RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2027.

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

Vithor Zago Esteves

Papel da calreticulina no crosstalk entre células displásicas e macrófagos

Araraquara

2025

UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Vithor Zago Esteves

Papel da calreticulina no crosstalk entre células displásicas e macrófagos

Dissertação apresentada á Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraauara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na área de Diagnóstico e Cirurgia

Orientadora: Andreia Bufalino

Araraquara

2025

E79p

Esteves, Vithor Zago
Papel da calreticulina no crosstalk entre células displásicas e macrófagos / Vithor Zago Esteves. -- Araraquara, 2025
71 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Andreia Bufalino

1. Leucoplasia. 2. Calreticulina. 3. Macrófagos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Vithor Zago Esteves

Papel da calreticulina no crosstalk entre células displásicas e macrófagos

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Presidente e orientadora: Andreia Bufalino

2º Examinadora: Camila De Oliveira Barbeiro

3º Examinadora: Rose Mara Ortega

Araraquara, 28 de fevereiro de 2025

DADOS CURRICULARES

Vithor Zago Esteves

NASCIMENTO: 07/10/2000 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Daniela Zago Esteves, Marcelo De Felice Esteves

2023 – Graduação em Odontologia, Universidade de Araraquara – UNIARA

2022-2022-Extensão universitária em curso de extensão em formação em cirurgia, fundação araraquarense de ensino e pesquisa em odontologia,
FAEPO, Brasil.

2024-2025 – Reabilitação Oral - Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas Regional De Araraquara, APCD, Brasil.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por serem minha base, meu alicerce e minha maior fonte de amor e apoio incondicional. Obrigado por acreditarem em mim, mesmo nos momentos de dúvida, e por estarem sempre ao meu lado, proporcionando não apenas oportunidades, mas também ensinamentos que levarei por toda a vida. Sem vocês, nada disso seria possível

À minha orientadora, por sua dedicação, paciência e confiança no meu trabalho. Sua orientação foi fundamental para que eu pudesse crescer, não apenas como pesquisador, mas também como pessoa. Agradeço por cada conselho, por compartilhar seu vasto conhecimento e por me guiar com tanta sabedoria ao longo deste percurso. Sua liderança e incentivo foram essenciais para a realização desta dissertação

À CAPES:
O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

Esteves VZ. Papel da calreticulina no crosstalk entre células displásicas e macrófagos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

RESUMO

A calreticulina (CALR) é uma proteína multifuncional encontrada principalmente no lúmen do retículo endoplasmático. Sua principal função é atuar como uma proteína chaperona, auxiliando no dobramento de proteínas e na homeostase do cálcio, além de desempenhar papéis extracelulares, como adesão celular, reparo tecidual e modulação da resposta imunológica. No contexto tumoral, a CALR pode influenciar a polarização de macrófagos associados a tumores (TAMs). Adicionalmente, Mutações recorrentes no gene da CALR foram associadas a várias neoplasias, incluindo o tipo mieloproliferativo. O estudo teve como objetivo avaliar a expressão de calreticulina CALR e de marcadores associados a macrófagos por meio de abordagens in silico e ex vivo. Inicialmente, a análise in silico foi realizada utilizando bancos de dados públicos para investigar a expressão diferencial de CALR e de genes relacionados a TAM em amostras de tecidos normais e tumorais, bem como a correlação da expressão diferencial de CALR e os marcadores de TAM. Paralelamente, a abordagem ex vivo envolveu a coleta de amostras de tecido de pacientes diagnosticados com desordens potencialmente malignas orais (DPMO) e carcinomas espinocelulares orais (CECO) derivados de pacientes com lesão prévia de DPMO, submetidas a técnicas de sequenciamento de Sanger para análise de mutações associadas a CALR e imuno-histoquímica para avaliar a expressão de CALR e sua correlação com a densidade de macrófagos CD68+ e CD163+. Na análise in sílico foram avaliadas as expressões dos genes CALR, CD47, CD68, CD86, CD163 e HLA-DRB1, a qual revelou expressão significativamente aumentada de CD163 em HNSC comparados a tecidos normais adjacentes ($p<0,01$). Além disso, a expressão de CALR em HNSC foi significativamente e positivamente correlacionada com a expressão de CD47, CD68, CD86, CD163 e HLA-DRB1 em amostras de HNSC. Na análise de sequenciamento do exon 9 do gene da CALR foi confirmando a presença exclusiva do gene selvagem em todas as amostras analisadas. Finalmente, os resultados da análise imuno-histoquímica revelaram uma expressão significativamente elevada de CALR em amostras de leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e CEC derivados de LVP em comparação com outras DPMOs incluindo liquen plano oral (LPO), lesão liquenoide oral (LLO) e leucoplasia (LO). Em relação ao perfil de macrófagos, foi observada uma maior densidade de células CD68+ e CD163+ nos grupos LPO e LVP em comparação com os outros grupos. Não houve associação entre a densidade de macrófagos e o grau de displasia epitelial ou história de transformação maligna. No entanto, foi identificada uma correlação positiva entre a densidade de CD68+ e CD163+ e a alta expressão de CALR apenas no grupo LVP. Os resultados deste estudo sugerem que a calreticulina (CALR) pode influenciar a resposta imunológica no microambiente tumoral, especialmente em lesões de leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), por meio de sua correlação com a densidade de macrófagos CD68+ e CD163+. Além disso, a ausência de mutações no exon 9 do gene da CALR indica que sua regulação pode ocorrer por mecanismos alternativos, contribuindo para a compreensão do papel dessa proteína na progressão das desordens potencialmente malignas orais

