



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



Maria Leticia de Almeida Lança

**Expressão da Indoleamina 2,3 dioxigenase em carcinoma espinocelular
intraoral, labial, leucoplasia oral e queilite actínica**

Araraquara

2020



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



Maria Leticia de Almeida Lança

**Expressão da Indoleamina 2,3 dioxigenase em carcinoma espinocelular
intraoral, labial, leucoplasia oral e queilite actínica**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Navarro
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

Araraquara

2020

Lança, Maria Leticia de Almeida

Expressão da Indoleamina 2,3 dioxigenase em carcinoma espinocelular intraoral, labial, leucoplasia oral e queilite actínica / Maria Leticia de Almeida Lança.-- Araraquara: [s.n.], 2020

60 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Navarro
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

1. Imuno-Histoquímica 2. Diagnóstico 3. Carcinoma
I. Título

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

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

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Maria Leticia de Almeida Lança

**Expressão da Indoleamina 2,3 dioxigenase em carcinoma espinocelular
intraoral, labial, leucoplasia oral e queilite actínica**

.

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Navarro

2º Prof. Dr. Valfrido Antônio Pereira Filho

3º Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi

Araraquara, 18 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Maria Leticia de Almeida Lança

NASCIMENTO: 26/08/1990 – Piraju – S.P.

FILIAÇÃO: Eraldo José de Carvalho Lança e Cláudia Regina de Almeida

2009-2013 Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2014-2015 Aperfeiçoamento Profissional em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2015-2017 Residência Multiprofissional em Odontologia Oncológica, Hospital de Câncer de Barretos.

2017-2018 Aprimoramento Profissional em Estomatologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2018- Pós-graduação nível mestrado em Ciências Odontológicas, Área de Concentração de Diagnóstico e Cirurgia. Faculdade de Odontologia de Araraquara, em andamento.

Dedico essa dissertação ao Maurício Fabiano Pereira (*in memoriam*), grande amigo e estomatologista. Saudades da sua alegria contagiante.

AGRADECIMENTOS

Deus esteve sempre ao meu lado, me dando forças para nunca desistir, continuar lutando pelos meus sonhos e objetivos de vida. A Ele, devo minha eterna gratidão.

É difícil agradecer a todas as pessoas que de algum modo fizeram ou fazem parte da minha vida e que contribuíram para que eu chegasse onde gostaria, por isso primeiramente, agradeço à todos de coração.

À minha mãe, Claudia Regina de Almeida, minha heroína e incentivadora dos meus sonhos. Sempre me apoiou e esteve ao meu lado. Abdicou de muitas coisas para que eu realizasse o mestrado.

Aos meus irmãos, João Felipe e Luis Eduardo Almeida Lança, pelo amor, amizade e conselhos. Vocês são os melhores irmãos do mundo.

Ao meu pai, Eraldo José de Carvalho Lança, pelo amor incondicional, por acreditar e respeitar minhas decisões.

À minha família pela ajuda e incentivo todos os dias da minha vida.

Ao meu namorado e futuro esposo, Brunno Galvão de França, que sempre esteve comigo, mesmo à distancia. Por ter muita paciência escutando por telefone cada passo destes dois anos de mestrado. Também agradeço por todos os conselhos e apoio.

À minha orientadora, Prof Dr^a Cláudia Maria Navarro, por toda a dedicação e paciência. Além de todo o suporte oferecido, me incentivando nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Ao meu coorientador, Prof Dr Jorge Esquiche León, pela oportunidade e apoio na realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia por todos os ensinamentos. Em especial a Prof^a Luciana Yamamoto de Almeida, não tenho palavras para agradecer toda a ajuda e conselhos, obrigada por sempre acreditar em mim.

Aos meus colegas de pós graduação, Audrey, Camila, Evânio, Darcy, Esteban, Laís, Analú, Larissa, Lílian e Heitor, companheiros de trabalho, pela amizade. Em especial ao Túlio, colega desde a graduação, por ter me ajudado não só em trabalhos científicos, mas também por sempre ouvir quando precisei. Vocês fizeram parte da minha formação e vão continuar presentes na minha vida.

Às minhas amigas de apartamento, Gabi e Caiçara, pelas ótimas histórias vividas. Já sinto saudades de chegar em casa e ouvir/contar mil histórias. Foi inesquecível morar com vocês.

A esta maravilhosa Universidade, seu corpo Docente, Direção, Administração e Funcionários que sempre acolhem os alunos e que fazem desta umas das melhores do país. “Explicar a emoção de ser Unespiano, a um Unespiando, é totalmente desnecessário; e a quem não é Unespiano, é simplesmente impossível!”

Aos professores Valfrido e Fernanda, e professores suplentes que aceitaram participar da minha banca, por dividirem comigo este momento tão importante e esperado.

Aos pacientes do Serviço de Medicina Bucal, talvez a minha ajuda tenha sido pequena diante do universo de aprendizado que me ofereceram. Ajudá-los representou uma magnífica lição de amor e fraternidade.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 11/52090-8) pelo apoio financeiro essencial para realização desta pesquisa.

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

Hoje posso ser uma pessoa realizada e feliz, porque não estive só nesta longa jornada. Obrigada a todos.

.

Lança MLA. Expressão da Indoleamina 2,3 dioxigenase em carcinoma espinocelular intraoral, labial, leucoplasia oral e queilite actínica [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima com efeito imunossupressor e a sua expressão no microambiente tumoral auxilia a fuga imune das células tumorais. Neste estudo, determinamos e associamos a expressão de IDO em carcinoma espinocelular (CEC) intraoral e labial, leucoplasia oral (LO) e queilite actínica (QA). Métodos: análise morfológica e imuno-histoquímica foi realizada em espécimes de CEC intraoral (n = 21), CEC labial (n = 20), LO (n = 24) e QA (n = 20). As amostras de LO e QA foram classificadas, morfológicamente, de acordo com a ausência ou presença de displasia de alto e baixo grau. As amostras de CEC foram morfológicamente classificadas de acordo com a OMS. Resultados: a expressão de IDO foi observada em células epiteliais neoplásicas e não-neoplásicas, bem como em células imunes. Todos CEC orais e apenas 30% dos casos de CEC labiais expressaram IDO. Nos grupos LO e QA, 71% e 25% dos casos foram positivos para IDO, respectivamente. O CEC intraoral apresentou o maior número de amostras positivas com alta expressão de IDO, seguido pela LO com displasia de alto grau. Conclusões: O CEC intraoral apresenta alta expressão de IDO, o que, possivelmente, fomenta o seu comportamento mais agressivo e pior prognóstico em relação ao CEC labial, que apresenta pouca expressão de IDO. A IDO atuaria, indicando uma progressão tumoral, mais especificamente para a LO do que para a QA, pois a LO com displasia de alto grau expressou mais IDO em relação a de baixo grau.

