



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Raphaela Sartori da Silva

**Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em desordens
potencialmente malignas orais**

Araraquara

2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Raphaela Sartori da Silva

Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em desordens potencialmente malignas orais

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Prof^a Dr^a Andreia Bufalino

Araraquara

2023

S586a Silva, Raphaela Sartori da
Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em
desordens potencialmente malignas orais / Raphaela Sartori da
Silva. -- Araraquara, 2023
37 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia)
- Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
Odontologia, Araraquara
Orientadora: Andreia Bufalino

1. Leucoplasia. 2. Líquen Plano. 3. Macrófagos. 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.

UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara

Raphaela Sartori da Silva

**Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em desordens
potencialmente malignas orais**

Orientadora: Prof^a Dr^a Andreia Bufalino

Assinatura Orientadora:



Assinatura Aluna:

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023.

Dedico este trabalho a todos que estiveram comigo durante esses anos de graduação e de alguma forma foram vitais para que eu perseverasse e conquistasse o meu sonho.

Dedico principalmente aos meus pais, Adriano e Fernanda, que deram a vida por mim e não pouparam esforços para proporcionarem tudo que eu precisava para a minha formação, sempre repletos de apoio incondicional e amor por todo esse processo, espero poder retribuir toda a dedicação que investiram em mim.

Dedico também à minha irmã e melhor amiga, Beatriz, sua determinação e esforço sempre foram exemplos para mim, obrigada por sempre acreditar no meu potencial e me apoiar. Família, eu os amo de todo o coração e não imagino uma vida em que eu não tivesse pessoas tão admiráveis ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora que me concederam a graça de estar nesse curso e me guiaram pelo meu sonho.

À minha família como um todo, pais, irmã, tios e avós, que foram os pilares na minha formação e sempre me incentivaram e acreditaram em mim. E ao meu cunhado Guilherme Stuchi Centurion, que se tornou um irmão e sempre esteve ao meu lado, me dando toda a força necessária.

Aos meus amigos de araraquara, especialmente Leticia Alem, Leonardo Benite e Karen Gonzales, por tudo que passamos juntos, por estarem presentes, todo o suporte e cada momento incrível que pudemos compartilhar juntos, sei que tirei a sorte grande ao encontrar e que não seria capaz de passar por esse processo sem vocês.

À minha família do apartamento 73, todas as meninas que moraram comigo e que me ajudaram por toda essa jornada, me apoiando e me mostrando que eu seria capaz de qualquer coisa, acreditando em mim mesmo quando eu duvidei.

À todos os meus amigos que me mesmo de longe estiveram comigo em cada passo da jornada, me motivando e me auxiliando em tudo que fosse possível.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Andreia Bufalino, pela oportunidade de fazer parte dessa equipe e por todos os ensinamentos, compreensão, paciência e auxílio, e à toda equipe que me auxiliou durante o projeto, especialmente à Mariana Paravani Palaçon por sempre estar disponível para me auxiliar e me guiar.

À Pró-Reitoria de Pesquisa - Unesp (PROPe) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq, processo nº. 121687/2021-0) pela bolsa de iniciação científica concedida (Edital 2021/2022).

SILVA RS. Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em distúrbios potencialmente malignos orais [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

Inúmeras evidências sugerem que os macrófagos estão relacionados com crescimento, invasão e metástase de vários tumores sólidos. No entanto, ainda não foi bem esclarecido o papel destas células em distúrbios potencialmente malignos orais (DPMOs). O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente a densidade de macrófagos CD68+ e CD163+ em amostras de líquen plano oral (LPO), lesão líquenóide oral (LLO), leucoplasia oral (LO) e leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), buscando correlacionar estes achados com o distinto potencial de transformação maligno entre estas DPMOs. Neste estudo, foram avaliadas amostras de tecido parafinado de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LPO (n=15), LLO (n=16), LO (n=19) e LVP (n=27 amostras provenientes de 12 pacientes). Adicionalmente, amostras de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) foram utilizadas como controle. Dados demográficos e clínico-patológicos foram coletados dos prontuários clínicos. A densidade de macrófagos foi avaliada por meio da marcação imuno-histoquímica para CD68 e CD163. Posteriormente, realizou-se fotos de cinco campos representativos das áreas intraepitelial e subepitelial com a objetiva de 20x usando uma câmera Olympus DP25 acoplada ao microscópio Nikon Eclipse E600. Em seguida a quantificação das células positivas foi realizada por dois examinadores independentes (R.S.S. e M.P.P.), utilizando o software Image J. Os dados foram submetidos à análise de variância multivariada (two-way e four-way), considerando um nível de significância de 5%. Os resultados deste estudo revelaram que a grande maioria das células CD68+ e CD163+ foi distribuída no compartimento subepitelial de todos os grupos estudados. De modo geral, foi observado uma quantidade ligeiramente maior de células CD163+ do que células CD68+; exceto para o grupo LO que mostrou um predomínio de células CD68+ e CD163+, tanto na região intraepitelial como subepitelial. Análise estatística dos dados mostrou que o número de células CD68+ na região subepitelial no grupo LPO foi significativamente maior em relação aos outros grupos. Por outro lado, foi encontrada uma redução estatisticamente significativa de células CD163+ na LO em relação ao LPO ($p < 0.0001$) e LVP ($p = 0,001$), assim como no HFI em relação ao LPO ($p = 0,011$). Nenhuma associação entre a densidade de células CD68+ ou CD163+ com o grau de displasia epitelial ou história de transformação maligna foi evidenciada nos grupos. Adicionalmente, foi encontrado um aumento estatisticamente significativo da razão CD163+/CD68+ em amostras de LVP em relação à HFI ($p = 0,001$) e LO ($p < 0,0001$). Contudo, os resultados revelaram uma associação significativa entre a diminuição da razão CD163+/CD68+ com o histórico de transformação maligna tanto em lesões displásicas de baixo e alto risco na LVP ($p < 0,0001$). Deve-se destacar que a taxa de transformação maligna da LVP é a maior entre estas DPMOs. Conclui-se que a avaliação baseada puramente na quantificação de macrófagos CD68+ e CD163+ em diferentes DPMOs, não é capaz de explicar as diferenças nas taxas de transformação maligna. Contudo, distintas formas de interação destas células com outras células do sistema imunológico pode explicar a associação encontrada entre a diminuição da razão CD163+/CD68+ e o histórico de transformação maligna na LVP.

Palavras-chaves: Leucoplasia. Líquen Plano. Macrófagos.

SILVA RS. Evaluation of M1 and M2 macrophage populations in oral potentially malignant disorders [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Numerous evidences suggest that macrophages are related to the growth, invasion and metastasis of several solid tumors. However, the role of these cells in oral potentially malignant disorders (OPMDs) is still unclear. The objective of this study was to comparatively evaluate the density of CD68+ and CD163+ macrophages in samples of oral lichen planus (OLP), oral lichenoid lesion (OLL), oral leukoplakia (OL) and proliferative verrucous leukoplakia (PVL), seeking to correlate these findings with the distinct potential for malignant transformation among these OPMDs. In this study, samples of paraffin tissue from patients with a clinicopathological diagnosis of OLP (n=15), OLL (n=16), OL (n=19) and PVL (n=27 samples from 12 patients) were evaluated. Additionally, samples of fibrous inflammatory hyperplasia (FIH) were used as controls. Demographic and clinicopathological data were collected from clinical records. Macrophage density was evaluated using immunohistochemical staining for CD68 and CD163. Subsequently, photos were taken of five representative fields of the intraepithelial and subepithelial areas with a 20x objective using an Olympus DP25 camera coupled to a Nikon Eclipse E600 microscope. Then, the quantification of positive cells was performed by two independent examiners (R.S.S. and M.P.P.), using the Image J software. The data were submitted to multivariate analysis of variance (two-way and four-way), considering a significance level of 5%. The results of this study revealed that the vast majority of C68+ and CD163+ cells were distributed in the subepithelial compartment of all studied groups. In general, a bit more CD163+ cells than CD68+ cells was observed; except for the OL group, which showed a predominance of CD68+ and CD163+ cells, both in the intraepithelial and subepithelial regions. Statistical analysis of the data showed that the number of CD68+ cells in the subepithelial region in the OLP group was significantly higher compared to the other groups. On the other hand, was found a statistically significant reduction of CD163+ cells in OL compared to OLP ($p < 0.0001$) and PVL ($p = 0.001$), as well as in FIH compared to OLP ($p = 0.011$). No association between the density of CD68+ or CD163+ cells with the degree of epithelial dysplasia or history of malignant transformation was evidenced in the groups. Additionally, was found a statistically significant increase in the CD163+/CD68+ ratio in PVL samples in relation to FIH ($p = 0.001$) and OL ($p < 0.0001$). However, the results revealed a significant association between the decrease in the CD163+/CD68+ ratio and the history of malignant transformation in both low and high-risk dysplastic lesions in PVL ($p < 0.001$). It should be highlighted that the rate of malignant transformation of PVL is the highest among these OPMDs. In conclusion, the evaluation based purely on the quantification of CD68+ and CD163+ macrophages in different OPMDs is not able to explain the differences in the rates of malignant transformation. However, different forms of interaction of these cells with other cells of the immune system may explain the association found between the decrease in the CD163+/CD68+ ratio and the history of malignant transformation in PVL.