Palavras – chave: Leucoplasia. Calreticulina. Macrófagos.

Esteves VZ. Function of calreticulin in the crosstalk between dysplastic cells and macrophages [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

ABSTRACT

Calreticulin (CALR) is a multifunctional protein primarily located in the lumen of the endoplasmic reticulum. Its primary functions include acting as a chaperone protein, assisting in protein folding and calcium homeostasis. Additionally, it plays extracellular roles, such as promoting cell adhesion, tissue repair, and immune response modulation. In the tumor context, CALR may influence the polarization of tumor-associated macrophages (TAMs). Furthermore, recurrent mutations in the CALR gene have been associated with various neoplasms, including myeloproliferative disorders. This study aimed to evaluate the expression of calreticulin (CALR) and macrophage-associated markers through in silico and ex vivo approaches. Initially, the in silico analysis utilized public databases to investigate the differential expression of CALR and TAM-related genes in normal and tumor tissues, as well as the correlation between CALR expression and TAM markers. In parallel, the ex vivo approach involved collecting tissue samples from patients diagnosed with potentially malignant oral disorders (PMODs) and oral squamous cell carcinomas (OSCCs) derived from PMODs. These samples underwent Sanger sequencing to analyze CALR-associated mutations and immunohistochemistry to assess CALR expression and its correlation with CD68+ and CD163+ macrophage density.In the in silico analysis, the expression levels of the genes CALR, CD47, CD68, CD86, CD163, and HLA-DRB1 were evaluated, revealing significantly elevated expression of CD163 in head and neck squamous cell carcinoma (HNSC) compared to adjacent normal tissues ($p<0.01$). Additionally, CALR expression in HNSC was significantly and positively correlated with the expression of CD47, CD68, CD86, CD163, and HLA-DRB1. Sequencing analysis of exon 9 of the CALR gene confirmed the exclusive presence of the wild-type gene in all analyzed samples. Finally, immunohistochemical analysis revealed significantly increased CALR expression in samples of proliferative verrucous leukoplakia (PVL) and OSCCs derived from PVL compared to other PMODs, including oral lichen planus (OLP), oral lichenoid lesions (OLL), and leukoplakia (OL). Regarding macrophage profiles, higher densities of CD68+ and CD163+ cells were observed in the OLP and PVL groups compared to the other groups. However, no association was found between macrophage density and the degree of epithelial dysplasia or a history of malignant transformation. A positive correlation between CD68+ and CD163+ density and high CALR expression was identified only in the PVL group.The findings of this study suggest that calreticulin (CALR) may influence immune responses in the tumor microenvironment, particularly in proliferative verrucous leukoplakia (PVL) lesions, through its correlation with CD68+ and CD163+ macrophage density. Furthermore, the absence of mutations in exon 9 of the CALR gene indicates that its regulation may occur through alternative mechanisms, contributing to a better understanding of the role of this protein in the progression of potentially malignant oral disorders.