Palavras – chave: Imuno-Histoquímica. Diagnóstico. Carcinoma.

Lança MLA. Indoleamine 2,3 dioxygenase expression in oral and lower lip squamous cells carcinoma, leukoplakia and actinic cheilitis [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an enzyme with an immunosuppressive effect and its expression in the tumor microenvironment helps the immune escape of tumor cells. In this study, we determined and associated the expression of IDO in squamous cell carcinoma (SCC) oral and labial, oral leukoplakia (OL) and actinic cheilitis (AC). Methods: morphological and immunohistochemical analysis was performed on specimens of oral SCC (n = 21), labial SCC (n = 20), OL (n = 24) and AC (n = 20). OL and AC samples were classified, morphologically, according to the absence or presence of high and low grade dysplasia. The SCC samples were morphologically classified according to the WHO. Results: the expression of IDO was observed in neoplastic and non-neoplastic epithelial cells, as well as in immune cells. All oral SCC and only 30% of cases of lip SCC expressed IDO. In the OL and AC groups, 71% and 25% of the cases were positive for IDO, respectively. The oral SCC presented the highest number of positive samples with high expression of IDO, followed by OL with a high degree of dysplasia. Conclusions: oral SCC has a high expression of IDO, which, possibly, promotes its more aggressive behavior and worse prognosis in relation to lip SCC, which presents little expression of IDO. IDO would act indicating a tumor progression, more specifically for OL than for AC, as OL with high-grade dysplasia expressed more IDO compared to low-grade.

Keywords: Immunohistochemistry. Diagnosis. Carcinoma.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivos Gerais.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Desordens Potencialmente Malignas Orais (DPMO)	14
3.2 Leucoplasia Oral (LO)	15
3.3 Queilite Actínica (QA)	17
3.4 Microambiente Tumoral (MAT)	19
3.5 Indoleamina 2,3 Dioxigenase (IDO)	20
3.6 IDO em Cabeça e Pescoço	22
4 MATERIAL E MÉTODO	26
4.1 Considerações Gerais	26
4.2 Critérios de Inclusão	26
4.3 Critérios de Exclusão	26
4.4 Coleta da Amostra	26
4.5 Análise Histopatológica.....	27
4.6 Análise Imuno-Histoquímica	28
4.7Análise Estatística.....	30
5 RESULTADO	31
5.1 Escore de Intensidade da IDO.....	32
5.2 Escore de Intensidade e Infiltrado Inflamatório.....	38
5.3 Escore de Intensidade e Classificação Histológica	41
5.4 Escore de Intensidade da LO	42
5.5 Positividade da QA.....	44

6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO A.....	57

1 INTRODUÇÃO

Dados referentes à incidência global mostram que, em 2018, houve 354.864 novos casos de câncer de lábio e cavidade oral em todo o mundo, resultando em 177.384 mortes¹. O carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço representa a maioria desse grupo de tumores. O tratamento convencional envolve combinações de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, resultando em significativa morbidade a curto e longo prazo². Nesse contexto, apesar dos avanços no conhecimento sobre o CEC em relação às abordagens de diagnóstico e tratamento multidisciplinar, a taxa de sobrevida em cinco anos permanece, aproximadamente, de 50%, tendo aumentado, ligeiramente, para 57% nos últimos 10 anos^{3,4}. Pacientes com câncer oral, especialmente, em língua, assoalho de boca e gengiva apresentam uma taxa de sobrevida, após cinco anos, 2 ou 3 vezes menor em comparação aos pacientes com câncer de lábio⁵⁻⁷.

A maioria dos casos de câncer orais é precedida por alterações clinicamente evidentes na mucosa oral, chamadas desordens potencialmente malignas orais (DPMO)³. Posto isso, a definição de DPMO pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2017, é “apresentações clínicas que apresentam risco de desenvolvimento de câncer na cavidade oral, seja em uma lesão precursora clinicamente definível ou na mucosa clinicamente normal” (tradução nossa)^{8,p112}.

Nesse sentido, numerosas DPMO têm sido associadas a um risco aumentado de CEC intraoral, incluindo leucoplasia, eritroplasia, líquen plano, fibrose submucosa, queilite actínica, queratose palatina associados ao fumo invertido, lúpus eritematoso discóide e algumas doenças hereditárias, como disqueratose congênita e anemia de Fanconi⁹.

Vale salientar, que a detecção precoce salva vidas, e diminui, significativamente, a morbidade, contudo estratificar indivíduos em relação ao risco para o desenvolvimento do câncer oral, incluindo aqueles com DPMO, continua sendo desafiador^{10,11}. Assim, embora o grau de displasia epitelial seja o indicador mais usado para determinar o risco de transformação maligna, esse parâmetro envolve subjetividade e apresenta valor de previsão baixo, levando a resultados imprecisos^{12,13}. Desse modo, o uso de biomarcadores confiáveis para identificação, especialmente aqueles detectáveis em DPMO e CEC orais iniciais, pode oferecer oportunidades para detecção e intercessão preventiva eficaz¹³.

Não obstante, apesar do aumento do número de pesquisas nesse campo, as características moleculares das DPMO e CEC orais ainda necessitam de muitos estudos. Com um diagnóstico molecular adequado, poder-se compreender a sequência de alterações que ocorrem para causar primeiro o aparecimento de uma queratose com o mínimo ou nenhuma displasia, displasia leve a grave, carcinoma “in situ” e, finalmente, o carcinoma invasivo. Tal entendimento aprimorado do processo de evolução da doença permitirá seu diagnóstico precoce, auxiliando na melhor intervenção e reduzindo a morbidade e a mortalidade dos pacientes^{13,14}.

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que a interação de células tumorais e células imunocompetentes no microambiente tumoral (MAT) exercem importante influência na progressão do câncer e na resposta ao tratamento. As células malignas podem desenvolver diferentes estratégias para impedir ou reduzir a resposta imune, por exemplo, a perda dos componentes responsáveis pela apresentação de antígenos tumorais, bem como perda ou ganho de funções celulares que tornam o câncer resistente à morte celular¹⁵. A indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) é um fator intrínseco que atua na resposta imune, está associada a várias neoplasias e tem atraído grande atenção no campo dos estudos sobre imunologia tumoral^{16,17}.

A IDO é expressa em células tumorais e em células associadas ao tumor. Ela é uma enzima induzível que metaboliza o triptofano ao longo da via da quinurenina, e desempenha um papel importante no desenvolvimento de um meio imunossupressor para o tumor, pois possui propriedades contrarreguladoras (controle da inflamação) e tolerogênicas (criando tolerância específica ao antígeno adquirida nas células T, além de afetar a sua proliferação). Para ilustrar isso, recentes achados revelam que a IDO, quando superexpressa em tumores, promove a tolerância imune a antígenos tumorais, facilitando a sobrevivência das células tumorais^{16,18}. Ademais, uma recente revisão sistemática mostrou que a elevada expressão de IDO está associada a maus resultados clínicos¹⁹. A IDO poderia, então, servir como biomarcador de prognóstico e potencial fator de previsão clinicopatológico em vários tipos de câncer.