Keywords: Leukoplakia. Lichen Planus. Macrophages.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 PROPOSIÇÃO	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 Displasia epitelial e desordens potencialmente malignas orais.....	12
3.2 Leucoplasia oral	13
3.3 Leucoplasia verrucosa proliferativa	14
3.4 Líquen plano oral	16
3.5 Macrófagos e imunologia tumoral	16
4 MATERIAL E MÉTODO.....	19
4.1 Avaliação da densidade e polarização de macrófagos M1/M2 no LPO e em lesões leucoplásicas de LO e LVP.	19
5 RESULTADOS.....	21
5.1 Características clínicas das amostras.....	21
5.2 Densidade e polarização de macrófagos M1/M2.....	25
6 DISCUSSÃO	27
7 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXO A.....	37

1 INTRODUÇÃO

No modelo atual de oncogênese, o câncer surge a partir de uma sequência de alterações celulares resultantes de fatores intrínsecos e extrínsecos; sendo bem estabelecido e aceito que existem seis alterações fundamentais na fisiologia celular que determinam o início da oncogênese¹. Segundo este conceito as células tumorais caracteristicamente fornecem seus próprios sinais de crescimento, ignoram os sinais inibidores do crescimento, evitam a morte celular (evasão da apoptose), replicam-se de forma ilimitada, sustentam a angiogênese e invadem os tecidos através da membrana basal e da parede dos capilares (invasão tecidual e metástase). Além disso, como recentemente proposto, evitar a vigilância imunológica pode ser a sétima característica do câncer^{2,3}. Este conceito mostrou que apesar das evidências a favor do papel fundamental do sistema imunológico no combate à formação do câncer (“imunovigilância”), as células e fatores que compõem este sistema podem agir selecionando ou editando os tumores emergentes⁴. Neste contexto, surgiu o conceito da “imunoedição” que é composto por três fases conhecidas como os três “Es” da imunoedição: (i) eliminação, (ii) equilíbrio e (iii) escape^{2,4}. Recentemente e baseado no conceito da imunoedição, foi reconhecido também que as células tumorais têm a interessante capacidade de utilizar a presença do infiltrado inflamatório tumoral em seu favor. Processo chamado de cooptação e subversão do sistema imunológico^{5,6}.

O conceito de imunovigilância tumoral presume que o sistema imunológico pode reconhecer precursores de câncer e, na maioria dos casos, destruir esses precursores antes de se tornarem clinicamente aparentes. Neste contexto, lesões potencialmente malignas orais (DPMOs) são entidades clínicas que apresentam maior potencial de transformação maligna em relação ao tecido clinicamente normal. As principais lesões que fazem parte deste grupo são leucoplasia oral (LO), leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), eritroleucoplasia, líquen plano oral (LPO), estomatite nicotínica, queilite actínica, entre outras⁷⁻⁹. Então, se a imunovigilância tem um papel importante na supressão de tumores, seria de esperar que pacientes com DPMOs apresentassem respostas imunológicas vigorosas. Contudo, a maioria dos estudos indica que distúrbios potencialmente malignos provavelmente representam um estado de equilíbrio entre ativação do sistema imune e a proliferação de células displásicas, como originalmente sugerido por Dunn^{2,4}. Sendo assim, o estudo

detalhado do infiltrado inflamatório nas DPMOs, pode contribuir para o entendimento da inicial da carcinogêneas nestas lesões.

Deve-se destacar que as diferentes DPMOs possuem taxa de transformação maligna e perfil epidemiológico distintos. A LO, por exemplo, possui uma incidência de 3,4% e taxa de transformação maligna de 0,2 a 17,5%^{9,10}. A LO é mais comumente encontrada em homens caucasianos acima de 40 anos, e sua prevalência aumenta com o avanço da idade, e quando associada a fatores de risco como o tabaco e o álcool^{11,12}. Apesar de apresentarem características clínicas semelhantes, as LOs possuem um grau de heterogeneidade microscópica. É possível identificar 5 aspectos histopatológicos que variam de hiperplasia epitelial com presença ou não de displasia (podendo ser leve, moderada e severa) até um carcinoma in situ¹³. Atualmente estes achados microscópicos são utilizados para prever o risco de transformação maligna deste grupo de lesões. No entanto, não há métodos objetivos ainda disponíveis para tipificar lesões displásicas e permitir resultados consistentes e reprodutíveis, uma vez que nem todas as lesões orais com displasia progridem para uma neoplasia maligna¹⁴. Outra DPMO, descrita pela OMS como a de maior risco para progressão para o CEC é a leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP). Definida pela primeira vez por Hansen et al.¹⁵, que descreveram a LVP como uma desordem agressiva de etiologia desconhecida e tendência a se tornar multifocal ao longo do tempo. A LVP é caracterizada por placas brancas difusas e múltiplas, com prevalência quatro vezes maior no gênero feminino, sendo frequentemente diagnosticada a partir da sexta década de vida em indivíduos usualmente não fumantes. Apresenta alta taxa de recorrência e um índice de transformação maligna que varia de 70 até 100% dos casos após acompanhamento a longo prazo^{16,17}. Segundo Gillenwater et al.^{16,19}, Müller^{18,22}, Lopes et al.²⁰, Garcia-Pola et al.²¹, o diagnóstico da LVP não pode ser baseado somente nos achados microscópicos de uma lesão clinicamente isolada, e sim no decorrer da evolução clínica e patológica do caso, uma vez que inicialmente esta lesão pode ter aspectos clínicos e microscópicos que mimetizam outras lesões, como a LO, LPO e lesões liquenóides orais (LLO).

Neste contexto, as diferenças encontradas na capacidade de transformação maligna das diferentes DPMOs, particularmente LO, LVP e LPO, podem ser explicadas pelo padrão de resposta imunológico desenvolvido por cada uma destas desordens. Os macrófagos são células inflamatórias que tem sido amplamente relacionadas com o prognóstico tumoral e capacidade de transformação maligna em

desordens potencialmente malignas²³. Os macrófagos são derivados dos monócitos e tem uma importante função no sistema imune, como o reconhecimento e morte de patógenos, bem como iniciar e resolver a inflamação e modular o sistema imune adaptativo²⁴. Além do número de macrófagos, o estado de ativação, conhecido como polarização (tipo M1 e M2), são relacionados a biologia do tumor. Os macrófagos do tipo M1 são conhecidos pela sua capacidade pró-inflamatória, uma vez que estão associados a destruição do tecido e a defesa antitumoral; já os macrófagos M2 tem propriedades anti-inflamatórias relacionadas a cicatrização de feridas, reparo de tecidos, neoangiogênese, como também a imunossupressão e progressão tumoral²⁵. Um estudo recente do nosso grupo, mostrou que o LPO tem um perfil de macrófagos M1 que podem estar relacionados a imunopatogênese, isto é, resposta pró-inflamatória em relação as lesões liquenóides orais²⁶. Já um outro estudo mostrou que polarização de macrófagos M2 nas leucoplasias orais foi significamente maior naquelas que tiveram uma transformação maligna no acompanhamento de 5 anos comparadas com as lesões que não sofreram transformação maligna neste período²⁵.

Então, surgiu um interesse do nosso grupo em comparar o perfil dos macrófagos M1/M2 em DPMOs, especificamente em LPO, LO e LVP, de modo a buscar compreender os diferentes potenciais de transformação maligna que existem entre estas DPMOs, possibilitando entender mais profundamente o aspecto molecular existente entre elas.

2 PROPOSIÇÃO

Considerando os problemas apresentados acima, a principal hipótese deste projeto considera que diferenças na resposta imune adaptativa entre casos de LPO, LLO, LO e LVP, podem estar correlacionadas com o distinto potencial de transformação maligna entre estas DPMOs. Para testar esta hipótese, foram avaliados comparativamente a densidade de macrófagos M1/M2 intraepitelial e subepitelial em amostras de LPO, LLO, LO e na LVP.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura será dividida conforme os assuntos que nela serão abordados, sendo eles: Displasia Epitelial e Desordens Potencialmente Malignas Orais, Leucoplasia Oral, Leucoplasia Verrucosa Proliferativa, Líquen Plano Oral e Macrófagos e imunologia tumoral.