Keywords: Leukoplakia. Calreticulin. Macrophages.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 PROPOSIÇÃO 13
2.1 Objetivos Específicos 13

3 REVISÃO DA LITERATURA 14
3.1 Carcinoma Espinocelular Oral 14
3.1.1 Características clínicas e microscópicas.....15
3.1.2 Etiologia e fatores de risco.....16
3.1.3 Tratamento e prevenção 17
3.2 Desordens Potencialmente Malignas Orais (DPMOs) 18
3.2.1 Classificação 19
3.2.2 Displasia oral 20
3.3 Caracterização e Função da Calreticulina.....21
3.3.1 O papel da calreticulina na montagem do MHC classe I e suas implicações em neoplasias mieloproliferativas 22
3.3.2 Efeitos da mutação da calreticulina.....23
3.4 Macrófagos e Câncer 24

4 MATERIAL E MÉTODO 28
4.1. Análise in Sílico da Expressão da CALR e CD47 em Carcinomas Espinocelulares Orais e Correlação com Macrófagos M1/M2.....28
4.2. Amplificação do Éxon 9 do gene da CALR e Sequenciamento de Sanger.....28
4.2.1 Seleção das amostras de tecido congelado e extração de DNA.....29
4.2.2 Sequenciamento do éxon 9 pelo método de sanger.....29
4.3. Amostras e Análise da Expressão Imuno-Histoquímica de CALR e Densidade de Macrófagos.....30
4.3.1 Digitalização e análise de intensidade de marcação imuno-histoquímica da CALR e análise da densidade de macrófagos.....31
4.4 Análise Estatística.....32

5 RESULTADO 33
5.1 Análise in Sílico.....33
5.2 Avaliação da Mutação no Éxon 9 do Gene da CALR.....37
5.3 Perfil Epidemiológico dos Pacientes da Análise Imuno-Histoquímica... 38
5.3.1 Análise da expressão imuno-histoquímica de CALR em DPMOs e CEC de pacientes com LVP.....41
5.3.2 Correlação com expressão imuno-histoquímica de CALR e a densidade de macrófagos CD68+ e CD163+ em DPMOs e CEC de pacientes com LVP.....42

6 DISCUSSÃO 45

7 CONCLUSÃO 49

REFERÊNCIAS 50

ANEXO 59

1 INTRODUÇÃO

Desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) são definidas como “qualquer anormalidade da mucosa oral que está associada a um risco estatisticamente aumentado de desenvolver câncer bucal[1]. As desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) englobam diversas condições que apresentam risco de transformação maligna e desempenham um papel importante no diagnóstico precoce do CECO. Entre as DPMOs mais comuns estão a leucoplasia oral (LO), leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), eritroplasia, fibrose submucosa oral e líquen plano oral[1]. A prevalência global das DPMOs é de aproximadamente 5%, e embora alguns fatores de risco sejam conhecidos, muitas dessas condições não possuem uma etiologia claramente definida[2,3]. Um dos principais desafios no manejo das DPMOs é prever quais lesões evoluirão para neoplasias malignas. A LO e a LVP são exemplos de DPMOs que compartilham características clínicas, como a presença de placas brancas irreversíveis, e podem apresentar graus variados de displasia epitelial. Entretanto, essas lesões diferem em seu comportamento clínico. A LO tem uma taxa de incidência de 1% a 4% e uma taxa de transformação maligna de cerca de 9,8%[4]. Afeta principalmente homens com mais de 40 anos e está associada a fatores de risco como tabagismo, álcool e exposição à radiação ultravioleta[5]. Já a LVP é uma condição agressiva e progressiva, com uma taxa de transformação maligna que pode variar de 14,3% a 75% sendo considerada de maior risco e menos associada a fatores como tabaco e álcool[6,7]. Devido à sua complexidade, o diagnóstico da LVP depende da evolução clínica e microscópica das lesões, podendo ser confundida com líquen plano ou lesões liquenóides, o que ressalta a importância de estudos que busquem melhorar a compreensão e o manejo dessas desordens[1,7]. A calreticulina(CALR) é uma proteína multifuncional, descrita pela primeira vez em 1974, com peso molecular de 46 kDa, sendo encontrada principalmente no lúmen do retículo endoplasmático. Sua principal função é atuar como uma proteína chaperona, auxiliando no dobramento de proteínas, além de participar da homeostase e do armazenamento de cálcio, contribuindo para contração muscular, expressão gênica, síntese proteica e respostas ao estresse celular. No entanto, a CALR também pode se translocar para a superfície celular, onde desempenha papéis extracelulares, como na adesão celular, reparo tecidual, modulação da resposta imunológica, ativação do sistema complemento, fagocitose e estabilidade do RNA[8-10].

