

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 20/01/2024.



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



Esteban Alexis Arroyo Ormeño

Busca de potenciais biomarcadores para leucoplasia verrucosa proliferativa

Araraquara

2022



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



Esteban Alexis Arroyo Ormeño

Busca de potenciais biomarcadores para leucoplasia verrucosa proliferativa

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas, na Área de Diagnóstico e Cirurgia

Orientadora: Profa. Dra. Andreia Bufalino
Coorientadora: Luciana Yamamoto Almeida

Araraquara

2022

A779b ArroyoOrmeño, Esteban Alexis
Busca de potenciais biomarcadores para leucoplasia
verrucosa proliferativa / Esteban Alexis ArroyoOrmeño. --
Araraquara, 2022
175 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Andreia Bufalino
Coorientadora: Luciana Yamamoto Almeida

1. Leucoplasia oral. 2. Proteômica. 3. Biomarcadores. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Esteban Alexis Arroyo Ormeño

Busca de potenciais biomarcadores para leucoplasia verrucosa proliferativa.

Comissão julgadora

Para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas, na Área de Diagnóstico e Cirurgia

Presidente e Orientadora: Prof. Dra. Andreia Bufalino
Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara.

2º Examinadora: Prof. Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli
Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara.

3º Examinador: Dr. Tulio Morandin Ferrisse
Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara.

4º Examinadora: Dra. Susana Belen Bravo Lopez
Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela

5º Examinador: Prof. Dr. Mario Pérez Sayáns
Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela.

Araraquara, 20 de janeiro 2022

DADOS CURRICULARES

Esteban Alexis Arroyo Ormeño

NASCIMENTO: 12 de fevereiro 1992-Santiago-Chile

FILIAÇÃO: Sergio Antonio Arroyo Salas e Mireya Nayade Ormeño Hernández

FORMAÇÃO:

2018–2022: Doutorando em Ciências Odontológicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil.

Orientador: Andreia Bufalino

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2017 – 2018: Diplomado em Pesquisa e Publicações em Saúde Pública. (Carga horária: 210h). Pontifícia Universidade Católica do Chile, PUC, Santiago, Chile.

2017 – 2018: Estágio na área de Estomatologia (Carga horária: 352h). Hospital Barros Luco Trudeau, HBLT, Santiago, Chile

2017 – 2018: Estágio na área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial (Carga horária: 528h). Hospital Barros Luco Trudeau, HBLT, Santiago, Chile

2012 – 2017: Graduação em Odontología. Universidade do Chile, Santiago, Chile.

2010 – 2012: Bacharel com menção em Ciências Naturais e Exatas. Universidade do Chile, Santiago, Chile

Dedico este trabalho aos pacientes que gentil e voluntariamente participaram da pesquisa, pois sem vocês não seria possível a realização desse trabalho. Vocês são o princípio e o fim, para que um dia o progresso da ciência possa continuar a oferecer a dignidade frente às doenças bucais graves e que tanto desolam o espírito de quem a padece.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Sergio Arroyo e Mireya Ormeño, agradeço por tudo que me ensinaram e pelo tempo que se dedicaram para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter não só uma boa formação profissional, mas também pessoal. Ensinaram-me a ser perseverante, disciplinado, respeitoso e agradecido. Os senhores sempre tiveram ao meu lado, não importando a distância que nos separava, dando-me força nos momentos de angústia, insegurança e tristeza. Eu dedico muito deste título aos senhores.

Aos meus amigos por acreditarem em mim, mesmo quando eu me desacreditava. Um especial agradecimento por terem feito parte desta luta, por terem me apoiado, pois sem vocês eu acho que não teria conseguido chegar nesse momento. De coração desejo que a vida nunca nos afaste totalmente uns dos outros.

À Professora Doutora Andreia Bufalino, minha orientadora, não só agradeço, como também declaro a minha mais profunda admiração e gratidão por ter me acolhido sempre como muita gentileza e me tirado da escuridão cognitiva em que eu estava submerso. Sem dúvida alguma afirmo que a sua presença no Programa de Doutorado foi um divisor de águas na minha vida profissional e pessoal. Não me esquecerei da oportunidade que a UNESP – Faculdade de Odontologia de Araraquara me proporcionou durante meu curso de Doutorado.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) por meio do programa Estudantes-Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG – Código de financiamento 88881.154490/2017-01.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos”. Marie Curie^{*}

^{*} D'Itri FM. Wastewater renovation and reuse: proceedings of the International Conference on the Renovation and Reuse of Wastewater Through Aquatic and Terrestrial Systems. New York: M. Dekker; 1977. p.iii.