3.1 Displasia epitelial e desordens potencialmente malignas orais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017) define displasia epitelial como um espectro de alterações epiteliais arquitetônicas e citológicas causadas pelo acúmulo de alterações genéticas, associadas a um risco aumentado de progressão para carcinoma espinocelular⁷. Portanto, representa alterações histopatológicas do epitélio que caracterizam o risco aumentado de malignização de lesões orais²⁷.

Porém evidências comprovam que, mesmo quando há a presença da displasia, não significa que ocorrerá essa malignização e nem todas as DPMOs apresentam displasias em seu histopatológico, sendo que estas podem persistir sem progredir²⁷.

Warnakulasuriya et al.^{28, p.1864} definiram as desordens potencialmente malignas como “um grupo significativo de distúrbios da mucosa que podem preceder o diagnóstico de carcinoma oral de células escamosas”, portanto se tratam de lesões que tem um risco de desenvolver câncer.

Então, ela compreende um grupo de lesões que expostas à fatores ambientais podem resultar no desenvolvimento de um carcinoma (Johnson 2017 citado por Odell et al²⁷), no entanto isso não quer dizer que todas as lesões se transformarão, ou que o paciente terá câncer apenas no local onde se encontra essa DPMO²⁸. Speight et al. (citados por Odell, Kujan, Warnakulasuriya, Sloan²⁷) disseram que a presença de uma dessas lesões, é apenas um dos fatores que aumentam o risco de câncer.

O paciente então apresenta uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer, sabendo que esse local apresenta maior probabilidade do que na mucosa normal, mas não necessariamente ocorrerá malignização²⁸.

A inclusão de lesões na classificação de desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) auxilia no direcionamento de tratamentos e prevenção em pacientes diagnosticados. Com revisões sistemáticas, foi realizada a atualização pela Organização Mundial da Saúde em 2020, de forma a incluir distúrbios como lesões líquenóides orais, (Warnakulasuriya, citado por Warnakulasuriya et al.²⁸) sendo que

alguma das principais e que serão discutidas posteriormente são a leucoplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa e o líquen plano oral.

As DPMOs apresentam variadas características clínicas, como cor, que pode variar de branco, vermelho a mista, alterações de superfície, podendo ser do tipo placa, verrucosa, lisa, atrófica, entre outras, e ainda podem ter diferentes tamanhos (Speight et al., Williams et al., citado por Warnakulasuriya et al.²⁸). Elas podem se apresentar em qualquer sítio oral e de forma unilateral ou multifocal (Farah et al., citado por Warnakulasuriya et al.²⁸). Há uma maior predominância dessas lesões em pacientes de meia-idade ou idosos, sendo mais comuns em homens do que mulheres (Napier, Speight, Speight et al. citados por Warnakulasuriya et al.²⁸), mas algumas etnias, populações e hábitos podem modificar essas taxas, devido à fatores de exposição e até mesmo hábitos (Lee, Ko et al., 2012; Lee, Min-Shan Ko, et al., 2012; Mello e outros, 2018, citados por Warnakulasuriya et al.²⁸).

3.2 Leucoplasia oral

A Leucoplasia Oral (LO) é a desordem com maior incidência entre as DPMOs, sendo descrita como “uma placa branca com um risco questionável de câncer que só pode ser diagnosticado uma vez que outras condições específicas tenham sido descartadas” (Warnakulasuriya et al., 2007 citado por Warnakulasuriya et al.²⁸, p.1864).

Ela é utilizada para exclusão de lesões brancas e lesões mistas brancas e vermelhas, no estabelecimento de diagnósticos clínicos (Warnakulasuriya, 2019 citado por Warnakulasuriya et al.²⁸).

Sua prevalência é maior em homens tabagistas e/ou alcoolistas¹¹ e se apresenta em duas formas clínicas, podendo ser homogênea (LOH) e não homogênea (LOHN) (van der Waal, 2019; Warnakulasuriya et al., 2020 citados por Warnakulasuriya et al.²⁸), que são diferenciadas com base nas características clínicas de cor e textura da superfície.

A leucoplasia homogênea se apresenta como uma placa/mancha branca uniforme e fina (Lee et al., 2006; Pentenero et al., 2003 citados por Warnakulasuriya et al.²⁸). Já a leucoplasia não homogênea pode ser encontrada com várias características clínicas, como por exemplo nodular ou verrucosa. Ela apresenta maior risco de malignização em comparação com a LOH e pode apresentar variados locais de displasia (Diz et al., 2011; Speight et al., 2018 citados por Warnakulasuriya et al.²⁸), o que prediz a importância de selecionar o local correto na realização da biópsia.

Segundo a OMS 2017, a LO apresenta características microscópicas que variam de aspectos de hiperqueratose sem ou com graus de displasia, podendo ser leve, moderada ou severa, até um carcinoma in situ⁷. Portanto, a biópsia é obrigatória para o estabelecimento do diagnóstico da lesão.

Em relação à transformação maligna, revisão sistemática atual definiu estimativas superiores de 1,1% a 40,8%⁵ sendo relacionadas mulheres acima de 50 anos e um aumento do risco com o avanço da idade (Napier, Speight, Warnakulasuriya, Ariyawardana citados por Aguirre-Urizar JM et al.²⁹). Além disso, o tipo clínico não homogêneo e a presença de displasia epitelial oral estão entre esses importantes indicadores de risco²⁹, apesar de não predizerem que todas as lesões com displasia sofrerão transformação. IARC, 2004 também estabeleceu a relação entre Betel quid e a malignização, principalmente entre pacientes asiáticos.²⁹

Warnakulasuriya et al.²⁹, também constataram que o sítio oral de maior malignização da LO foi a língua (56,3%), seguida do assoalho bucal, mucosa bucal e lábio (Qarsdashti et al., 2017; Wang et al., 2019 citados por Aguirre-Urizar et al.²⁹), sendo que essa prevalência da localização parece se relacionar ao estilo de vida e geografia das diferentes populações.

Devido à grande heterogeneidade das LOs, o maior desafio entre os casos é a previsão de progressão para uma neoplasia maligna, por isso se torna necessário estabelecer critérios clínico-patológicos padronizados e universais para estudos mais detalhados de malignização, fundamental para determinação de diagnóstico precoce e de um tratamento eficaz²⁹.

O tratamento definido para LO se trata de observação cuidadosa e pode variar até a ressecção completa, quando se mostra necessária⁹.

3.3 Leucoplasia verrucosa proliferativa

A LVP passou a ser reconhecida como uma Desordem Potencialmente Maligna em uma atualização recente do relatório que compreende cânceres de cabeça e pescoço²⁸.

A Leucoplasia Verrucosa Proliferativa é definida como uma forma distinta de leucoplasia oral multifocal caracterizada por ter um curso clínico progressivo, alterando características clínicas e histopatológicas (Cabay et al., Iocca et al. citados por Warnakulasuriya et al.²⁸) e apresenta forte tendência a malignização na maioria dos casos, podendo variar de carcinomas verrucosos orais, convencionais ou de

células escamosas (Gandolfo et al.; Silverman, Gorsky, Vila et al. citados por Warnakulasuriya et al.²⁸).

Clinicamente, se apresenta por placas brancas difusas e múltiplas, com prevalência maior em mucosa jugal e gengiva, sendo a gengiva a que apresenta maior número de malignizações³⁰.

Etiopatogenia ainda não foi definida e não há muitos fatores de risco que possam ser associados à malignização, apesar da maioria dos pacientes afetados serem mulheres e com idades acima de 50 anos, e não apresenta forte associação com álcool ou tabaco³⁰.

A característica multifocal desse distúrbio explica a manifestação que se inicia com uma ou mais leucoplasias, que em seguida se disseminam para outros sítios gradualmente (Batsakis et al.; Villa et al. citados por Warnakulasuriya et al.²⁸).

Para diagnóstico definitivo, devido à progressão da doença que ocorre de forma lenta e das características clínicas nem sempre serem o suficiente, é necessário um longo tempo de observação e acompanhamento dos achados clínicos e histológicos^{30,31}.

Segundo sugerem Hansen et al.¹⁵, o método de diagnóstico clínico-patológico propõe a análise de características clínicas e histológicas para a observação da malignização. Posteriormente, foram definidos como alguns critérios, múltiplos sítios afetados e presença de áreas verrucosas (Cerero-Lapiedra et al.; Carrard et al. citados por Warnakulasuriya et al.²⁸). Em sequência, foi definido que inicialmente podem se tratar apenas de lesões brancas planas (Batsakis et al.; Villa et al. citados por Warnakulasuriya et al.²⁸), e foi incluído a possibilidade de aparência liquenóide (Garcia-Pola et al.; McParland, Warnakulasuriya citados por Warnakulasuriya et al.²⁸).