A expressão aumentada e persistente da CALR por células displásicas na LVP pode desempenhar um papel importante na modulação do microambiente tumoral (TME) por meio da interação com macrófagos associados ao tumor (TAMs)[11]. No TME, os TAMs apresentam plasticidade funcional, podendo polarizar para os subtipos M1 (pró-inflamatório) ou M2 (imunossupressor), de acordo com os sinais recebidos. Essa polarização está intimamente ligada à progressão tumoral. Os TAMs podem secretar citocinas, como IL-6, IL-8 e IL-10, promovendo imunossupressão e progressão tumoral[12]. Além disso, sinais de evasão imunológica, como o complexo CD47/SIRPα, permitem que as células tumorais evitem a fagocitose. Por outro lado, a CALR, quando exposta na superfície celular, pode contrabalançar esses sinais ao atuar como um sinal “coma-me”, promovendo a fagocitose mediada pelos macrófagos[13].

Em geral, tumores em estágio inicial apresentam predominância de TAMs antitumorais, enquanto tumores em estágio avançado estão associados a uma predominância de TAMs protumorais. Assim, a razão entre TAMs protumorais e antitumorais (também conhecida como índice de polarização dos TAMs) foi proposta como marcador prognóstico e alvo terapêutico no câncer. Dessa forma, a interação entre CALR, TAMs e o TME representa um eixo potencial para novas estratégias terapêuticas, focadas na modulação da polarização M1/M2 e na restauração do equilíbrio imunológico, visando à inibição da progressão maligna[14,15].

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a análise in sílico da expressão e correlação dos marcadores CALR, CD47, HLA-DR, CD86, CD68 e CD163 em CECO, Análise da mutação no exon 9 do gene da CALR por meio do sequenciamento de Sanger em amostras de LPO, LLO, LO, LVP, CECO, Análise da expressão imuno-histoquímica de CALR e densidade de macrófagos em amostras de LPO, LLO, LO, LVP, CECO, correlacionando com o perfil de macrófagos com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais eficazes no manejo dessas DPMOs.

7 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo reforçam o papel da calreticulina (CALR) na modulação do microambiente tumoral, especialmente em lesões associadas à leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP). A correlação positiva entre a expressão de CALR e a densidade de macrófagos CD68+ e CD163+ no grupo LVP sugere uma possível influência dessa proteína na resposta imunológica local. Além disso, a análise in silico confirmou a associação da CALR com marcadores de macrófagos em amostras de HNSC. A ausência de mutações no exon 9 do gene da CALR indica que a regulação de sua expressão nesses contextos pode ocorrer por mecanismos distintos da mutação genética. Esses resultados contribuem para uma melhor compreensão do papel da CALR e dos macrófagos no desenvolvimento e progressão das DPMO, com potenciais implicações na caracterização do risco de transformação maligna.

REFERÊNCIAS*

1. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR et al. Oral potentially malignant disorders: a consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the who collaborating centre for oral cancer. Oral Dis. 2021; 27(8): 1862-80.

2. Ranganathan K, Kavitha L. Oral epithelial dysplasia: classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. J Oral Maxillofac Pathol. 2019; 23(1): 19-27.

3. Tilakaratne WM, Jayasooriya PR, Jayasuriya NS, De Silva RK. Oral epithelial dysplasia: causes, quantification, prognosis, and management challenges. Periodontol 2000. 2019; 80(1): 126-47.

4. El-Naggar AK, Chan JKC, Takata T, Grandis JR, Slootweg PJ. The fourth edition of the head and neck world health organization blue book: editors' perspectives.Hum Pathol. 2017; 66: 10-2.

5. Villa A, Woo SB. Leukoplakia-a diagnostic and management algorithm. J Oral Maxillofac Surg. 2017; 75(4): 723-34.

6. Ramos-García P, González-Moles MÁ, Mello FW, Bagan JV, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review and meta-analysis.Oral Dis. 2021; 27(8): 1896-907.

7. Lafuente Ibáñez de Mendoza I, Lorenzo Pouso AI, Aguirre Urízar JM, Barba Montero C, Blanco Carrión A, Gándara Vila P et al. Malignant development of proliferative verrucous/multifocal leukoplakia: a critical systematic review, meta-analysis and proposal of diagnostic criteria. J Oral Pathol Med. 2022; 51(1): 30-8.

8. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. J Oral Pathol Med. 2016; 45(3): 155-66.

9. Lu YC, Weng WC, Lee H. Functional roles of calreticulin in cancer biology. Biomed Res Int. 2015; 2015: 526-24.

10. Chiang, W. F., Hwang, T. Z., Hour, T. C., Wang, L. H., Chiu, C. C., Chen, H. R et al. Calreticulin, an endoplasmic reticulum- resident protein, is highly expressed and essential for cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2013; 49(6): 534-41.

11. Fucikova, J., Kasikova, L., Truxova, I., Laco, J., Skapa, P., Ryska, A. et al. Relevance of the chaperone-like protein calreticulin for the biological behavior and clinical outcome of cancer. Immunol Lett. 2018; 193: 25-34.