Arroyo Ormeño EA. Busca de potenciais biomarcadores para leucoplasia verrucosa proliferativa [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral e muitas vezes estes tumores são precedidos por alterações clínicas que apresentam um evidente potencial de transformação maligna, as quais são chamadas de desordens potencialmente malignas orais (DPMO). Dentre estas, a leucoplasia oral (LO) é a mais importante das DPMOs com uma de incidência de 3,4% e uma taxa de transformação maligna que varia de 0,2% até 17,5%. Uma forma menos reconhecida e ainda pouco compreendida de leucoplasia, denominada leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), representa uma variante de comportamento persistente e progressivo para malignidade, com uma taxa de transformação maligna maior que 70%. O diagnóstico da LVP atualmente só é possível por meio da observação temporal e individual de cada paciente, com a demonstração de progressão clínica e histológica das lesões para um CEC. No entanto, ainda não existem métodos moleculares ou biomarcadores que possam de forma confiável auxiliar no diagnóstico diferencial e precoce entre LO e LVP. Além disto, a LVP frequentemente apresenta resposta inadequada a todas as modalidades de tratamento e sofre altas taxas de recidiva. Diante disto, identificar potenciais biomarcadores para LVP poderá auxiliar no diagnóstico diferencial, prognóstico e tratamento desta DPMO. Assim, a principal hipótese deste projeto é: O perfil proteômico entre LO e LVP é distinto e a sua caracterização poderá auxiliar no entendimento do comportamento clínico distinto entre estas DPMOs. Para testar esta hipótese, os objetivos específicos deste estudo consistem em (1) identificar potenciais biomarcadores por meio da associação da microdissecção a laser (ML) e espectrometria de massas em tandem (MS/MS); (2) avaliar possíveis mecanismos biológicos associados aos principais biomarcadores identificados por meio de ferramentas bioinformáticas e; (3) realizar estudos de validação *in vitro*.

Palavras chave: Leucoplasia oral. Proteômica. Biomarcadores.

Arroyo Ormeño EA. Researching of potential biomarkers for proliferative verrucous leukoplakia [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) represents more than 95% of all malignant neoplasms in the oral cavity and often these tumours are preceded by clinical entities which have a clear potential for malignant transformation, these are so-called oral potentially malignant disorders (OPMD). Among these, oral leukoplakia (OL) is the most prevalent OPMD with an incidence of 3.4% and a malignant transformation rate ranging from 0.2% to 17.5%. A less recognised and still poorly understood form of OL, is the proliferative verrucous leukoplakia (PVL), which represents a variant of recalcitrant and progressive behaviour towards malignancy, with a malignant transformation rate higher than 70%. Currently, the diagnosis of PVL is only based on the temporal and individual observation, with demonstration of clinical and histological progression of these lesions to OSCC. Regardless, there are still no molecular methods or biomarkers that can reliably assist in the differential and early diagnosis between OL and PVL. Moreover, PVL often shows an inadequate response to all treatment modalities and suffers high rates of recurrence. Therefore, identifying potential biomarkers for PLV may help in the differential diagnosis, prognosis and treatment of this OPMD. Thus, the main hypothesis of this research is: The proteomic profile between LO and LVP is different and its characterization may help in the understanding of the distinct clinical behaviour between these OPMD. To prove this, the main goals of this study are (1) identify potential biomarkers through the association of laser microdissection (LM) and mass spectrometry in tandem (MS/MS); (2) assess possible biological mechanisms associated with the main biomarkers founded by the aid of bioinformatics tools and; (3) performing *in vitro* validation assays.

Keywords: Oral leukoplakia. Proteomics. Biomarkers.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	PROPOSIÇÃO	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	PUBLICAÇÕES	15
3.1	Publicação 1	15
3.2	Publicação 2	59
3.3	Publicação 3	82
4	CONCLUSÃO	170
	REFERÊNCIAS	171

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas da boca^{1,2}, possui uma alta incidência e letalidade, apresentando 354.900 novos casos e 177.400 óbitos por ano aproximadamente³. Mesmo que existam avanços na compreensão e protocolos de tratamento para diferentes tumores malignos, as taxas de sobrevida em cinco anos para pacientes com CEC não excede os 50%-60%^{1,4}. Dessa forma, a prevenção e o diagnóstico precoce são extremamente necessários para melhorar o prognóstico desses pacientes.