Dessa maneira, no presente estudo, propusemos comparar a expressão da IDO em carcinomas intraorais e em lábio, além de estudar duas DPMO (leucoplasia oral e queilite actínica) sob esta perspectiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Determinar a expressão da IDO no carcinoma espinocelular oral, leucoplasia oral e queilite actínica.

2.2 Objetivos Específicos

Associar a expressão da IDO entre as amostras de carcinoma espinocelular oral, leucoplasia oral e queilite actínica.

Avaliar se a expressão se correlaciona com o infiltrado inflamatório e com o grau de displasia da leucoplasia oral e queilite actínica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Desordens Pontencialmente Malignas Orais (DPMO)

A prevalência mundial de DPMO varia de 1% a 5%^{20,21}. Estimativas precisas da epidemiologia das DPMO e uma melhor compreensão dos fatores associados à sua ocorrência são essenciais para o estabelecimento de condições adequadas, às medidas preventivas para o câncer oral e à promoção da saúde²².

A maioria das DPMO pode ser assintomática nos estágios iniciais e ser detectada pelo cirurgião-dentista no exame bucal de rotina. Para isso, é essencial que os profissionais de saúde tenham conhecimento sobre seus aspectos clínicos a fim de realizar o diagnóstico e tratamento adequado²³. Em todos os casos, acima de tudo, é necessário realizar a biópsia para estabelecer o diagnóstico definitivo e investigar displasia ou CEC²⁴.

Ainda nessa perspectiva, o diagnóstico e a classificação da displasia epitelial nas DPMO ocorrem de acordo com uma combinação de fatores baseados em critérios arquitetônicos e citológicos, usando a classificação binária proposta pela OMS, 2017²⁵.

Pacientes com DPMO apresentam pior qualidade de vida com impacto no bem-estar psicológico e social. A maioria relata experiências traumáticas, como muitas visitas a vários profissionais e realização de diferentes tipos de tratamentos, corriqueiramente, sem alívio, com comprometimento físico e limitações funcionais, frustração relacionada à natureza crônica da doença sem tratamento específico e, sobretudo, o medo da transformação maligna²⁶.

A taxa de transformação maligna varia consideravelmente nos estudos dependendo principalmente do subtipo clínico e do grau de displasia. Na meta-análise realizada por Mehanna²⁷, a taxa de transformação maligna foi de 12,1% e a DPMO com displasia de alto grau obteve duas vezes mais chances de sofrer transformação maligna (baixo grau 10,3% vs alto grau 24,1%).

A história natural da DPMO é variável, sua evolução não é necessariamente, linear e sua propensão à transformação maligna é difícil de prever. Hodiernamente, é impossível prever com precisão quais lesões terão transformação maligna com base no grau histológico da displasia, o que gera desafios na avaliação e no tratamento^{24,28}.

Marcadores moleculares mais precisos, prevendo a progressão para o câncer, permitirão o direcionamento dessas lesões para tratamento mais agressivo e períodos mais curtos entre as consultas de acompanhamento. Estudos longitudinais já indicam que a perda de heterozigosidade, a instabilidade alélica em locais específicos, a positividade para survivina e MMP 9 e o teor de DNA (não diploide) também aumentam o risco para transformação maligna²⁸.

Uma meta-análise avaliou a amplificação do gene CCND1 e superexpressão da proteína ciclina D1 como marcadores de risco de transformação maligna em DPM da cabeça e pescoço e encontrou associação significativa com um maior risco de progressão para o CEC, principalmente, nas DPMO²⁹. Na meta-análise realizada por Alaizari et al.³⁰, os autores perceberam que a aneuploidia no DNA em DPMO significa um alto risco de transformação maligna, já um resultado diploide não revela, necessariamente, algum risco. Por isso, é indispensável ser interpretado com cautela.

A estratificação de risco de pacientes com DPMO parece ser a chave para selecionar um plano de conduta apropriado a cada paciente, pois favorece a individualização do tratamento proporcional ao grau de risco para o desenvolvimento de câncer²⁴.

3.2 Leucoplasia Oral (LO)

Dentre as DPMO, a leucoplasia oral (LO) é a mais comum. Ela foi definida pela OMS como “placas brancas de risco questionável, excluindo (outras) doenças ou distúrbios conhecidos que não apresentam risco aumentado de câncer” (tradução nossa). Além disso, LO é um termo clínico e a lesão não possui padrão histológico específico. Pode mostrar atrofia ou hiperplasia (acantose) e pode ou não apresentar displasia epitelial. Deve-se notar, ainda, que a displasia epitelial oral não tem aparência clínica específica e o termo não deve ser usado como descritor clínico de uma lesão branca. A LO possui um padrão comportamental variável com uma tendência, todavia à transformação maligna³¹.

Para chegar ao diagnóstico final, outras lesões brancas benignas devem ser excluídas, como a hiperqueratose friccional, hiperqueratose da crista alveolar, leucoedema, nevo branco esponjoso, candidose hiperplásica, líquen tipo placa, entre outras. A LO pode ser assintomática e exibir uma aparência clínica benigna,

difícultando diferenciá-la dos distúrbios reativos ou inflamatórios comuns na mucosa oral. Clinicamente, pode variar em tamanho, desde uma área bastante pequena e circunscrita, a uma lesão extensa, envolvendo uma grande área da mucosa oral²³.

São reconhecidos dois principais tipos clínicos de LO: homogênea e não homogênea. A distinção entre elas é puramente clínica, baseada na cor e na textura superficial, no entanto apresentam influência no prognóstico. A LO homogênea é uniformemente plana, fina e apresenta fissuras na queratina superficial e seu risco de transformação maligna é, relativamente, baixo. A LO não homogênea apresenta risco muito maior de transformação maligna e se apresenta na forma mosqueada, nodular e verrucosa. Os sintomas mais associados à LO não homogênea incluem desconforto, formigamento e sensibilidade ao toque e ao ingerir bebidas quentes ou alimentos condimentados. Vale ponderar também que a leucoplasia verrucosa proliferativa representa um terceiro subtipo mais raro e de alto risco^{23,31}.

Qualquer localização anatômica oral pode ser afetada pela LO, entretanto é mais frequente na mucosa jugal, assoalho bucal, face ventral da língua e palato mole, com menor frequência na comissura bucal, palato duro e gengiva. As localizações afetadas apresentam muitas variações dependendo da região geográfica mundial, já que, comumente, ela está associada aos hábitos culturais de cada local^{20,32-34}.