* 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. Toledo, B., Zhu Chen, L., Paniagua-Sancho, M., Marchal, J. A., Perán, M., & Giovannetti, E. Deciphering the performance of macrophages in tumour microenvironment: a call for precision immunotherapy. J Hematol Oncol. 2024 17, 44.

13. Pelekanou, V., Villarroel-Espindola, F., Schalper, K. A., Pusztai, L., & Rimm, D. L. CD68, CD163, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) co-localization in breast tumor microenvironment predicts survival differently in ER-positive and -negative cancers.Breast Cancer Res. 2018, 20, 154

14. Chao MP, Weissman IL, Majeti R. The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. Curr Opin Immunol. 2012; 24(2): 225–32.

15. Jayasingam, S. D., Citartan, M., Thang, T. H., Mat Zin, A. A., Ang, K. C., & Ch'ng, E. S. Evaluating the polarization of Tumor-associated macrophages into M1 and M2 phenotypes in human cancer tissue: technicalities and challenges in routine clinical practice. Front Oncol. 2019; 9: 1512. 39.

16. Macciò, A., Gramignano, G., Cherchi, M. C., Tanca, L., Melis, L., & Madeddu, C. Role of M1-polarized tumor-associated macrophages in the prognosis of advanced ovarian cancer patients. Sci Rep. 2020; 10(1): 60-96

17. Tandon P, Dadhich A, Saluja H, Bawane S, Sachdeva S. The prevalence of squamous cell carcinoma in different sites of oral cavity at our Rural health care centre in loni, maharashtra - a retrospective 10-year study. Contemp Oncol (Pozn). 2017; 21(2): 178-183.

18. Bugshan A, Farooq I. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. F1000 Res. 2020; 9: 2-29.

19. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021; 71(3): 209-49.

20. Fitzmaurice, C., Abate, D., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdel-Rahman et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. JAMA Oncol. 2017; 3(3): 418.

21. Hadzic S, Gojkov-Vukelic M, Pasic E, Dervisevic A. Importance of early detection of potentially malignant lesions in the prevention of oral cancer. Mater Sociomed. 2017, 129-33.

22. Minhas S, Sajjad A, Kashif M, Taj F, Waddani HA, Khurshid Z. Oral ulcers presentation in systemic diseases: an update. Maced J Med Sci. 2019; 7(19): 3341-347.

23. Brandwein-Gensler, M., Teixeira, M. S., Lewis, C. M., Lee, B., Rolnitzky, L., Hille, J. J et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. Am J Surg Pathol. 2005; 29(2): 167-78.

24. Gadelha MIP, Costa MR, Almeida RT. Estadiamento de tumores malignos - análise e sugestões a partir de dados da APAC. Rev. Bras. Cancerol. 2005; 51(3): 193-9.

25. Silva PC, Ferreira SO, Queiroz EA Principais características clínicas do carcinoma espinocelular da cavidade bucal.. Rev. Saude . 2019; 12(1(ESP): 17.

26. Machiels JP, Leemans CR, Golusinski W, Gregoire V, Grau C. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow- up. Ann Oncol. 2020; 31(11): 1462–475.

27. Lourenço S de QC, Schueler AF, Camisasca DR, Lindenblatt R de C, Bernardo VG. Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. Rev. Bras. Cancerol. 2007; 53(3):325-33.

28. Veríssimo MHG, Carvalho FG de S, Sousa FRG de, Carvalho GM de, Barbosa JLM, Carvalho LC de A et al. Evaluation of histopathological aspects in squamous cell carcinomas: an integrative literature review. RSD. 2022; 11(6): e48811629234.

29. Daroit NB, Salgueiro AP, Maito FLDM, Visioli F, Rados PV. The use of cytopathology to identify disturbances in oral squamous cell carcinoma at early stage: a case report. Diagn Cytopathol. 2018; 46(12): 1068-072.

30. Marur, S., & Forastiere, A. A. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc, 2008; 83(4), 489–501.

31. Galbiatti, A. L., Padovani-Junior, J. A., Maníglia, J. V., Rodrigues, C. D., Pavarino, É. C., & Goloni-Bertollo, E. M. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. Braz J Otorhinolaryngol, 2013, 79(2), 239– 47.