Se trata, portanto, de uma lesão de característica agressiva, com grande quantidade de pacientes apresentando malignização, com taxas entre 49,5% (Iocca et al. citado por Warnakulasuriya et al.²⁸) e que se apresentam sem tendência a remissão espontânea e resistentes ao tratamento (Hansen et al. citado por Warnakulasuriya et al.²⁸). A necessidade de padronização, de mais estudos longitudinais e do entedimento de mecanismos moleculares da lesão, é vital e pode auxiliar na formulação de tratamentos mais eficazes²⁸.

3.4 Líquen plano oral

Segundo Carrozzo et al.³², o líquen plano oral (LPO) é uma doença com manchas reticulares brancas bilaterais afetando mucosa bucal, língua e gengiva, e que podem apresentar áreas atróficas ou erosivas. Se trata de uma doença autoimune oral, que tem risco de progressão significativa após os 40 anos de idade³³.

Para seu diagnóstico e diferenciação da LPO e outras doenças, além das características clínicas, também foram determinados critérios histopatológicos que são aspectos autoimunes, no caso a presença de um infiltrado inflamatório de linfócitos T em banda em córion e presença de degeneração da camada basal do epitélio (van der Meij et al.; van der Meij e van der Waal citados por González-Moles et al.³³).

O índice de malignidade dessa DPMOs varia em diferentes estudos, de acordo com o método de estudo. Esses valores ficam entre 1,09% (Fitzpatrick et al. citado por González-Moles et al.³³) e 2,28%, sendo esta uma revisão mais recente³³. Para esse índice, assim como em outros estudos, foram realizadas variadas revisões, critérios metodológicos e, principalmente, foi considerada a presença e a gravidade da displasia epitelial como principal fator de risco³³. Estudos encontraram ainda taxas maiores em lesões erosivas ou com áreas vermelhas, sendo a língua o local com maior incidência (González-Moles et al., Idrees et al., citados por González-Moles et al.³⁴).

No entanto, esses índices ainda apresentam muitas variações e são necessárias mais pesquisas, sob melhores e mais minuciosos critérios, para uma definição de qualidade, em relação à LPO e às lesões relacionadas³⁴.

O líquen plano também apresenta características semelhantes com outras lesões, sendo a Lesão liquenóide oral àquela mais conflitante, sendo excluídas de estudos apenas por se mostrarem clinicamente como lesões unilaterais (Meij et al.; van der Meij e van der Waal citados por Ramos-García et al.³⁴).

3.5 Macrófagos e imunologia tumoral

O sistema imunológico tem sido pouco explorado em estudos para prever o curso de transformação maligna de lesões²⁵, mas a importância dele na progressão e, também possivelmente, na iniciação dos tumores tem sido cada vez mais evidenciada³⁵⁻³⁸ e, por isso, há um maior interesse nos macrófagos, importantes

células que possuem um papel na imunidade inata e adquirida e na imunorregulação³⁹.

Para a biologia tumoral, foi comprovada a notabilidade do número, estado de ativação e polarização dos macrófagos⁴⁰⁻⁴².

Quanto à polarização, os macrófagos M1 são responsáveis pelas reações inflamatórias, e os M2 pela imunorregulação, reparação tecidual, cicatrização de feridas, imunossupressão e progressão tumoral²⁵.

Quanto aos marcadores, o CD68 é responsável pela detecção de monócitos e macrófagos independente de sua polarização⁴³⁻⁴⁵.

O estudo de Weber et al.²⁵ revelou a associação da elevada presença de macrófagos e sua polarização com malignização do líquen plano oral, a partir de três marcadores, sendo eles CD68, CD163 e CD11c. Como já havia sido comprovada uma associação de macrófagos em carcinomas de células escamosas metastáticas³⁹, esses dados comprovam um aumento dessas células desde o estágio inicial da lesão até a transformação maligna, e em seguida até a evolução de metastases²⁵.

Além disso, também foi revelada um aumento do grau de polarização M2, associada a transformação maligna no LPO²⁵, essa polarização pode contribuir por secretar crescimento celular e vascular⁴⁶.

Estudos com macrófagos, portanto, se tornam importantes tanto para previsão de transformação maligna quanto para potencialmente virar alvo de tratamento e auxiliar na produção da melhor terapia para cada caso e paciente, já que atualmente só é utilizado a presença e grau de displasia^{13,47,49}. Essa avaliação histomorfológica de displasia nem sempre é a ideal em todos os casos, no âmbito do tratamento e do diagnóstico de lesões de alto e baixo risco, sendo ainda pouco preditiva^{13,50,52-56}.

No entanto, ainda são necessários variados estudos para confirmar o valor dos macrófagos como antecipação de malignização do LPO²⁵.

Já o estudo de Troiano et al., evidenciou o papel dos macrófagos na imunologia do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço⁵⁷. No microambiente tumoral são relatados macrófagos associados ao tumor (TAMs), sendo mais frequentes no ninho do tumor e estroma⁵⁸, quanto a estes, inferiu-se que a polarização revelava o prognóstico tumoral^{59,60}.

Portanto, foi demonstrado que os macrófagos M2 polarizados, pelo marcador CD163⁶¹, e sua expressão no estroma tem relação com um pior prognóstico e baixa sobrevida dos pacientes⁵⁷.

Apesar de serem necessários mais estudos prospectivos, esses resultados podem evidenciar uma terapia direcionada, baseada em imunoterapia⁵⁷, o que pode auxiliar no fato da maioria dos tumores desenvolverem mecanismos de resistência a drogas anticancerígenas²⁶.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi submetido e aprovado pelo CEP/FOAr - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP (CAAE: 34361814.9.0000.5416).

4.1 Avaliação da densidade e polarização de macrófagos M1/M2 no LPO e em lesões leucoplásicas de LO e LVP

Foram utilizadas amostras de tecidos parafinados, previamente coletadas durante o período de 2015 e 2016, divididas em 5 grupos. O grupo 1 foi composto por 6 amostras de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) que foram utilizadas como controle. O grupo 2 foi composto por 15 amostras de LPO com tempo mínimo de acompanhamento de 5 anos. O grupo 3 foi composto por 16 amostras de tecido parafinado oriundas de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LLO. O grupo 4 foi composto por 19 amostras de tecido parafinado oriundas de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LO. O grupo 5 foi composto por fragmentos de biópsias obtidos em diferentes momentos do acompanhamento clínico de 12 pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LVP. Este arquivo foi constituído de 27 blocos de tecido parafinado, obtidos em um período médio de acompanhamento de 88 meses com uma média de 2 biópsias por indivíduo. Foram excluídas amostras que revelavam microscopicamente um carcinoma in situ, carcinoma espinocelular ou carcinoma verrucoso.

As informações clínicas, demográficas, de tratamento, recidiva e transformação maligna foram coletadas dos prontuários clínicos e os blocos de parafina foram submetidos a dois novos cortes com 5 µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (H&E), e posteriormente analisados para descrição morfológica e confirmação do diagnóstico. As reações de imuno-histoquímica (IHQ) foram realizadas em cortes histológicos de 3 µm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas devidamente revestidas com organo-silano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os cortes obtidos foram submetidos à técnica IHQ com dupla marcação antigênica por meio do sistema EnVision™ G|2 Doublestain System, Rb/Mo (DAB+/Permanent Red, K5361, Dako). Este sistema emprega a ação de duas enzimas, a peroxidase (HRP) que utiliza o cromógeno DAB, e a fosfatase alcalina (AP)

que utiliza o cromógeno Permanent Red. Os anticorpos primários utilizados neste projeto estão descrito em detalhes na Tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos primários que serão utilizados nos experimentos de IHQ para identificação de macrófagos

Marcador	Anticorpo	Espécie	Fornecedor	Diluição
M1-M ϕ	CD68	Monoclonal Mouse Anti-Human	DAKO	1:80
M2-M ϕ	CD163	Monoclonal Mouse Anti-Human	Leica	1:200
Macrófagos M1 (M1-M ϕ) e Macrófagos M2 (M2-M ϕ).				

Fonte: Elaboração própria.

Para a quantificação foram realizadas fotos de cinco campos representativos das áreas intra-epitelial e sub-epitelial separadamente com uma câmera Olympus DP25 (Olympus, Center Valley, PA, EUA) acoplada ao microscópio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tóquio, Japão) utilizando objetiva 20x. As células positivas foram contadas por dois examinadores independentes, utilizando o software Image J (versão 1.52, NIH, Bethesda, MD, EUA).