Geralmente, são diagnosticadas após a quarta década de vida e a prevalência global varia entre 1 e 5%^{20,22,23}. As estimativas fornecidas por estudos individuais variam, consideravelmente, dependendo do país de origem, da natureza da população investigada, do padrão de uso de tabaco e da definição clínica utilizada³³.

A LO é seis vezes mais frequente em fumantes do que em não fumantes, levando à sugestão de muitos autores de que a etiologia está, intimamente, relacionada ao uso do tabaco. A predileção pelo sexo masculino (proporção homem/mulher = 3,22: 1) reforça este conceito, pois os homens estão mais expostos a esse fator^{20,22,35}. Em alguns casos, elas são idiopáticas, não apresentando fator de risco conhecido²³.

O exame histopatológico é de vital importância para o diagnóstico e acompanhamento³⁶. A biópsia deve ser realizada para excluir outras doenças, como o CEC, e avaliar o grau de displasia epitelial, eventualmente, presente³⁷. Lesões extensas requerem múltiplas biópsias periódicas e em locais diferentes para detectar

os diferentes graus de displasia ou a transformação maligna³⁶. É importante ressaltar que um resultado histopatológico negativo para carcinoma em uma região pode não excluir, completamente, a presença de carcinoma ou seu potencial de desenvolvimento de maneira confiável³³.

Em contrapartida, a LO, em mulheres, apresenta taxa de transformação maligna, significativamente, maior em comparação aos homens. A idade avançada também é considerada um importante fator de risco, assim como lesões superiores a 2 cm², que apresentam cinco vezes mais chance de transformação maligna^{34,36}.

À medida que a compreensão da patogênese molecular do câncer oral aumenta, há um interesse ativo em se identificar biomarcadores que possam fornecer aos clínicos a capacidade de rastrear os principais sinais moleculares associados à DPMO e intervir antes que ocorra a transformação neoplásica. Sob esse ponto, diversos biomarcadores já foram utilizados como marcadores inflamatórios ou oxidativos, fatores de crescimento, de sinalização celular, fatores reguladores genéticos e celulares, canais iônicos, fatores de angiogênese e biomarcadores epigenéticos. Os biomarcadores foram derivados de três fontes anatômicas diferentes: soro, tecido e saliva. Porém, atualmente, as evidências são insuficientes para apoiar biomarcadores que poderiam melhorar os métodos atuais de detecção da progressão da LO para malignidade³⁷.

3.3 Queilite Actínica (QA)

A radiação ultravioleta (UV) do sol, a qual é parcialmente filtrada pela atmosfera, pode causar alterações mutagênicas nos lábios, culminando no aparecimento da queilite actínica (QA). Ela é uma DPMO resultante da expansão clonal dos queratinócitos induzidos por radiação UV, caracterizados por alterações moleculares que causam instabilidade genômica. Alterações genéticas adicionais induzidas por radiação UV são necessárias para a transformação maligna com potencial de invasão e metástase³⁸. A taxa de transformação maligna da QA para CEC é cerca de 16,9%, sendo que os homens mostram maiores índices de transformação em comparação às mulheres^{23,39}.

A QA é mais frequente em pessoas acima de 50 anos e o seu desenvolvimento está associado, além da exposição solar, à predisposição genética,

à latitude geográfica de residência, à ocupação profissional, e à falha no uso de protetores solares labiais e a atividades de lazer⁴⁰.

O lábio inferior é o mais afetado, porque, anatomicamente, apresenta maior exposição à radiação UV. Indivíduos com pele clara também apresentam maior risco de desenvolvimento da QA^{38,41}.

As QA caracterizam-se por atrofia, perda de delimitação entre a pele e a semimucosa labial, fissuras verticais, manchas brancas e vermelhas, consistência endurecida por perda de elasticidade, superfície ondulada e, esporadicamente, ulceração^{39,40}. O estudo de Markopoulos et al.⁴¹ revelou erosões ou úlceras (48%) e lesões brancas não ulceradas (29%), e 23% de ambas na mesma QA, considerando as alterações clínicas mais graves encontradas em trabalhadores que sofreram pelo menos 185 meses (aproximadamente 15 anos) de exposição à luz solar durante o trabalho.

A partir do pressuposto de que os danos causados pelo sol são cumulativos, lesões mais graves estão relacionadas ao maior tempo de exposição à radiação UV. Pacientes com tempo de exposição considerado curto podem apresentar secura, edema, descamação, eritema, manchas acastanhadas, consistência flácida ou normal do lábio, superfície lisa ou com crostas e envolvimento de 1/2 ou 1/3 dos lábios. Essas características definem, clinicamente, uma QA menos agressiva³⁹.

As características histopatológicas da QA incluem aumento da espessura da camada de queratina, alterações da espessura da camada celular espinhosa, displasia epitelial, e alterações do tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório perivascular e alterações basofílicas do tecido conjuntivo, conhecidas como elastose solar^{23,41}.

Quase metade dos pacientes com câncer de lábio apresentavam lesões maiores que 1,0 cm de diâmetro no momento do diagnóstico. Indubitavelmente, portanto, o diagnóstico precoce das lesões malignas em áreas de QA é, altamente, relevante⁴¹.

O tabagismo pode desempenhar papel crucial na ocorrência da QA. No estudo realizado por Rocha⁴², foi constatado que a probabilidade de malignização é maior quando a QA está associada a fatores, como o álcool, fumo e a higienização oral precária. Markopoulos et al.⁴¹, relatou que a maioria dos

pacientes com histórico de tabagismo preferiam o lado direito para segurar o cigarro e este foi o lado mais frequentemente afetado pela QA.

A prevenção da QA pode ser alcançada pela redução da exposição à radiação UV, pelo uso de bonés e chapéus com proteção solar e uso de protetores solares tópicos que devem ser introduzidos desde a infância e continuar ao longo da vida³⁸.

Diversos biomarcadores vêm sendo estudados na evolução da transformação maligna da QA. Custódio et al.⁴³ avaliou a expressão de marcadores de células-tronco e encontrou que CD44, ALDH1 e p75NTR estão presentes na QA e no CEC labial, sem variação de expressão. Por outro lado, p75NTR mostrou aumento da expressão conforme o agravamento do grau da displasia epitelial. Já a expressão imunológica foi avaliada pela expressão de PD-L1, HLA-G, CD8, e granzyme B, e apenas PD-L1 demonstrou ser um mecanismo de escape do tumor da resposta imunológica⁴⁴.

Apesar dos estudos publicados, marcadores moleculares e eventos imunorregulatórios capazes de prever o potencial de malignidade da QA ainda não estão bem estabelecidos.