32. Jung K, Kim HS, Lee SY, Hwang JH, Lee YJ. Squamous cell carcinoma of head and neck: what internists should know. Korean J Intern Med. 2020;35(5):1031– 044

33. Weber MB, Ferreira IG, Ferreira LO, Silva AB, Cernea SS. Carcinoma espinocelular avançado e imunoterápicos: novas perspectivas terapêuticas. Surg Cosmet Dermatol. 2021; 13: e20210023.

34. Doki, Y., Ajani, J. A., Kato, K., Xu, J., Wyrwicz, L., Motoyama, S et al. Nivolumab combination therapy in advanced esophageal squamous-cell carcinoma. N Engl J Med. 2022; 386(5): 449-62.

35. Ferris, R. L., Licitra, L., Fayette, J., Even, C., Blumenschein, G., Jr, Harrington, K. J et al. Nivolumab in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: efficacy and safety in checkmate 141 by prior cetuximab use. Clin Cancer Res. 2019; 25(17), 5221–230.

36. Ahmed, S. R., Petersen, E., Patel, R., & Migden, M. R. Cemiplimab-rwlc as first and only treatment for advanced cutaneous squamous cell carcinoma. Expert Rev Clin Pharmacol. 2019; 12(10), 947–95.

37. Rischin, D., Migden, M. R., Lim, A. M., Schmults, C. D., Khushalani, N. I., Hughes, B. G. M et al. Phase 2 study of cemiplimab in patients with metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: primary analysis of fixed-dosing, long-term outcome of weight-based dosing. J Immunother Cancer. 2020; 8(1): e000775.

38. Ogata D, Tsuchida T. Systemic immunotherapy for advanced cutaneous squamous cell carcinoma. Curr Treat Options Oncol. 2019; 14;20(4): 30.

39. Carlson ER, Kademani D, Ward BB, Oreadi D. American association of oral and maxillofacial surgeon's position paper on oral mucosal dysplasia. J Oral Maxillofac Surg, 2023; 81(8): 1042-054.

40. Woo SB. Oral Epithelial dysplasia and premalignancy. Head Neck Pathol. 2019; 13(3): 423-39.

41. Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: recognition, grading and clinical significance. Oral Dis. 2021, 1947-976

42. Muller S, Tilakaratne WM. Update from the 5th edition of the world health organization classification of head and neck tumors: tumours of the oral cavity and mobile tongue. Head Neck Pathol. 2022, 54-62.

43. Cirillo N. Precursor lesions, overdiagnosis, and oral cancer: a critical review. Cancers (Basel). 2024; 16(8): 1550.

44. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. J Oral Pathol Med. 2016, 155-66.

45. Aguirre-Urizar JM, Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral leukoplakia: systematic review and meta-analysis of the last 5 years. Oral Dis. 2021, 1881-895.

46. Torrejon-Moya A, Jané-Salas E, López-López J. Clinical manifestations of oral proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review. J Oral Pathol Med. 2020, 49(5): 404-08.

47. Gilligan G, Garola F, Piemonte E, Leonardi N, Panico R, Warnakulasuriya S. Lichenoid proliferative leukoplakia, lichenoid lesions with evolution to proliferative leukoplakia or a continuum of the same precancerous condition? a revised hypothesis. J Oral Pathol Med. 2021; 50(2): 129-35.

48. McParland H, Warnakulasuriya S. Lichenoid morphology could be an early feature of oral proliferative verrucous leukoplakia. J Oral Pathol Med. 2021, 50(2): 229-35.

49. Capella DL, Gonçalves JM, Abrantes AAA, Grando LJ, Daniel FI. Proliferative verrucous leukoplakia: diagnosis, management and current advances. Braz J Otorhinolaryngol. 2017, 83(5): 585-93.

50. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. Oral Oncol. 2006; 42(10): 987-93.

51. Venkateswaran K, Verma A, Bhatt AN, et al. Emerging roles of calreticulin in cancer: implications for therapy. Curr Protein Pept Sci. 2018; 19(4): 344-57.

52. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. Int J Biochem Cell Biol. 2012; 44(6): 842-46.

53. Harada K, Takenawa T, Ferdous T, Kuramitsu Y, Ueyama Y. Calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. Oncol Lett. 2017; 13(6): 4857-862

54. Fucikova J, Spisek R, Kroemer G, Galluzzi L. Calreticulin and cancer.Cell Res. 2021; 31(1): 5-16.

55. Chao, M. P., Jaiswal, S., Weissman-Tsukamoto, R., Alizadeh, A. A., Gentles, A. J., Volkmer, J et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. Sci Transl Med. 2010; 2(63): 63-94.