As desordens potencialmente malignas orais (DPMO) são condições clínicas que podem preceder ao CEC, e tem uma capacidade de transformação maligna variável. As DPMOs estão compostas por leucoplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa, eritroplasia, eritroleucoplasia, líquen plano, estomatite nicotínica, queilite actínica, entre outras^{2,5,6}. A leucoplasia oral (LO) é clinicamente definida como uma "placa branca com um risco questionável de malignidade, uma vez que todas as outras lesões clínicas semelhantes que não apresentam risco foram excluídas"^{2,7}, e apresenta taxas de transformação maligna dentre 2% a 8%^{2,5,8,9}. Esta lesão pode apresentar aspectos microscópicos, que podem variar desde hiperkeratose, com ou sem grau de displasia (baixo ou alto), até um carcinoma in situ^{2,4,7}.

Por outra parte, a Leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é considerada de maneira geral como uma variante agressiva da LO^{6,10-12}. Clinicamente, a LVP aparece como uma leucoplasia não homogênea que afeta locais únicos ou múltiplos, com envolvimento de áreas contíguas ou não contíguas ao longo do tempo, de crescimento lento e resistente a todas as formas de tratamento, além disso afeta principalmente a mulheres por sobre os 60 anos de idade, e sem presença de fatores de riscos como o fumo e álcool¹³⁻¹⁷. Histopatologicamente, a LVP pode variar desde hiperkeratose com ou sem displasia a hiperplasia verrucosa, carcinoma verrucoso ou CEC, seja in situ ou infiltrante^{10,18}.

A LVP é a DPMO com a maior taxa de transformação maligna, recentemente foi determinada uma taxa cumulativa de 49,5% (IC99%: 26,7% - 72,4%) entre estudos com 12 a 20 anos de acompanhamento e uma taxa de transformação maligna por ano de 9,3%⁸. Além disso, devido ao alto potencial de recorrência e o comprometimento

vários sítios concomitantemente na cavidade bucal, não há tratamento disponível, mesmo antes do processo de transformação maligna¹⁹⁻²². Assim, o diagnóstico precoce da LVP é extremamente necessário para melhorar o prognóstico dos pacientes.

Por fim, o líquen plano oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida, comumente caracterizada pela presença de lesões reticulares brancas bilaterais, em sua maioria simétricas^{7,23-25}. Histologicamente é caracterizada pela presença de uma zona em forma de faixa bem definida de infiltração celular confinada à parte superficial do tecido conjuntivo, consistindo principalmente em linfócitos²³. Atualmente, o LPO é considerado a DPMO com a menor taxa de transformação maligna⁸, entretanto esta ideia é ainda controversa, em grande parte atribuível aos diferentes critérios diagnósticos empregados^{2,8,24,25}. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que a LVP, principalmente em estágios iniciais, pode apresentar aspectos clínicos e microscópicos que mimetizam o LPO²⁶⁻³¹. Adicionalmente, desde o ponto de vista histológico a LVP apresenta um infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos T na lâmina própria, semelhante às características histopatológicas encontradas no LPO²³.

Deve-se destacar ainda, que a classificação proposta pela OMS enfatiza os critérios microscópicos para definir o estágio clínico das DPMOs, mas esses métodos representam um problema, pois são pouco reprodutíveis, têm alta variabilidade inter-observador e são limitados quando se trata de lesões com características histológicas semelhantes, principalmente para as lesões de LVP ou aquelas que podem ser confundidos com ela^{2,12,32-35}. Apesar dos diferentes critérios desenvolvidos ao longo do tempo o diagnóstico da LVP ainda é controverso devido à falta de características clínicas, microscópicas e moleculares patognomônicas^{10,18,36-38}. Contudo, há evidências recentes que reforçam a falta de consenso para o diagnóstico de LVP com base aos critérios histopatológicos³⁵, dessa maneira, ainda não há um método objetivo padronizado disponível para o diagnóstico da LVP assim como a sua detecção precoce, prevenção e reconhecimento da progressão tumoral a partir dessas lesões.