3.4 Microambiente Tumoral (MAT)

Antes entendido como um conjunto de células alteradas em proliferação, hoje, o câncer é melhor compreendido como um microambiente, em que as interações entre os elementos celulares e moleculares que o compõem são determinantes na progressão tumoral. Quando o tumor está estabelecido, ele contém não apenas células tumorais, mas também células inflamatórias, células estromais, vascularização, matriz extracelular, células imunes e imunorreguladoras, chamadas de microambiente tumoral (MAT)⁴⁵.

A dinâmica das células tumorais passa a ser avaliada como parte de um verdadeiro tecido tumoral, sujeita a condições de vascularização, oxigenação, pressão intersticial e necrose tecidual que influenciam na cinética tumoral. Constantemente, estão sendo identificados novos componentes desse nicho tumoral e as suas respectivas atuações. Entre esses integrantes do nicho tumoral, encontram-se os elementos da imunidade, cuja modulação tem sido demonstrada

tanto no sentido da vigilância imunológica quanto no favorecimento da progressão tumoral. Por essas razões, o MAT tem sido considerado um importante alvo para terapias anticâncer⁴⁶.

A resposta imune é um processo dinâmico e complexo, no qual diferentes mecanismos se encontram em equilíbrio para proteger o hospedeiro, os tecidos e as células locais, incluindo a destruição das células tumorais⁴⁵. Todavia, as células cancerígenas realizam diversas funções, dentre essas, o escape do sistema imune⁴⁷.

Uma forma pela qual isso ocorre é a partir da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas células tumorais. A IDO altera o microambiente, protegendo as células tumorais do sistema imunológico. Estudos pré-clínicos indicam que esse mecanismo de resistência imune pode ser bloqueado pela administração sistêmica de inibidores farmacológicos de IDO, como o 1-metil-L-triptofano⁴⁸.

3.5 Indoleamina 2,3 Dioxigenase (IDO)

A IDO é uma enzima monomérica endocelular a qual contém um grupo heme que participa da via quinurenina, catalisando a primeira e limitante etapa do catabolismo do triptofano, por meio da quebra da ligação 2,3-dupla do anel indol em triptofano, quando um oxigênio molecular é incorporado à molécula aberta⁴⁹. As células T parecem ser especialmente sensíveis à falta de triptofano, já que a sua ausência inibe a proliferação dessas células e impede a sua ativação pelas células apresentadoras de antígenos¹⁶.

A IDO se caracteriza por ser uma enzima indutiva e citossólica, ou seja, sua produção é induzida pela presença de uma substância específica e está presente no citosol, sendo encontrada em vários órgãos, como o pulmão, baço, fígado, rim e cérebro^{16,49}. Como a IDO é uma enzima intracelulares e não secretada, os seus efeitos metabólicos começam como sinais inerentes ao local. No entanto, os efeitos imunológicos não se limitam apenas às células que expressam a IDO, as células ao redor também podem detectar e responder aos metabólitos da via quinurenina que também foram secretados e ao acesso reduzido ao triptofano⁵⁰.

O Triptofano e seus catabólitos da via quinurenina formam um ambiente imunossupressor para contribuir com a formação de locais imunes, como olhos,

cérebro, placenta e testículos⁵¹. Tais substâncias são reconhecidos como um fator essencial na imunidade inata e adaptativa, estando presentes em infecções, inflamações e outras doenças como o câncer⁵².

A expressão da IDO pode ocorrer em muitas células, como as células dendríticas, os monócitos e os macrófagos^{16,53-56}. As células tumorais expressam a IDO de maneira ampla, mas variável, como as células imunes inatas do MAT e os linfonodos que drenam o tumor⁴⁸. Além disso, algumas citocinas inflamatórias, como interleucina (IL) 6 e fator de necrose tumoral- α (FNT- α), podem induzir a expressão da IDO⁵⁶.

A maior expressão da IDO está relacionada a muitas doenças inflamatórias, a saber, câncer, diabetes, depressão, HIV e rejeição de transplantes de órgãos⁴⁹. A imunossupressão por IDO foi descrita pela primeira vez, em 1998, na placenta de ratos, para prevenir a rejeição do feto, permitindo a tolerância imunológica materno-fetal⁵⁵. Camundongas grávidas que receberam inibidores de IDO mostraram rejeição fetal alogênica, mostrando que a IDO impede que as células T maternas danifiquem os aloenxertos fetais⁵⁶. Camundongos com doenças autoimunes e alérgicas, portadores de tumor e com desenvolvimento fetal, apresentaram exacerbação da destruição imune mediada por células T quando utilizaram inibidores de IDO⁵³. Nesse sentido, esses estudos evidenciam que a IDO serve como um mediador facilitando a formação de ambientes imunossuprimidos, promovendo a tolerância das células apresentadoras de antígenos e a morte das células imunológicas⁵⁶.

A tolerância periférica adquirida, definida como um estado funcional de falta de resposta imunológica a um antígeno, é um processo contínuo o qual impede que antígenos inócuos e externos estimulem imunidade excessiva, causando danos aos tecidos. Tomados em conjunto, tais estudos sugerem que a via IDO restringe a quebra progressiva da autotolerância periférica em situações de inflamação crônica e cria tolerância sistêmica a antígenos inócuos e externos em situações de autoimunidade e transplante⁵⁰.

O suprimento do sistema imunológico pela IDO agrava o crescimento, a migração e a invasão de células cancerígenas de três maneiras. Precipuamente, a IDO promove a formação de células apresentadoras de antígenos imunossupressoras por atuar como uma molécula de sinalização intracelular direta, independente de sua atividade enzimática. Posteriormente, a superexpressão de IDO em células apresentadoras de antígenos induz a via quinerunina para facilitar a

liberação de quinerunina e o consumo de triptofano. A formação de quinerunina pode ativar as células T CD8 + e as células NK. Finalmente, a IDO induz as células supressoras derivadas de mieloides, influenciando a condição inflamatória. Essas células podem migrar para os tecidos tumorais para criar um MAT imunossupressor. Outrossim, a IDO promove a angiogênese para facilitar o crescimento do câncer^{18,19,48,57}.

Muller et al.⁵⁶ encontraram que a expressão de IDO também está elevada no ambiente inflamatório que promove o desenvolvimento tumoral, mesmo na ausência de iniciação tumoral, indicando, claramente, que sua presença é um evento precoce o qual ocorre antes do início da programação de um microambiente inflamatório pró-tumorigênico.

A IDO é expressa em diferentes tipos de câncer, incluindo o CEC de cabeça e pescoço⁵⁸. Em uma metanálise realizada por Jia et al.⁵⁸, a maior expressão de IDO foi associada à pior sobrevida global dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Até o momento, existem apenas oito trabalhos publicados que avaliaram a expressão da IDO em câncer de cabeça e pescoço e apenas um que avaliou a IDO na QA.