56. Accetta, R., Elli, L., Libera, L., Siracusa, C., Cassavia, F., Orsini, F et al. Analysis of three screening methods for the detection of calreticulin gene mutations. Int J Lab Hematol. 2020; 42(2): e76-e79.

57. Holmström, M. O., Cordua, S., Skov, V., Kjær, L., Pallisgaard, N., Ellervik, C.et al. Evidence of immune elimination, immuno-editing and immune escape in patients with hematological cancer. Cancer Immunol Immunother. 2020; 69(2): 315-24.

58. Liu, P., Zhao, L., Loos, F., Marty, C., Xie, W., Martins, I et al. Immunosuppression by mutated calreticulin released from malignant cells. Mol Cell. 2020; 77(4): 748-60

59. Cimen Bozkus, C., Roudko, V., Finnigan, J. P., Mascarenhas, J., Hoffman, R., Iancu-Rubin, C. et al. Immune checkpoint blockade enhances shared neoantigen-induced t-cell immunity directed against mutated calreticulin in myeloproliferative neoplasms. Cancer Discov. 2019; 9(9): 1192- 207.

60. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. Annu Rev Immunol. 2013; 31: 443-73.

61. Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. Front Immunol. 2017; 8: 292

62. Domnick A, Winter C, Sušac L, et al. Molecular basis of MHC I quality control in the peptide loading complex. Nat Commun. 2022; 13(1): 4701.

63. Fisette O, Schröder GF, Schäfer LV. Atomistic structure and dynamics of the human MHC-I peptide-loading complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020; 117(34):20597-0606.

64. Zaitoua AJ, Kaur A, Raghavan M. Variations in MHC class I antigen presentation and immunopeptidome selection pathways. F1000Res. 2020; 9:F1000 Faculty Rev-1177.

65. Arshad N, Cresswell P. Tumor-associated calreticulin variants functionally compromise the peptide loading complex and impair its recruitment of MHC-I. J Biol Chem. 2018; 293(25):9555-569.

66. Desikan H, Kaur A, Pogozheva ID, Raghavan M. Effects of calreticulin mutations on cell transformation and immunity. J Cell Mol Med. 2023, 1032-044.

67. Kaur A, Raghavan M. A calreticulin tail: c-terminal mutants of calreticulin allow cancer cells to evade phagocytosis. Mol Cell. 2020, 683-85.

68. Guilbaud E, Kroemer G, Galluzzi L. Calreticulin exposure orchestrates innate immunosurveillance. Cancer Cell. 2023; 41(6): 1014-016.

69. Roquily A, Villadangos JDMJA. Spatiotemporal adaptations of macrophage and dendritic cell development and function. Annu Rev Immunol. 2022; 40: 525–57

70. Yang, D., Yang, L., Cai, J., Hu, X., Li, H., Zhang, X et al. A sweet spot for macrophages: focusing on polarization. Pharmacol Res. 2021; 167: 105576

71. Ruffolo, L. I., Jackson, K. M., Kuhlers, P. C., Dale, B. S., Figueroa Guilliani, N. M., Ullman, N. A et al. GM-CSF drives myelopoiesis, recruitment and polarisation of tumour-associated macrophages in cholangiocarcinoma and systemic blockade facilitates antitumour immunity. Gut. 2022; 71(7): 1386–9

72. Chen, C., He, W., Huang, J., Wang, B., Li, H., Cai, Q et al. LNMAT1 promotes lymphatic metastasis of bladder cancer via CCL2 dependent macrophage recruitment. Nat Commun. 2018;9(1): 3826. 26.

73. Nandi, B., Shapiro, M., Samur, M. K., Pai, C., Frank, N. Y., Yoon, C et al. Stromal CCR6 drives tumor growth in a murine transplantable colon cancer through recruitment of tumor-promoting macrophages. Oncoimmunology. 2016; 5(8): e1189052. 27.

74. Frankenberger, C., Rabe, D., Bainer, R., Sankarasharma, D., Chada, K., Krausz, T et al. Metastasis suppressors regulate the tumor microenvironment by blocking recruitment of prometastatic tumor-associated macrophages. Cancer Res. 2015; 75(19): 4063–73.

75. Yusen, W., Xia, W., Shengjun, Y., Shaohui, Z., & Hongzhen, Z. The expression and significance of tumor associated macrophages and CXCR4 in non-small cell lung cancer. J BUON. 2018; 23(2): 398–402.

76. Wang, H., Shao, Q., Sun, J., Ma, C., Gao, W., Wang, Q et al. Interactions between colon cancer cells and tumor-infiltrated macrophages depending on cancer cell-derived colony stimulating factor 1. Oncoimmunology. 2016; 5(4): e1122157.