Além disso, não há dados sobre a caracterização das células imunes nas DPMO, as quais têm se mostrado como um fator contribuinte na transformação maligna, bem como na patogênese de diferentes tipos de tumor³⁹⁻⁴³ e também como um provável

fator etiológico para o desenvolvimento do LPO, por meio da desregulação do sistema imune, envolvendo tanto a resposta inata como a adaptativa⁴⁴⁻⁴⁶.

O uso de técnicas moleculares pode melhorar significativamente a detecção de alterações que são imperceptíveis na análise histopatológica, melhorando a precisão na identificação de pacientes com maior risco de desenvolver um carcinoma^{14,47-49}. Ainda, as inovações no campo da identificação de proteínas que envolvem vários procedimentos altamente sensíveis como as técnicas de espectrometria de massas têm possibilitado melhorar a resolução da detecção de proteínas nos tecidos e mesmo até quando são aplicadas a fluidos complexos como a saliva⁵⁰⁻⁵⁸.

Contudo, sabe-se que a saliva é uma matriz complexa, cuja composição pode variar em função da estimulação do sistema nervoso autônomo, ritmo circadiano, hábitos, estado de saúde-doença, entre outros⁵⁹⁻⁶¹. Isso tem despertado grande interesse no uso da saliva como método de diagnóstico e controle de diversas doenças, tanto sistêmicas quanto da cavidade oral^{60,61}, devido ao abundante conteúdo molecular, menor invasividade e facilidade de extração, bem como o baixo custo envolvido⁶⁰. Os avanços no campo da saliva estabeleceram sua utilidade como fonte de biomarcadores comparáveis ao sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural e urina^{50,55,60,61}, que permitiria a triagem precoce de diferentes doenças por meio de "biópsias líquidas"^{55,56,61}.

Por fim, diferentes softwares possibilitam a análise qualitativa e quantitativa do proteoma, permitindo explorar clusters e nós de diferentes redes, bem como suas vias biológicas, funcionais e metabólicas^{52,57,58,62-64}. Entretanto, atualmente não existe um consenso sobre quais biomarcadores podem ser úteis para diagnosticar e/ou tratar a LVP⁶⁵.

Consequentemente, a busca por marcadores no tecido e na saliva é de suma importância, pois abre novas possibilidades de diagnóstico e possíveis alvos terapêuticos na LVP, o que levaria a melhorar a prevenção da progressão do carcinoma oral.

4 CONCLUSÃO

A leucoplasia verrucosa proliferativa é a doença potencialmente maligna oral que mais acrimônia gera na clínica de estomatologia, pelo seu comportamento recalcitrante e pela alta taxa de transformação maligna que possui. Resulta evidente pensar que a leucoplasia verrucosa proliferativa é uma entidade clínica verdadeiramente diferente da leucoplasia oral convencional, não unicamente pelas características clínicas e histopatológicas, mas também pelos atributos moleculares que possui, os quais tem mostrado uma depleção marcada dos mecanismos de defesa mediados pela resposta imune inata e adaptativa, assim como a magnitude de expressão de proteínas ambivalentes que limitam e favorecem os processos de malignidade. Adicionalmente, constata-se que as diferenças moleculares expressas dentre as doenças potencialmente maligna orais, carcinoma espinho celular e controles saudáveis são o suficientemente nítidas para manifestar diferenças perceptíveis no proteoma salivar dos pacientes em questão.

REFERÊNCIAS*

1. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* 2009; 45(4–5): 301–8.
2. El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. In: *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. p. 112–5.
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019; 144(8): 1941–53.
4. Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(6): 1270–5.
5. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009; 45(4–5): 317–23.
6. Van Der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010; 46(6): 423–5.
7. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. *Oral and maxillofacial pathology*. St. Louis, MO: Saunders/Elsevier; 2016. p. 355–63.
8. Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A, et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: a systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck.* 2020; 42(3): 539–55.
9. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003; 39(8): 770–80.
10. Cerero-Lapiedra R, Balade-Martinez D, Moreno-Lopez La, Esparza-Gomez G, Bagan Jv. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral.* 2010; e839–45.
11. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009; 45(4–5): 317–23.