Os dados foram tabulados e a distribuição normal ou não-normal foi determinada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e pela análise descritiva de Skewness and Kurtosis para posterior aplicação de testes estatísticos adequados segundo a distribuição dos dados. A análise estatística para comparação dentro dos grupos foi realizada pelo teste T-student e teste de Wilcoxon-Mann-Whitney quando não há distribuição normal dos dados. Para análise das comparações múltiplas dentro dos grupos foram realizadas análises de variância (ANOVA ONE-WAY) e Kruskal Wallis, segundo a distribuição das amostras (normal ou não-normal). Na presença de diferença estatística significativa, o pós-teste de Tukey e o pós-teste de Dunn foram executados, respectivamente. Quando apropriado, alguns resultados (por exemplo, polarização da resposta de células T) foram avaliados também de forma descritiva/qualitativa. O nível de significância adotado nas análises será de 95% ($p=0.05$) e o software utilizado para as análises será o Prism 4, GraphPad Software Inc.

5 RESULTADOS

Um total de 62 pacientes foram incluídos neste estudo, sendo 15 pacientes de LPO, 16 pacientes de LLO, 19 pacientes de LO e 12 pacientes de LVP. Todos os dados clínico-patológicos dos pacientes foram resumidos na Tabela 2.

5.1 Características clínicas das amostras

Todas as amostras de LPO e LLO incluídas nesse estudo não apresentavam displasia epitelial ou transformação maligna. Por outro lado, as amostras de LO e LVP foram divididas de acordo com o risco de transformação maligna, revelando 13 (68,4%) e 16 (59,3%) amostras de baixo risco e 6 (31,6%) e 11 (40,7%) amostras de alto risco, respectivamente para cada grupo. Destes, 7 pacientes do grupo LVP (58,3%) revelaram transformação maligna para CEC ou carcinoma verrucoso (CV), enquanto apenas 3 pacientes do grupo LO (15,8%) mostraram transformação maligna para CEC. Mulheres brancas que não faziam uso de tabaco ou álcool representaram a maioria dos casos nos grupos LPO, LLO e LVP enquanto o grupo LO foi representado principalmente por homens (57,9%). Todos os pacientes dos grupos LPO, LLO e LVP tinham lesões em múltiplos sítios e a mucosa jugal foi o sítio mais afetado, seguido pela língua. Os pacientes do grupo LO apresentaram um único sítio oral afetado, sendo o sítio oral mais comum a língua.

Todos os pacientes incluídos nesse estudo tiveram um acompanhamento de no mínimo 5 anos após a confirmação do diagnóstico. No grupo de LVP, 7 pacientes (46,6%) apresentaram uma aparência liquenóide antes do estabelecimento do diagnóstico de PVL, sendo erroneamente diagnosticados como LPO (Tabela 3). Neste ponto, a aparência clínica mais comumente observada nos 7 casos foram de lesões brancas reticulares com áreas erosivas. Em 3 casos os pacientes reportaram sintomatologia e foi realizado tratamento tópico e sistêmico. O período médio de acompanhamento antes do diagnóstico de LVP foi de 7 anos (variando de 2 a 15 anos). Considerando esses casos, houve uma predominância de displasia epitelial leve e 3 casos sofreram transformação maligna para CEC ou CV. As alterações nas características clínicas e microscópicas que levaram ao estabelecimento do diagnóstico de LVP não se restringiram aos sítios orais com o aspecto clínico liquenóide inicial. As figuras 1 e 2 representam os aspectos clínicos do paciente 1 citados na tabela 3.

Tabela 2 - Características clínico-patológicas dos indivíduos do grupo LO e LVP selecionados para a análise imuno-histoquímica

Parâmetros	LLO (n=16) n (%)	LPO (n=15) n (%)	LO (n=19) n (%)	LVP (n=12) n (%)
Idade				
Média de anos	53,8	49,7	55,2	64,3
Sexo				
Masculino	4 (25,0)	4 (26,7)	11 (57,9)	6 (50,0)
Feminino	12 (75,0)	11 (73,3)	8 (42,1)	6 (50,0)
Raça				
Branco	13 (81,3)	13 (86,7)	15 (78,9)	12 (100)
Não-brancos	3 (18,8)	2 (13,3)	4 (21,1)	0 (0,0)
Tabaco				
Não	9 (56,3)	11 (73,3)	9 (47,4)	8 (66,7)
Sim	7 (43,7)	4 (26,7)	10 (52,6)	4 (33,3)
Álcool				
Não	16 (100)	13 (86,7)	18 (94,7)	10 (83,3)
Sim	0 (0,0)	2 (13,3)	1 (5,3)	2 (16,7)
Sítios orais				
Mucosa jugal direita	14 (87,5)	13 (86,7)	4 (21,0)	6 (50,0)
Mucosa jugal esquerda	14 (87,5)	13 (86,7)	4 (21,0)	6 (50,0)
Assoalho bucal	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (33,3)
Gengiva maxilar	4 (25,0)	5 (33,3)	0 (0,0)	2 (16,7)
Gengiva mandibular	2 (12,5)	3 (20,0)	2 (10,5)	4 (33,3)
Mucosa labial superior	0 (0,0)	1 (6,7)	0 (0,0)	2 (16,7)
Mucosa labial inferior	1 (6,3)	3 (20,0)	1 (5,2)	2 (16,7)
Língua	14 (87,5)	9 (60,0)	6 (31,5)	5 (41,7)
Palato	3 (18,8)	0 (0,0)	2 (10,5)	3 (25,0)
Risco histopatológico				
Baixo risco	-	-	13 (68,4)	16 (59,3) ^{††}
Alto risco	-	-	6 (31,6)	11 (40,7) ^{††}
Transformação maligna				
Não	14 (100)	14 (100)	16 (84,2)	5 (41,7)
Sim	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (15,8)	7 (58,3)
Recidiva				
Não	-	-	19 (100)	3 (25,0)
Sim	-	-	0 (0,0)	9 (75,0)

^{††} Número de eventos considerando a quantidade de amostras parafinadas (n=27) obtidas a partir do grupo LVP (n=12).

*Valor de $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa.

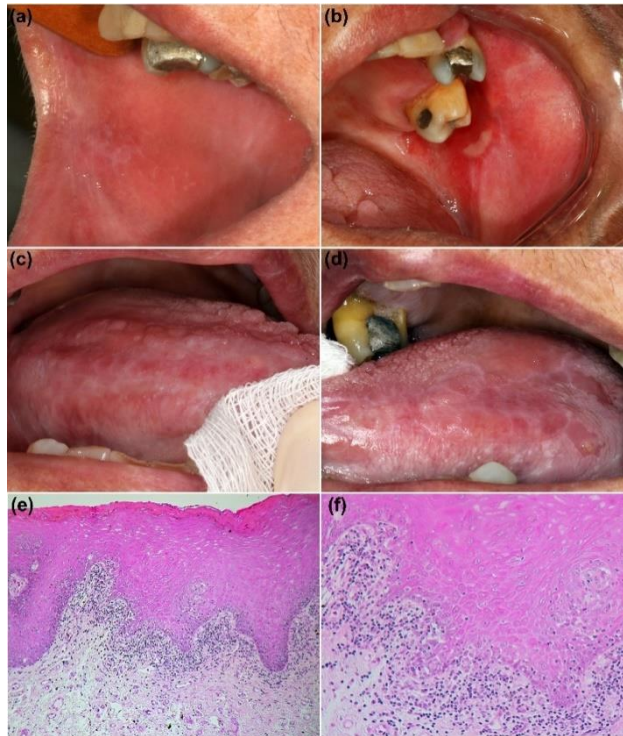
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos casos que apresentavam aspecto liquenóide antes do estabelecimento de diagnóstico de LVP

Caso	Sexo	Idade	Tabaco	Sítio oral ^b	Tipo clínico ^c	Acompanhamento ^d	Terapia ^e	Diagnóstico clínico-patológico da LVP			
								Sítio oral ^f	Histopatológico ^g	Acompanhamento ^h	Estado
#1	F	67	Não	RBM, LBM, T	Eros/Ret	4 anos	Não	MLI, MdG, L, AB, P	MiED, MoED	5 anos	Vivo com LVP
#2	M	63	Sim	FM, T	Ret	2 anos	Não	AB, L	H, MiED	20 anos	Vivo com LVP
#3	M	58	Não	MBD, MBE, MxG, MbG,	Ret	4 anos	CT	MBD, MBE, MLS, MxG, MdG, L	H, MoED, CV, CEC	12 anos	Morreu com CEC
#4	F	27	Sim	MBD, MBE, L, AB, P	Eros/Ret	10 anos	CS, LLLT	MBD, MBE, MdG, L, P	H, MoED, SeED, HV, CV	28 anos	Vivo com LVP
#5	F	38	Sim	MBD, MBE, MxG, AB	Ret	15 anos	Não	MBD, MBE, MLS, MxG, MdG, AB, P	H, MiED, SeED, HV, CV, CEC	10 anos	Morreu com CEC
#6	F	75	Não	MBD, MBE, MdG, L, AB	Eros/Ret	4 anos	CT	MBD, MBE, MdG, L, AB	H, MiED, HV	5 anos	Vivo com LVP
#7	F	45	Não	MBD, MBE, MdG, L	Ret	12 anos	Não	MBD, MBE, MdG, L	H, MiED, MoED	12 anos	Vivo com LVP

