. 2017 Sep - Oct;35(5):461-467.
30. Fujimaki M, Fukumura Y, Mitani K, Kurisaki A, Yokoyama J, Ikeda K, Yao T. Histological subtypes and characteristic structures of HPV-associated oropharyngeal carcinoma: study with Japanese cases. *Diagn Pathol*. 2013 Dec 19;8:211.
31. Westra WH, Lewis JS Jr. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head Neck Pathol*. 2017;11(1): 41-47.
32. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte L, Bosch FX, de Sanjosé S, Trottier H. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2014;15(12): 1319-31.
33. Li W, Thompson CH, Xin D, Cossart YE, O'Brien CJ, McNeil EB, Gao K, Scolyer RA, Rose BR. Absence of human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from Chinese patients. *Am J Pathol*. 2003;163(6): 2185-9.
34. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, et al. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol*. 2011 ;40(2): 489-502.
35. Piña AR, Jimenez LS, Mariano FV, de Andrade BA, Carlos R, Altemani A, de Almeida OP. Human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from Guatemala and Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;121(4): 412-8.

36. Matos LL, Miranda GA, Cernea CR. Prevalence of oral and oropharyngeal human papillomavirus infection in Brazilian population studies: a systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2015;81(5): 554-67.
37. De Cicco R, de Melo Menezes R, Nicolau UR, Pinto CAL, Villa LL, Kowalski LP. Impact of human papillomavirus status on survival and recurrence in a geographic region with a low prevalence of HPV-related cancer: A retrospective cohort study. *Head Neck*. 2020;42(1): 93-102.
38. Nopmaneepaisarn T, Tangjaturonrasme N, Rawangban W, Vinayanuwattikun C, Keelawat S, Bychkov A. Low prevalence of p16-positive HPV-related head-neck cancers in Thailand: tertiary referral center experience. *BMC Cancer*. 2019;19(1): 1050.
39. Szkaradkiewicz A, Kruk-Zagajewska A, Wal M, Jopek A, Wierzbicka M, Kuch A. Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Exp Med*. 2002;2(3): 137-41.
40. Huang L, Baban B, Johnson BA 3rd, Mellor AL. Dendritic cells, indoleamine 2,3 dioxygenase and acquired immune privilege. *Int Rev Immunol*. 2010;29(2): 133-55.
41. Cheraghlou S, Yu PK, Otremba MD, Park HS, Bhatia A, Zogg CK, et al. Treatment deintensification in human papillomavirus-positive oropharynx cancer: Outcomes from the National Cancer Data Base. *Cancer*. 2018;124(4): 717-726.
42. Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck*. 2004;26(1): 31-8.
43. Dios PD, Lestón JS. Oral cancer pain. *Oral Oncol*. 2010 Jun;46(6):448-51.
44. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*. 2001 Aug 15;92(4):805-13.
45. Yao M, Chang K, Funk GF, Lu H, Tan H, Wacha J, Dornfeld KJ, Buatti JM. The failure patterns of oral cavity squamous cell carcinoma after intensity-modulated radiotherapy-the university of iowa experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;67(5): 1332-41.
46. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2009;27:1992–1998.
47. Bernier J, Dommenege C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(19): 1945-52.

48. Spanos WC, Nowicki P, Lee DW, Hoover A, Hostager B, Gupta A, et al. Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;135: 1137-46
49. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2004;350(19): 1937-44.
50. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144: 646–74.
51. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795): 1960-4.
52. Hong Y, Manoharan I, Suryawanshi A, Majumdar T, Angus-Hill ML, Koni PA, et al. β -catenin promotes regulatory T-cell responses in tumors by inducing vitamin A metabolism in dendritic cells. *Cancer Res*. 2015;75(4): 656-665.
53. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015;15: 577.
54. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169(5): 2756-61.
55. Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 2001;194(6): 823-32.
56. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, Zhang A, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2005;115(12): 3623-33.
57. Whiteside TL. Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother*. 2004; 53:865–78.
58. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18: 767-811.
59. Barrett AW, Cruchley AT, Williams DM. Oral mucosal Langerhans' cells. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(1): 36-58.

60. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449(7161): 419-26.
61. Steinman RM, Idoyaga J. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*. 2010;234(1): 5-17.
62. Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science*. 2000;290(5489): 92–7.
63. Adema GJ. Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunol Lett*. 2009;122(2): 128-30
64. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121: 1–14.
65. Jardim JF, Gondak R, Galvis MM, Pinto CAL, Kowalski LP. A decreased peritumoral CD1a+ cell number predicts a worse prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2018;72(6): 905-913.
66. Aramaki O, Chalermarp N, Otsuki M, Tagami J, Azuma M. Differential expression of co-signal molecules and migratory properties in four distinct subsets of migratory dendritic cells from the oral mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(3): 407-13
67. Huang SH, Xu W, Waldron J, Siu L, Shen X, Tong L, et al. Refining American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control TNM stage and prognostic groups for human papillomavirus-related oropharyngeal carcinomas. *J Clin Oncol*. 2015;33: 836-845.
68. Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(3): 603-9.
69. Lechmann M, Shuman N, Wakeham A, Mark TW. The CD83 reporter mouse elucidates the activity of the CD83 promoter in B, T, and dendritic cell populations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(33): 11887-92.
70. Chalermarp N, Azuma M. Identification of three distinct subsets of migrating dendritic cells from oral mucosa within the regional lymph nodes. *Immunology*. 2009;127(4): 558- 66.
71. Rao SK, Pavicevic Z, Du Z, Kim JG, Fan M, Jiao Y, et al. Pro-inflammatory genes as biomarkers and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *Biol Chem*. 2010;285(42): 32512-21.
72. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 2013;31: 563–604.
73. Bennaceur K, Chapman J, Brikci-Nigassa L, Sanhadji K, Touraine JL, Portoukalian J. Dendritic cells dysfunction in tumor environment. *Cancer Lett*. 2008; 272: 186–196.

74. Costa NL, Gonçalves AS, Martins AF, Arantes DA, Silva TA, Batista AC. Characterization of dendritic cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016 Jul;45(6): 418-24.
75. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, McHugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016 Jul;38(7): 1074-84.
76. Kindt N, Descamps G, Seminerio I, Bellier J, Lechien JR, Pottier C, et al. Langerhans cell number is a strong and independent prognostic factor for head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2016;62: 1-10.
77. Goldman SA, Baker E, Weyant RJ, Clarke MR, Myers JN, Lotze MT. Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;124(6): 641-6.
78. Gallo O, Bianchi S, Giannini A, Gallina E, Libonati GA, Fini-Storchi O. Correlations between histopathological and biological findings in nasopharyngeal carcinoma and its prognostic significance. *Laryngoscope*. 1991;101(5): 487-93.
79. O'Donnell RK, Mick R, Feldman M, Hino S, Wang Y, Brose MS, Muschel RJ. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. *Cancer Lett*. 2007;255(1): 145-52.
80. Léon JE, Dos Santos JL, Ribeiro-Silva A, Chahud F, Almeida LKY, Bufalino A, Almeida LY. Submucosal dendritic cells in potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma of the oral cavity and lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017 Aug 124;supl(2):130.
81. Pelliccioli ACA, Bingle L, Farthing P, Lopes MA, Martins MD, Vargas PA. Immunosurveillance profile of oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia through dendritic and T-cell analysis. *J Oral Pathol Med*. 2017 Nov;46(10):928-933.
82. Abolhalaj M, Askmyr D, Sakellariou CA, Lundberg K, Greiff L, Lindstedt M. Profiling dendritic cell subsets in head and neck squamous cell tonsillar cancer and benign tonsils. *Sci Rep*. 2018;8(1): 8030.
83. Gomes JO, de Vasconcelos Carvalho M, Fonseca FP, Gondak RO, Lopes MA, Vargas PA. CD1a+ and CD83+ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(6): 433-9.