* 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. Warnakulasuriya S, Johnson Newell W, Van Der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa: potentially malignant disorders. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36(10): 575–80.
13. Villa A, Menon R, Kerr A, De Abreu Alves F, Guollo A, Ojeda D, et al. Proliferative leukoplakia: proposed new clinical diagnostic criteria. *Oral Dis.* 2018; 24(5): 749–60.
14. Celentano A, Glurich I, Borgnakke WS, Farah CS. World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia and proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review of retrospective studies. *Oral Dis.* 2020; odi.13363.
15. 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.
16. Borgna SC, Clarke PT, Schache AG, Lowe D, Ho MW, McCarthy CE, et al. Management of proliferative verrucous leukoplakia: justification for a conservative approach. *Head Neck.* 2017; 39(10): 1997–2003.
17. 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): 404–8.
18. Hansen LS, Olson JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia: a long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60(3): 285–98.
19. Bagan JV, Jiménez-Soriano Y, Diaz-Fernandez JM, Murillo-Cortés J, Sanchis-Bielsa JM, Poveda-Roda R, et al. Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: a series of 55 cases. *Oral Oncol.* 2011; 47(8): 732–5.
20. Gouvea Af, Moreira Ae, Reis Rr, Almeida Op, Lopes Ma. Proliferative verrucous leukoplakia, squamous cell carcinoma and axillary metastasis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; e704–8.
21. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009; 15(6): 388–99.
22. Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(6): 1270–5.
23. van der Meij EH, Schepman K-P, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(2): 164–71.
24. González-Moles MÁ, Ruiz-Ávila I, González-Ruiz L, Ayén Á, Gil-Montoya JA, Ramos-García P. Malignant transformation risk of oral lichen planus: a systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncol.* 2019; 96: 121–30.

25. Giuliani M, Troiano G, Cordaro M, Corsalini M, Gioco G, Lo Muzio L, et al. Rate of malignant transformation of oral lichen planus: a systematic review. *Oral Dis.* 2019; 25(3): 693–709.
26. Gillenwater AM, Vigneswaran N, Fatani H, Saintigny P, El-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakia (PVL): a review of an elusive pathologic entity! *Adv Anat Pathol.* 2013; 20(6): 416–23.
27. Gillenwater AM, Vigneswaran N, Fatani H, Saintigny P, El-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakia: recognition and differentiation from conventional leukoplakia and mimics. *Head Neck.* 2014; 36(11): 1662–8.
28. Lopes MA, Feio P, Santos-Silva AR, Vargas PA. Proliferative verrucous leukoplakia may initially mimic lichenoid reactions. *World J Clin Cases.* 2015; 3(10): 861–3.
29. Garcia-Pola M, Llorente-Pendas S, Gonzalez-Garcia M, Garcia-Martin J. The development of proliferative verrucous leukoplakia in oral lichen planus: a preliminary study. *Med Oral.* 2016; e328–34.
30. Müller S. Oral manifestations of dermatologic disease: a focus on lichenoid lesions. *Head Neck Pathol.* 2011; 5(1): 36–40.
31. Müller S. Oral lichenoid lesions: distinguishing the benign from the deadly. *Mod Pathol.* 2017; 30(s1): S54–67.
32. Fleskens SAJHM, Bergshoeff VE, Voogd AC, van Velthuisen M-LF, Bot FJ, Speel E-JM, et al. Interobserver variability of laryngeal mucosal premalignant lesions: a histopathological evaluation. *Mod Pathol.* 2011; 24(7): 892–8.
33. 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.
34. Sperandio M, Brown AL, Lock C, Morgan PR, Coupland VH, Madden PB, et al. Predictive value of dysplasia grading and DNA ploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. *Cancer Prev Res.* 2013; 6(8): 822–31.
35. Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Cohen DM, Bilodeau EA, Bhattacharyya I, Lewis JS, et al. Inter-observer Variability in the diagnosis of proliferative verrucous leukoplakia: clinical implications for oral and maxillofacial surgeon understanding: a collaborative pilot study. *Head Neck Pathol.* 2020; 14(1): 156–65.
36. Ghazali N, Bakri M, Zain R. Aggressive, multifocal oral verrucous leukoplakia: Proliferative verrucous leukoplakia or not? *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 383–92.
37. Carrard VC, Brouns EREA, van der Waal I. Proliferative verrucous leukoplakia; a critical appraisal of the diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013; 18(3): e411–3.
38. Bagan J, Scully C, Jimenez Y, Martorell M. Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. *Oral Dis.* 2010; 16(4): 328–32.

39. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22(1): 329–60.
40. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004; 21(2): 137–48.
41. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(10): 715–27.
42. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008; 454(7203): 436–44.
43. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011; 331(6024): 1565–70.
44. Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010; 28(1): 100–8.
45. Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus - a review: pathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39(10): 729–34.
46. Chitturi RT. Oral Lichen Planus: a review of etiopathogenesis, clinical, histological and treatment aspects. *J Interdiscipl Med Dent Sci.* 2014 [acesso 2020 Aug 6]; 02(05). Disponível em: <https://www.omicsonline.com/open-access/oral-lichen-planus-a-review-of-etopathogenesis-clinical-histological-and-jimds-1000142.php?aid=30035>
47. Joseph BK. Oral cancer: prevention and detection. *Med Principles Pract.* 2002; 11: 32–35.
48. Farah CS, Jessri M, Bennett NC, Dalley AJ, Shearston KD, Fox SA. Exome sequencing of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma implicates DNA damage repair gene defects in malignant transformation. *Oral Oncol.* 2019; 96: 42–50.
49. Farah CS, Fox SA. Dysplastic oral leukoplakia is molecularly distinct from leukoplakia without dysplasia. *Oral Dis.* 2019; 25(7): 1715–23.
50. Amado F, Lobo MJC, Domingues P, Duarte JA, Vitorino R. Salivary peptidomics. *Expert Rev Proteomics.* 2010; 7(5): 709–21.
51. Carnielli CM, Macedo CCS, De Rossi T, Granato DC, Rivera C, Domingues RR, et al. Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 3598.
52. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D649–55.
53. Indovina P, Marcelli E, Pentimalli F, Tanganelli P, Tarro G, Giordano A. Mass spectrometry-based proteomics: the road to lung cancer biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev.* 2013; 32(2): 129–42.

54. Johann DJ, Rodriguez-Canales J, Mukherjee S, Prieto DA, Hanson JC, Emmert-Buck M, et al. Approaching solid tumor heterogeneity on a cellular basis by tissue proteomics using laser capture microdissection and biological mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2009; 8(5): 2310–8.
55. Lorenzo-Pouso AI, Pérez-Sayáns M, Bravo SB, López-Jornet P, García-Vence M, Alonso-Sampedro M, et al. Protein-based salivary profiles as novel biomarkers for oral diseases. *Dis Markers.* 2018; 2018: 1–22.
56. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017; 14(9): 531–48.
57. Tyanova S, Cox J. Perseus: a bioinformatics platform for integrative analysis of proteomics data in cancer research. in: von Stechow L, editor. *Cancer systems biology* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [acesso 2019 Nov 16]. p. 133–48. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7493-1_7
58. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods.* 2016; 13(9): 731–40.
59. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(2): 197–212.
60. Gröschl M. Saliva: a reliable sample matrix in bioanalytics. *Bioanalysis.* 2017; 9(8): 655–68.
61. Aro K, Wei F, Wong DT, Tu M. Saliva liquid biopsy for point-of-care applications. *front public health.* 2017[acesso 2020 Abr 15]; 5. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2017.00077/full>
62. Muetze T, Goenawan IH, Wiencko HL, Bernal-Llinares M, Bryan K, Lynn DJ. Contextual hub analysis tool (CHAT): a cytoscape app for identifying contextually relevant hubs in biological networks. [version 1; peer review: 1 approved]. *F1000Research* 2016, [acesso 2021 Jun 15] 5: 1745; 2016. Disponível em: (<https://doi.org/10.12688/f1000research.9118.1>)
63. Kuhn M, Szklarczyk D, Pletscher-Frankild S, Blicher TH, von Mering C, Jensen LJ, et al. STITCH 4: integration of protein–chemical interactions with user data. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(D1): D401–7.
64. Szklarczyk D, Santos A, von Mering C, Jensen LJ, Bork P, Kuhn M. STITCH 5: augmenting protein–chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(D1): D380–4.
65. Rintala M, Vahlberg T, Salo T, Rautava J. Proliferative verrucous leukoplakia and its tumor markers: systematic review and meta-analysis. *Head Neck.* 2019; 41(5): 1499–507.