77. Liu, L., Ge, D., Ma, L., Mei, J., Liu, S., Zhang, Q et al. Interleukin–17 and prostaglandin E2 are involved in formation of an M2 macrophage-dominant microenvironment in lung cancer. J Thorac Oncol. 2012; 7(7): 1091–100.

78. Ségaliny, A. I., Mohamadi, A., Dizier, B., Lokajczyk, A., Brion, R., Lanel, R et al. Interleukin–34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. Int J Cancer. 2015; 137(1): 73–85.

79. Su, S., Liu, Q., Chen, J., Chen, J., Chen, F., He, C et al. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. Cancer Cell. 2014;25(5): 605–20.

80. Chao MP, Weissman IL, Majeti R. The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. Curr Opin Immunol. 2012; 24(2): 225–32

81. Byrne, J. C., Ní Gabhann, J., Stacey, K. B., Coffey, B. M., McCarthy, E., Thomas, W et al. Bruton's tyrosine kinase is required for apoptotic cell uptake via regulating the phosphorylation and localization of calreticulin. J Immunol. 2013; 190(10): 5207–15. 36.

82. Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. J Exp Med. 2001; 194(6): 781–95.

83. Barkal, A. A., Weiskopf, K., Kao, K. S., Gordon, S. R., Rosental, B., Yiu, Y. Y et al. Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. Nat Immunol. 2018; 19(1): 76–84.

84. Deng, G., Wang, P., Su, R., Sun, X., Wu, Z., Huang, Z et al. $SPI1^{+}CD68^{+}$ macrophages as a biomarker for gastric cancer metastasis: a rationale for combined antiangiogenic and immunotherapy strategies. J Immunother Cancer. 2024; 12(10): e009983.

85. Nielsen MC, Hvidbjerg Gantzel R, Clària J, Trebicka J, Møller HJ, Grønbæk H. Macrophage activation markers, CD163 and CD206, in acute-on-chronic iver Failure. Cells. 2020; 9(5): 1175.

86. Li T, Fu J, Zeng Z, Cohen D, Li J, Chen Q, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor- infiltrating immune cells. Nucleic Acids Res. 2020; 48, 509–14.

87. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. Braz Dent J. 2007; 18(2): 148-52.

88. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 2012; 28(12): 1647-649.

89. Kujan O, Glenny AM, Oliver RJ, Thakker N, Sloan P. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2006; (3): CD004150.

90. Chang KP, Kao HK, Liang Y, Cheng MH, Chang YL, Liu SC, et al. Overexpression of activin ain oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. Ann Surg Oncol. 2010; 17(7): 1945-56.

91. Luo W, Yu Z. Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs). Stem Cell Investig. 2015; 2:16.

92. Troiano G, Caponio VCA, Adipietro I, Tepedino M, Santoro R, Laino L, et al. Prognostic significance of CD163+ tumor-associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. J Oral Pathol Med. 2019; 48(6): 483–90.

93. Pecquet, C., Chachoua, I., Roy, A., Balligand, T., Vertenoeil, G., Leroy, E et al. Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants. Blood. 2019; 133(25): 2669-2681.

94. Chachoua, I., Pecquet, C., El-Khoury, M., Nivarthi, H., Albu, R. I., Marty, C et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. Blood. 2016;127(10): 1325-335.

95. Vered M, Fürth E, Shalev Y, Dayan D. Inflammatory cells of immunosuppressive phenotypes in oral lichen planus have a proinflammatory pattern of expression and are associated with clinical parameters. Clin Oral Investig. 2013, 1365- 73.

96. Motta A, Zhan Q, Larson A, Lerman M, Woo SB, Soiffer RJ, Murphy GF, Treister NS. Immunohistopathological characterization and the impact of topical immunomodulatory therapy in oral chronic graft-versus-host disease: a pilot study. Oral Dis. 2018, 590.

97. Ferrisse, T. M., de Oliveira, A. B., Palaçon, M. P., Silva, E. V., Massucato, E. M. S., de Almeida, L. Y et al. The role of CD68+ and CD163+ macrophages in immunopathogenesis of oral lichen planus and oral lichenoid lesions. Immunobiology. 2021; 226(3): 152072

98. Flores-Hidalgo, A., Phero, J., Steward-Tharp, S., Williamson, M., Paquette, D., Krishnan, D et al. Immunophenotypic and gene expression analyses of the inflammatory microenvironment in high-grade oral epithelial dysplasia and oral lichen planus. Head Neck Pathol. 2024; 18(1): 17.