3.6 IDO em Cabeça e Pescoço

A intensidade da expressão da IDO depende do tipo de tumor e dos fatores de risco que eles estão expostos durante a sua vida. O CEC intraoral foi comparado em pacientes que nunca fumaram e que não bebiam com pacientes fumantes e que bebiam. Pacientes que nunca fumaram e não bebiam com CEC intraoral tiveram uma expressão, consideravelmente, maior da IDO em relação ao outro grupo⁵⁹.

Laimer et al.⁶⁰ avaliaram a expressão da IDO no tecido tumoral de 88 pacientes com CEC intraoral e orofaringe. A alta expressão foi observada em 44,2% dos pacientes e não foi encontrada qualquer correlação entre a expressão e o estágio clínico, sexo, idade, local, tamanho, metástase ou estadiamento do tumor. O tempo médio de sobrevida global foi de 3,1 anos para pacientes com tumores com baixa expressão de IDO, comparado a 1,36 anos para tumores com alta expressão. A análise por subconjunto de pacientes recebendo radioterapia ou quimioterapia adjuvante também mostrou uma diferença elementar na sobrevida global entre os

tumores com baixa e alta expressão (3,35 e 1,26 anos para radioterapia e 7,76 e 1,33 anos para quimioterapia), sendo que os pacientes que fizeram quimioterapia e apresentaram baixa expressão tiveram maior sobrevida.

Kuales et al.⁶¹ analisaram em 47 casos de CEC em lábio inferior a expressão da IDO juntamente com a expressão de marcadores de células T (CD3), mielóides DCs (S100, CD11c), macrófagos (CD68, CD11c), células de Langerhans (CD1a, Langerin (CD207), CD plasmocitóides (CD123) e células T reguladoras (Foxp3) por análise imuno-histoquímica e imunofluorescência. Desses casos, 12 continham células que expressavam IDO. Essa positividade está fortemente associada à intensidade do infiltrado inflamatório associado ao câncer. As células IDO positivas estavam localizadas ao longo da fronteira entre o tumor em desenvolvimento e o infiltrado inflamatório. A imunofluorescência mostrou que CD11c + S100 + CD68 e células dendríticas (DCs) expressaram a IDO.

A expressão da IDO no CEC da laringe foi avaliada por Ye et al.⁶² e não foi associada ao estágio, à presença de metástases, à histologia, ao estágio clínico, ao estado nodal ou à diferenciação tumoral. Entretanto, a alta expressão estava associada a uma menor sobrevida e tempo livre da doença, revelando-se como um indicador para um mau prognóstico.

A IDO no carcinoma nasofaríngeo (CNF) foi avaliada por Ben-Haj-Ayed et al.⁶³ A IDO apresentou maior atividade no plasma sanguíneo dos pacientes com CNF, especialmente, entre pacientes com câncer metastático em comparação ao grupo controle. Na análise imuno-histoquímica, foi observada alta expressão de IDO em 74% das amostras e a expressão epitelial foi, inversamente, correlacionada à infiltração de células T. Pacientes com alta expressão de IDO e baixa infiltração de células T apresentam taxas de sobrevida significativamente menores; houve maior expressão nos pacientes mais jovens. A atividade da IDO foi, especialmente, alta entre pacientes com metástases locais ou distantes, sugerindo que alta atividade de IDO no plasma pode ajudar na migração e invasão de células do CNF.

Seppala et al.⁶⁴ avaliaram a associação e a relevância prognóstica da expressão de IDO no CEC e hiperplasia de língua em 108 amostras. A IDO foi mais expressa na hiperplasia do que no CEC. No entanto, o escore de proporção IDO e o escore de intensidade de coloração do CEC diferiram, de modo relevante, entre os grupos classificados por T1 – T4, sendo que a expressão de IDO está associada à baixa sobrevida nos subgrupos com estágio primário do tumor T2-T4 e no subgrupo

com forte inflamação. A pontuação total (intensidade e proporção) de IDO do tumor correlacionou-se positivamente com significância com o número de linfonodos cervicais, com crescimento de metástase e com o número de linfonodos cervicais com invasão extranodal. No subgrupo de pacientes com IDO positivo para linfonodos e nos quais o tumor teve profundidade de invasão maior que 4mm, o prognóstico foi pior. No paciente que apresentou linfonodo metastático, a taxa de óbito foi 3,54 e quando o linfonodo foi positivo para IDO, a taxa foi 3,10 e quando o paciente apresentava os dois fatores, a taxa de óbito foi 9,76.

Wang et al.⁶⁵ examinaram os padrões de expressão de IDO por imunohistoquímica em 36 pacientes com CEC oral durante terapia com Nimotuzumabe. Em pacientes que não responderam clinicamente ao tratamento, a expressão de IDO aumentou, de maneira considerável, durante a terapia com Nimotuzumabe e a expressão de IDO antes da terapia medicamentosa não mostrou significância com a sobrevida global.

Vichaya et al.⁶⁶ utilizaram um modelo murino para câncer de cabeça e pescoço por papilomavírus humano e confirmou que as células tumorais expressam IDO e a expressão foi aumentada pela radioterapia. O uso do 1-metil triptofano, inibidor competitivo da ativação da IDO, interferiu, negativamente, no comportamento dos camundongos, porque eles apresentaram menor taxa de escavação dos pellets de alimento e menor tempo andando na roda da gaiola. A administração oral de um inibidor específico de IDO não proporcionou benefício aparente na resposta do tumor, contudo diminuiu a atividade física dos camundongos, independentemente, do tratamento. Esses resultados indicam que, apesar de seu potencial efeito na remoção do tumor, a inibição da IDO não melhorou os sintomas relacionados ao câncer.

A característica celular e a extensão da expressão de IDO na QA foi correlacionada com a gravidade da atipia epitelial e extensão da inflamação por von Bubnoff et al.⁶⁷ A expressão da IDO foi analisada, juntamente, com a expressão marcadores para células T (CD3), células dendríticas e mielóides (S100, CD11c), macrófagos (CD68, CD11c) e células de Langerhans (CD1a) por análise imunohistoquímica e imunofluorescência. As análises mostraram que a IDO foi expressa em células dendríticas, mielóides, S100 e CD11. Sendo que o epitélio foi, consistentemente, negativo. Não havendo correlação da expressão da IDO com a densidade do infiltrado inflamatório.

Compreender e manipular a IDO para benefício clínico é uma estratégia nova e promissora para melhorar as intervenções imunoterapêuticas. Esses fatos estão gerando intenso interesse em elucidar o papel da IDO nas células e os mecanismos que explicam o fenômeno da regulação de células T mediadas por ela, que contribui para a criação e manutenção de locais imunossuprimidos em tecidos sujeitos à inflamação crônica⁵³. No entanto, ainda faltam dados sobre o envolvimento da IDO na patogênese do CEC intraoral, labial e DPMO.