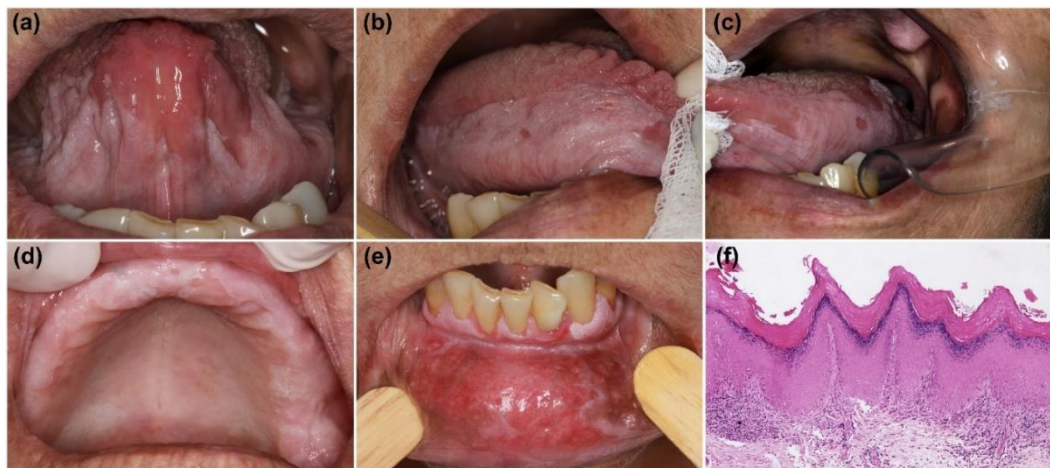
(^a)F=Feminino; M=Masculino. (^b)Sítios orais que mostraram lesões com aspecto liquenóide. MBD=Mucosa Bucal Direita; MBE=Mucosa Bucal Esquerda; MLS=Mucosa labial superior; MLI=Mucosa labial inferior; L=Língua; AB=Assoalho Bucal; MxG=Gengiva maxilar/rebordo alveolar; MdG= Gengiva mandibular/rebordo alveolar; P=Palato. (^c)Padrão clínico no momento do diagnóstico de LPO. Eros=Erosivo; Ret=Reticular. (^d)Tempo de acompanhamento antes do estabelecimento de diagnóstico de LVP. (^e)Tratamento para controlar os sintomas de lesões com aspecto liquenóide. CT=Corticosteróide Tópico; CS=corticosteróide Sistêmico; LLLT= Terapia a laser de baixa intensidade. (^f)Sítios orais que apresentaram alterações clínico-patológicas compatíveis com o diagnóstico de LVP. (^g)H= Hiperqueratose sem displasia epitelial; MiED=Displasia epitelial leve; MoED=Displasia epitelial moderada; SeED= Displasia epitelial severa; HV=Hiperplasia verrucosa; CV=Carcinoma verrucoso; CEC=Carcinoma de células escamosas. (^h) Tempo de acompanhamento após o estabelecimento do diagnóstico de LPV.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 1 - Caso 1 descrito na tabela 2

(a-d) Achados clínicos de um paciente com LVP antes do estabelecimento do diagnóstico demonstrando aparência de líquen plano oral. (e) Características histopatológicas mostrando inflamação liquenóide na interface do tecido conjuntivo associada à acantose (H&E, aumento de 10x) e (f) em detalhes a degeneração da liquefação (H&E, aumento de 20x).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 2. Caso 1 descrito na tabela 2

(a-e) Após 4 anos de acompanhamento o paciente apresentava lesões brancas em placas verrucosas em múltiplos sítios orais. (f) As características histopatológicas revelaram hiperplasia verrucosa e queratose proeminente com displasia epitelial leve/moderada (H&E, aumento de 10x).

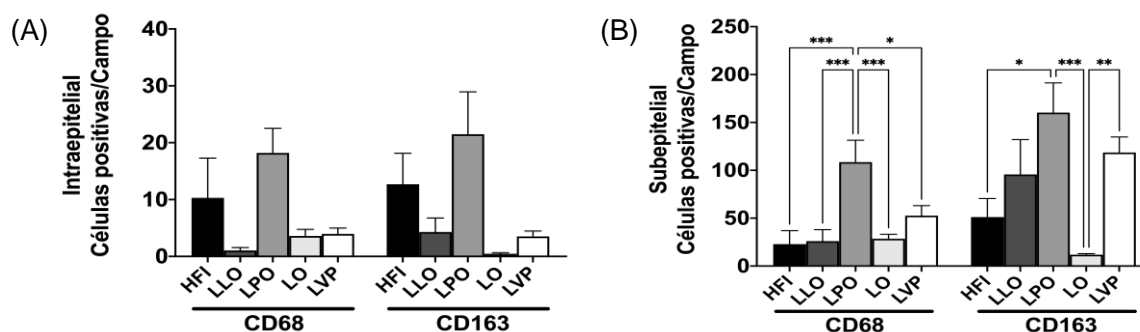
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.2 Densidade e polarização de macrófagos M1/M2

Na análise de polarização de macrófagos M1/M2 foi observado que a grande maioria das células CD68+ e/ou CD163+ foram distribuídas no compartimento subepitelial dos três grupos estudados. De modo geral, foi observado uma quantidade ligeiramente maior de células CD163+ do que células CD68+; exceto para o grupo LO que mostrou um predomínio de células CD68+ no compartimento epitelial e subepitelial.

Análise estatística dos dados mostrou que o número de células CD68+ na região subepitelial no grupo LPO foi significativamente maior em relação aos outros grupos. Por outro lado, encontramos uma redução estatisticamente significativa de células CD163+ na LO em relação ao LPO ($p < 0,0001$) e LVP ($p = 0,001$), assim como no HFI em relação ao LPO ($p = 0,011$) (Figura 3). Nenhuma associação entre a densidade de células CD68+ ou CD163+ com o grau de displasia epitelial ou história de transformação maligna foi evidenciada nos grupos. Adicionalmente, encontramos um aumento estatisticamente significativo da razão CD163+/CD68+ em amostras de LVP em relação à HFI ($p = 0,001$) e LO ($p < 0,0001$). Contudo, os resultados revelaram uma associação significativa entre a diminuição da razão CD163+/CD68+ com o histórico de transformação maligna tanto em lesões displásicas de baixo e alto risco na LVP ($p < 0,001$). Na figura 4 observam-se os gráficos descritivos obtidos com a análise da razão CD163+/CD68+. Deve-se destacar que a taxa de transformação maligna da LVP é a maior entre estas DPMOs.

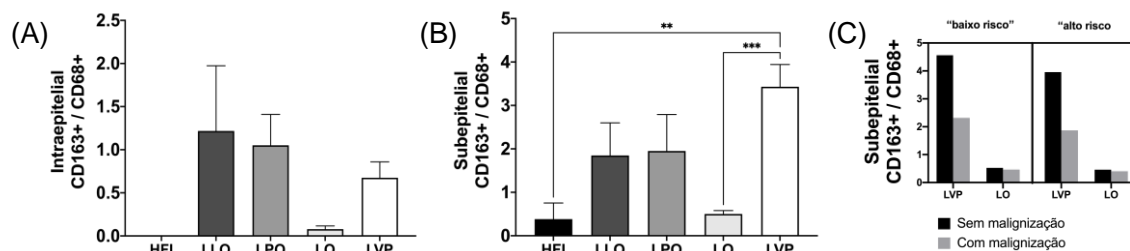
Figura 3 – Análise estatística Intra e Subepitelial



Análise estatística dos dados mostrou que o número de células CD68+ na região subepitelial no grupo LPO foi significativamente maior em relação aos outros grupos. Por outro lado, encontramos uma redução estatisticamente significativa de células CD163+ na LO em relação ao LPO e LVP, assim como no HFI em relação ao LPO. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 – Resultados entre a razão CD163+/CD68+