Em um futuro próximo, podemos esperar melhores resultados sobre os mecanismos bioquímicos subjacentes que estimulam e mantêm a atividade da enzima IDO em tipos específicos de células e métodos aprimorados para controlar a sua atividade para aplicações terapêuticas.

O prognóstico e a sobrevida global dos pacientes com câncer oral dependem da detecção precoce de qualquer lesão que possa identificar um paciente com maior risco antes da doença metastática³⁷.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Considerações Gerais

Esse estudo foi realizado mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, CAAE: 34361814.9.0000.5416 (anexo A).

4.2 Critérios de Inclusão

- Pacientes com idade igual ou superior a 18 anos,
- Diagnóstico clínico de CEC intraoral, CEC labial, QA, LO,
- Ausência de contra-indicação para biópsia incisional ou excisional,
- Lesão com tamanho igual ou superior a 3 mm,
- Autorização dos pacientes para realizar a pesquisa.

4.3 Critérios de Exclusão

- Amostras que após a análise histopatológica, foram classificadas como lesões não pertencentes ao estudo.
- Casos com falta de informações clínicas nos prontuários.
- Casos com história prévia de radioterapia e/ou quimioterapia ou qualquer outro tratamento antes do procedimento cirúrgico.

4.4 Coleta da Amostra

Foi realizado um estudo transversal no qual os participantes voluntários foram recrutados durante o atendimento na Clínica do Serviço de Medicina Bucal do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP (FOAr-UNESP). Para cada paciente selecionado, foram realizadas anamnese, biópsia incisional ou excisional. Todo o material selecionado foi identificado com o respectivo código da pesquisa de maneira que a identidade dos participantes se mantivesse preservada. Os diagnósticos clínicos de todos os pacientes selecionados foram confirmados por análise histopatológica por um

patologista oral (JEL) sem conhecimento prévio das características demográficas ou clínicas relacionadas às amostras. Tanto as características morfológicas e os resultados imuno-histoquímicos foram analisados usando um Leica Microscope (Leica DM500 Biological Microscope acoplado à câmera Leica ICC50) e o software de processamento e análise de imagem Leica QWin (Leica Biosystems Newcastle, Ltd., Inglaterra).

4.5 Análise Histopatológica

Todos os espécimes foram fixados em formalina neutra 10%, durante 24 horas, em temperatura ambiente, embebidos em parafina a 55°C e foram realizados cortes histológicos paralelos e consecutivos com espessura de 5 µm e corados com hematoxilina e eosina. A ausência ou o grau de displasia epitelial nas lesões de LO e QA foi classificada de acordo com a classificação binária da OMS 2017, segundo a qual a ausência de displasia epitelial ou presença leve displasia foi classificada como baixo grau, a displasia moderada ou grave como alto grau²⁵.

O grau de diferenciação celular nas amostras de CEC intraoral e CEC labial também foram classificados de acordo com os critérios da OMS, 2017²⁵, segundo a tabela 1 abaixo:

Tabela 1 - Critérios utilizados para a classificação do CEC. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Unesp, 2019

CEC	Escala
Bem diferenciado	1
Moderadamente diferenciado	2
Pouco diferenciado	3
Indiferenciado	4

Fonte: Elaboração própria.

A intensidade do infiltrado inflamatório associado (leve, moderado ou intenso) foi analisada em 10 campos microscópicos representativos de alta potência (HPFs; 40× objetiva e 10× ocular). A inflamação leve foi determinada quando a maioria dos campos (>7 campos) demonstrou menos de 35% das células inflamatórias; inflamação moderada quando a maioria dos campos (>7 campos) demonstrou entre

35% a 70% das células inflamatórias; e inflamação intensa quando a maioria dos campos (>7 campos) demonstrou mais de 70% das células inflamatórias, segundo a tabela 2 abaixo⁶⁸:

Tabela 2 - Critérios utilizados para a classificação do infiltrado inflamatório. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Unesp, 2019

Infiltrado inflamatório	Grau
Nenhum	0
Discreto	<35%
Moderado	35-70%
Intenso	>70%

Fonte: Elaboração própria

4.6 Análise Imuno-Histoquímica

Para as reações de imuno-histoquímica, foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura, colocados sobre lâminas, devidamente, revestidas com organo-silano (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, EUA). Para a desparafinização, as lâminas ficaram na estufa a 70°C por duas horas antes dos banhos em xilol e após esse tempo foram realizadas duas trocas de xilol, 10 minutos cada. Em seguida, as amostras foram hidratadas em álcoois 90°, 70°, 50° e lavadas em água destilada por dois minutos. As lâminas exigiam recuperação em pH6.0, então foram levadas para a panela de pressão convencional com o tampão citrato de sódio 10 mM, seguindo o tempo de 15 minutos de fervura. Após o tempo da recuperação antigênica, as amostras foram, novamente, lavadas em água destilada e realizada a inativação da peroxidase endógena com Peróxido de Hidrogênio a 20 volumes por 10 minutos, e, então, as amostras receberam dois banhos de PBS (pH 7.4). As seções foram incubadas sucessivamente com o anticorpo monoclonal primário contra IDO (clone 4D2, diluição 1: 2000; AbD Serotec, North Hills, EUA, cat- # MCA5433Z) e incubado a 4°C por 16 horas.. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em Washer Buffer (Dako), e aplicado o anticorpo secundário utilizados anticorpos secundários conjugados com estreptavidina-biotina-peroxidase (K0690; Kit Universal Dako LSAB® +, Peroxidase, Carpinteria, CA, EUA), desenvolvidos com diaminobenzidina e contrastados com hematoxilina de Carazzi e incubadas a 37°C

por 30 minutos. Lavadas em Washer buffer, foi aplicado o cromógeno doador de elétrons (3,3'- diaminobenzidine in chromogen solution, DAB Dako) por 5 minutos e, após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente por 8 minutos. As amostras foram desidratadas em três trocas rápidas de álcoois absolutos, passadas em xilol de diafanização e de montagem. A montagem das lâminas foram realizadas com Entellan Merck e lamínulas. Os controles negativos foram obtidos substituindo o anticorpo primário pelo soro normal isotípico específico. Uma amostra do baço humano e do CEC intraoral (mostrado como fortemente positivo para IDO) serviu como controle positivo.