Resultados revelaram um aumento da razão CD163+/CD68+ em amostras de LVP em relação à HFI e LO. Por outro lado, uma diminuição da razão CD163+/CD68+ parece estar associado com o histórico de transformação maligna em lesões displásicas de baixo e alto risco na LVP ($p > 0,0001$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Existem alguns estudos na literatura atual que avaliam a densidade dos macrófagos no líquen plano oral e lesão líquenóide oral (Vered et al., Motta et al., citados por Ferrisse et al.²⁶). O primeiro estudo a avaliar a densidade de macrófagos CD163+ (M2) na LPO foi em 2013, no qual os autores concluíram que tais macrófagos são menos expressos do que outros biomarcadores dendríticos e linfocíticos pró-inflamatórios (Vered et al. citado por Ferrisse et al.²⁶). No entanto, macrófagos CD163+ foram encontrados por serem mais frequentemente expressos na forma variante erosiva de LPO do que nas formas hiperqueratócicas (Vered et al. citado por Ferrisse et al.²⁶). Apesar de estudos anteriores mostrarem o contrário, o presente não houve diferenças significativas observadas na densidade dos subtipos de macrófagos CD68+ e CD163+ quando comparada a variante clínica de LPO e LLO. Apesar dos diferentes aspectos clínicos entre as formas erosiva e reticular do LPO, existem alguns sintomas específicos associados a cada variante clínica, sendo que a forma erosiva geralmente é relatada precedida de dor e queimação, enquanto esses sintomas geralmente estão ausentes na forma reticular (Boñar-Álvarez et al. citado por Ferrisse et al.²⁶). Outros estudos são necessários para o estabelecimento de diferenças entre características clínicas de LPO e LLO.

Semelhante aos nossos resultados, outro estudo avaliando as diferenças na densidade de macrófagos CD163+ na doença crônica do enxerto contra o hospedeiro e LPO não encontrou resultados significativos (Motta et al. citado por Ferrisse et al.²⁶). Para método de estudo, foi avaliado macrófagos CD68+ (M1) em LLO e comparado com o LPO. Anteriormente, este marcador havia sido mais frequentemente observado na LPO, em comparação com o CD163 (Merry et al. citado por Ferrisse et al.²⁶).

CD68 é uma glicoproteína transmembrana tipo I altamente glicosilada, que está principalmente associada aos compartimentos endossomais e lisossômicos da célula. Este marcador pode ser usado para identificar células da linhagem de macrófagos, como histiócitos, células gigantes multinucleadas e osteoclastos (Holness e Simmons, citado por Ferrisse et al.²⁶), e para os diferenciar imuno-histoquimicamente de células dendríticas, já que o CD68 não é expresso por elas (Brooks et al., Bobryshev, citados por Ferrisse et al.²⁶). Ainda não é claro o papel do CD68 na inflamação e imunidade (Chistiakov et al. citado por Ferrisse et al.²⁶). Certas evidências indicam que a ausência da expressão de CD68 não afetou a capacidade das células de apresentar

antígenos ou induzir respostas imunes humorais (Song et al. citado por Ferrisse et al.²⁶). Ademais, as células com essa ausência quando comparadas com as densidades de células dendríticas mostraram maior capacidade de apresentação das células T CD4+, portanto foi constatada que o CD68 pode atrapalhar tanto a captação de antígeno quanto o tráfico complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Song et al. citado por Ferrisse et al.²⁶).

Assim sendo, pode-se presumir que o aumento dos níveis de macrófagos CD68+ no LPO pode resultar em uma resposta autoimune citotóxica, já que é associada predominantemente a molécula de MHC I e os linfócitos CD8+ se apresentam como a maioria dos linfócitos infiltrantes (Vered et al., citado por Ferrisse et al.²⁶). Além disso, o aumento do número de infiltração de células CD4+ quando comparadas aos linfócitos CD8+ está associada a uma resposta favorável ao tratamento de LPO (Vered et al. citado por Ferrisse et al.²⁶). Portanto, este marcador e seus mediadores inflamatórios, como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, CCL5, CCL8, CXL4 e CXL12, podem ser o caminho para a definição de uma terapêutica mais específica, agindo como um alvo futuro para o tratamento e assim diminuindo os efeitos adversos da corticoterapia, já que esse macrófago realiza a modulação da resposta imune (Merry et al., Di Benedetto et al. citados por Ferrisse et al.²⁶). Já o LLO, diferente do LPO, apresenta um infiltrado com maior de linfócitos CD4+, isso pode auxiliar na distinção dessas lesões, em casos que apenas os critérios clínicos não são suficientes (van der Wall, van der Meij e van der Waal, citados por Ferrisse et al.²⁶).

O receptor scavenger de hemoglobina ou CD163 é uma proteína de membrana que pode indicar a resposta tecidual à inflamação pelos macrófagos (Etzerodt e Moestrup, citado por Ferrisse et al.²⁶). Além do CD68, o CD163 também pode ajudar a distinguir imuno-histoquimicamente macrófagos de células dendríticas (Etzerodt e Moestrup citado por Ferrisse et al.²⁶). Além disso, muitos estudos comprovaram que esse marcador também é predominante em doenças inflamatórias crônicas (Greisen et al., Nakayama et al., citados por Ferrisse et al.²⁶), e a redução deste no desenvolvimento de doenças autoimunes é controversa na literatura (Smith et al., 2009; Nielsen e Ainsworth, 2013 citados por Ferrisse et al.²⁶).

Segundo nossos resultados, a densidade de macrófagos CD163+ em LPO, LLO e HFI, é praticamente a mesma, o que os associa a condições de inflamação crônica. Além disso, a maioria dos pacientes com LPO no presente estudo mostrou

uma excelente resposta após tratamento com propionato de clobetasol 0,05%. Portanto, essa alta expressão de macrófagos CD163+ pode estar associada que a um melhor prognóstico nos pacientes após o uso de corticosteróides, no entanto, mais estudos são necessários para estabelecer o papel preciso de CD163 em doenças inflamatórias²⁶.

A partir da razão entre os marcadores, constatou-se que eles são variáveis que se elevam juntas direta e positivamente. Em outras palavras, a densidade de macrófagos CD68+, que tem perfil pró-inflamatório, não reduz diretamente a densidade de macrófagos CD163+, que atuam com uma resposta anti inflamatória. Além disso, a IL-6 e o TNF- α são um dos mais potentes estimuladores da expressão de CD163, e ambos podem ser produzidos por macrófagos CD68+ (Etzerodt e Moestrup, Di Benedetto et al. citados por Ferrisse et al.²⁶). A diferença entre esses tipos de macrófagos em LPO e LLO devem analisar de forma complementar com um modelo de regressão linear para avaliar se existem dependências entre as expressões uns dos outros.

A taxa de transformação maligna do LPO é um assunto ainda controverso, sendo que revisão sistemática recente mostrou que ela não foi significativa, não indicando a possibilidade de malignização (Giuliani et al. citado por Ferrisse et al.²⁶). Porém, outras revisões demonstram uma taxa que varia entre 1,14% e 2,28% (González-Moles et al., Gonzáles-Moles, Ramos-García e Warnakulasuriya, Iocca et al. citados por Ferrisse et al.²⁶). Entre as inúmeras variáveis clínicas e histológicas associadas para diagnosticar LPO, o fumo, álcool, aparência clínica vermelha e a região geográfica foram relacionadas à transformação maligna (González-Moles et al. citado por Ferrisse et al.²⁶), sendo que a inflamação liquenóide na ausência de displasia em lesões orais também demonstrou correlação no aparecimento do carcinoma de células escamosas oral (Goodson et al. citado por Ferrisse et al.²⁶). Este fato também pode auxiliar na inclusão de LLO como desordem potencialmente maligna da mucosa oral com transformação maligna geral de 2,11% (Gonzáles-Moles, Ramos-García e Warnakulasuriya citados por Ferrisse et al.²⁶). Em relação aos macrófagos, são necessários mais estudos para estimar seu papel na malignização das lesões, no entanto, o carcinoma espinocelular oral já mostra que a alta presença de macrófagos CD68+ e CD163+ demonstra um pior prognóstico nos casos (Alves et al. citado por Ferrisse et al.²⁶).

Assim como outros estudos, este apresenta como limitação uma amostra reduzida e que pode influenciar nos resultados, no entanto cálculos amostrais foram utilizados e este se mostrou suficiente, podendo considerar os resultados do estudo como confiáveis. Na imuno-histoquímica, foram utilizados critérios de coloração forte e consecutiva para a contagem de células CD68+ e CD163+. Além disso, o uso de análises multivariáveis também pode eliminar o viés relacionado à avaliação imuno-histoquímica, uma vez que este tipo de análise estatística leva em consideração os valores de todas as variáveis dependentes²⁶.

Adicionais estudos devem ser incentivados e planejados com amostras maiores para confirmação dos resultados, preferencialmente com coortes prospectivos. Além de estudos para avaliar o papel dos macrófagos na malignização do LPO e de correlação de sua função associada a linfócitos²⁶.

7 CONCLUSÃO

Concluindo, uma avaliação baseada puramente na quantificação de macrófagos CD68+ e CD163+ em diferentes DPMOs, não é capaz de explicar as diferenças nas taxas de transformação maligna. Contudo, distintas formas de interação destas células com outras células do sistema imunológico podem explicar a associação encontrada entre a diminuição da razão CD163+/CD68+ e o histórico de transformação maligna na LVP.

REFERÊNCIAS*

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.
2. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 329-60.
3. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 2006; 90: 1-50.
4. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21(2): 137-48.
5. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917): 860-7.
6. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(10): 715-27.
7. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Tumours of the oral cavity and mobile tongue. *In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. World Health Organization (WHO) classification of head and neck tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC). 4th ed. Lyon: IARC Press, 2017; 105–15.*
8. 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.
9. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol*. 2010; 46(6): 423-5.
10. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*. 2003; 39(8): 770-80.
11. Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent*. 2010; 2010: 186018.
12. Ganesh D, Sreenivasan P, Öhman J, Wallström M, Braz-Silva PH, Giglio D et al. Potentially malignant oral disorders and cancer transformation. *Anticancer Res*. 2018; 38(6): 3223-9.

* 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>

13. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018; 125(6): 612-27.
14. 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.
15. Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia: a long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60(3): 285-98.
16. 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.
17. Villa A, Sonis S. Oral leukoplakia remains a challenging condition. *Oral Dis.* 2018; 24(1-2): 179-83.
18. Müller S. Oral manifestations of dermatologic disease: a focus on lichenoid lesions. *Head Neck Pathol.* 2011; 5(1): 36-40.
19. 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.
20. 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.
21. Garcia-Pola MJ, Llorente-Pendás S, González-García M, García-Martín JM. The development of proliferative verrucous leukoplakia in oral lichen planus: a preliminary study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016; 21(3): e328-34.
22. Müller S. Oral lichenoid lesions: distinguishing the benign from the deadly. *Mod Pathol.* 2017; 30(s1): S54-S67.
23. Shigeoka M, Koma YI, Nishio M, Akashi M, Yokozaki H. Alteration of macrophage infiltrating compartment: a novel view on oral carcinogenesis. *Pathobiology.* 2021; 88(5): 327-37
24. Merry R, Belfield L, McArdle P, McLennan A, Crean S, Foey A. Oral health and pathology: a macrophage account. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 50(1): 2–7.
25. Weber M, Wehrhan F, Baran C, Agaimy A, Büttner-Herold M, Öztürk H et al. Malignant transformation of oral leukoplakia is associated with macrophage polarization. *J Transl Med.* 2020; 18(1): 11.

26. Ferrisse TM, de Oliveira AB, Palaçon MP, Silva EV, Massucato EMS, de Almeida LY et al. The role of CD68+ and CD163+ macrophages in immunopathogenesis of oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *Immunobiology*. 2021; 226(3): 152072.
27. Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis*. 2021; 27(8): 1947-76.
28. 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.
29. 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; 27(8): 1881-95.
30. Ramos-García P, González-Moles M, 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.
31. Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Cohen DM, Bilodeau EA, Bhattacharyya I, Lewis Jr 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.
32. Carrozzo M, Porter S, Mercadante V, Fedele S. Oral lichen planus: a disease or a spectrum of tissue reactions? types, causes, diagnostic algorithms, prognosis, management strategies. *Periodontol 2000*. 2019; 80(1): 105–25.
33. González-Moles MÁ, Ramos-García P, Warnakulasuriya S. An appraisal of highest quality studies reporting malignant transformation of oral lichen planus based on a systematic review. *Oral Dis*. 2021; 27(8): 1908-18.
34. Ramos-García P, González-Moles MÁ, Warnakulasuriya S. Oral cancer development in lichen planus and related conditions-3.0 evidence level: a systematic review of systematic reviews. *Oral Dis*. 2021; 27(8): 1919-35.
35. Watanabe Y, Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O, Hashimoto K. Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4(+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(5): 744–52.
36. Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol*. 2011; 8(1): 59–66.

37. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2013; 108(4): 914–23.
38. Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res*. 2011; 167(2): e211–9.
39. Weber M, Büttner-Herold M, Hyckel P, Moebius P, Distel L, Ries J et al. Small oral squamous cell carcinomas with nodal lymphogenic metastasis show increased infiltration of M2 polarized macrophages--an immunohistochemical analysis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014; 42(7): 1087–94.
40. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol*. 2007; 37(1): 14–6.
41. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013; 229(2): 176–85.
42. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012; 122(3): 787–95.
43. Cao X, Shen D, Patel MM, Tuo J, Johnson TM, Olsen TW et al. Macrophage polarization in the maculae of age-related macular degeneration: a pilot study. *Pathol Int*. 2011; 61(9): 528–35.
44. Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol Int*. 2009; 59(5): 300–5.
45. Cho KY, Miyoshi H, Kuroda S, Yasuda H, Kamiyama K, Nakagawara J et al. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013; 22(7): 910–8.
46. Marchetti A, Di Lorito A, Buttitta F. Why anti-PD1/PDL1 therapy is so effective? Another piece in the puzzle. *J Thorac Dis*. 2017; 9(12): 4863–6.
47. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol 2000*. 2011; 57(1): 19–37.
48. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36(10): 575–80.
49. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med*. 2016; 45(3): 155–66.

50. Speight PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head Neck Pathol.* 2007; 1(1): 61–6.
51. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. *Cancer.* 1984; 53(3): 563–8.
52. Ries J, Agaimy A, Vairaktaris E, Gorecki P, Neukam FW, Strassburg LH et al. Detection of MAGE-A expression predicts malignant transformation of oral leukoplakia. *Cancer Invest.* 2012; 30(7): 495–502.
53. Ries J, Agaimy A, Vairaktaris E, Kwon Y, Neukam FW, Strassburg LH et al. Evaluation of MAGE-A expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. *Int J Oncol.* 2012; 41(3): 1085–93.
54. Ries J, Vairaktaris E, Agaimy A, Bechtold M, Gorecki P, Neukam FW et al. The relevance of EGFR overexpression for the prediction of the malignant transformation of oral leukoplakia. *Oncol Rep.* 2013; 30(3): 1149–56.
55. Troiano G, Caponio VCA, Adipietro I, Tepedino M, Santoro R, Laino L et al. Prognostic significance of CD68+ and CD163+ tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2019; 93: 66-75.
56. Ireland LV, Mielgo A. Macrophages and fibroblasts, key players in cancer chemoresistance. *Front Cell Dev Biol.* 2018; 6:131.
57. Zhang H, Wang X, Shen Z, Xu J, Qin J, Sun Y. Infiltration of diametrically polarized macrophages predicts overall survival of patients with gastric cancer after surgical resection. *Gastric Cancer.* 2015; 18(4): 740–50.
58. Pantano F, Berti P, Guida FM, Perrone G, Vincenzi B, Amato MM et al. The role of macrophages polarization in predicting prognosis of radically resected gastric cancer patients. *J Cell Mol Med.* 2013; 17(11): 1415–21.
59. Almatroodi SA, McDonald CF, Darby IA, Pouniotis DS. Characterization of M1/M2 tumour-associated macrophages (TAMs) and Th1/Th2 cytokine profiles in patients with NSCLC. *Cancer Microenviron.* 2016; 9(1): 1–11.
60. Mielgo A, Schmid MC. Impact of tumour associated macrophages in pancreatic cancer. *BMB Rep.* 2013; 46(3): 131–8.
61. Zheng HC. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget.* 2017; 8(35): 59950–64.

ANEXO A – CERTIFICADO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA NO PROGRAMA PIBIC/CNPQ

	 unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	
<h3>Certificado</h3>		
<p>Certifico que Raphaela Sartori da Silva, portador(a) do CPF número 400.096.778-95, desenvolveu a pesquisa "AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE MACRÓFAGOS M1 E M2 EM DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS ORAIS." no âmbito do PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp, na modalidade Bolsa PIBIC CNPq, no período de 01/09/2021 a 31/08/2022, na(o) Faculdade de Odontologia de Araraquara da Unesp, sob a supervisão do(a) Professor(a) Andreia Bufalino.</p>		
<p>São Paulo, 8 de fevereiro de 2023</p>		
 Edson Cocchieri Botelho Pró-Reitor de Pesquisa Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"		