A expressão da IDO nas amostras foi classificadas pelo mesmo examinador em duas ocasiões separadas, com um intervalo de 2 semanas, de acordo com os mesmos critérios morfológicos. O teste Kappa revelou boa concordância. A expressão de IDO foi pontuada de acordo com a intensidade e porcentagem de expressão (Tabela 3 e 4):

Tabela 3 - Critérios utilizados para a classificação da intensidade de expressão do IDO. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Unesp, 2019

Intensidade da Marcação (M)	Escala
Nenhuma	0
Discreta	1
Moderada	2
Intensa	3

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Critérios utilizados para a classificação da porcentagem de células expressando IDO. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Unesp, 2019

Porcentagem (P)	Escala
Nenhuma	0
<10% céls	1
10-50% céls	2
51-80% céls	3
>80% céls	4

Fonte: Elaboração própria.

A expressão da IDO, nas amostras, também foi avaliada por um escore total de imunocoloração. Ele foi calculado, multiplicando o escore da intensidade de expressão pelo escore porcentagem de células. Como o escore de porcentagem reflete a fração estimada de células infiltradas positivamente coradas (escore 0, nenhum; escore 1, <10%; escore 2, 10-50%; escore 3, 51-80%; escore 4, > 80%) e o escore de intensidade representa a intensidade estimada de coloração (escore 0, sem coloração; escore 1, fraco; escore 2, moderado; escore 3, forte), a pontuação total variou de 0 a 12. Um escore total de IDO ≤ 4 , a amostra foi classificada como IDO baixo e >4 como IDO alto, como descrito anteriormente por Gastl et al.⁶⁹.

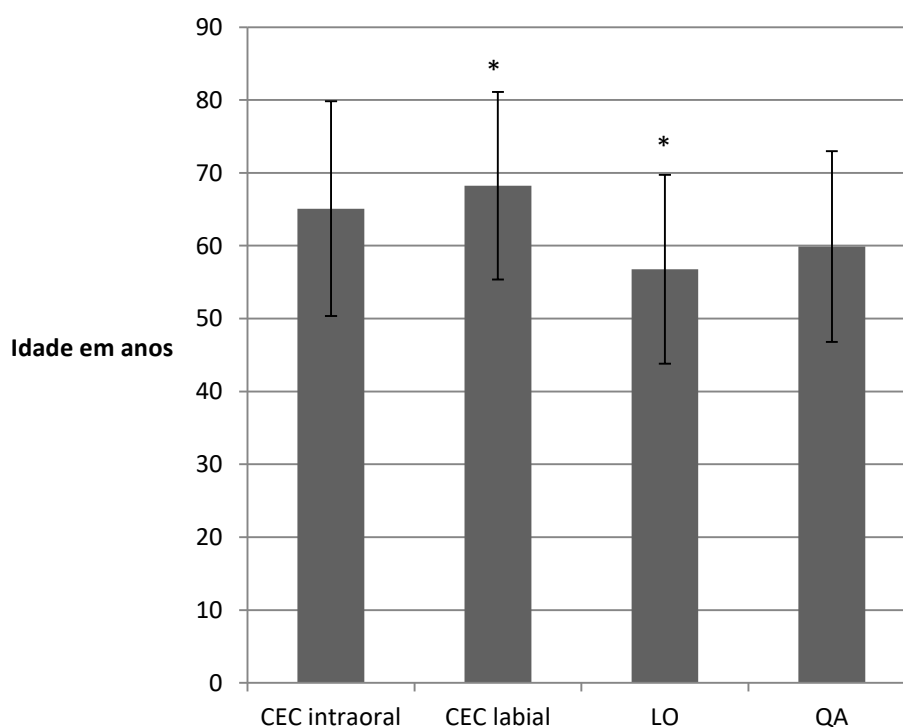
4.7 Análise Estatística

A análise estatística das variáveis qualitativas foi realizada pelo teste exato de Fisher, Qui Quadrado e teste G. Quando necessário, foi realizada a análise de resíduos. Para variáveis quantitativas, para verificar a distribuição da normalidade, foi realizado o teste de Shapiro Wilk, assimetria e curtose por meio da estatística descritiva. Para a verificação da homostaticidade, foi utilizado o teste de Levene. Para comparação entre os grupos, foi usada a análise de variância a um fator (Anova One Way) seguida de pós teste de Tukey. Foram consideradas diferenças estatísticas significantes quando o $p > 0,05$.

5 RESULTADO

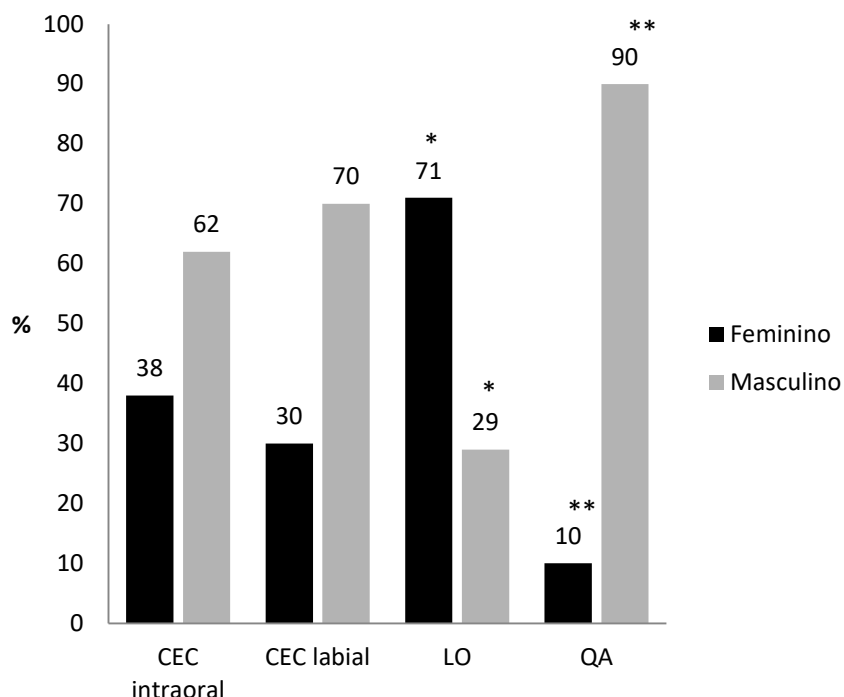
A expressão da IDO foi analisada no total de 85 amostras de CEC intraoral ($n = 21$), CEC labial ($n = 20$), LO ($n = 24$), QA ($n = 20$). A idade média dos pacientes dos grupos analisados foi de 61 anos, sendo a menor média para o grupo LO e a maior para o grupo CEC labial. O teste ANOVA ONE WAY apresentou diferença estatística significativa entre esses dois grupos ($p = 0.0218$). A maioria dos pacientes (64%) era do gênero masculino, sendo o grupo QA com mais pacientes do gênero masculino e o grupo LO com mais do gênero feminino com diferença estatística entre os gêneros desses grupos de acordo com o teste Qui Quadrado ($p = 0.0004$). As características dos pacientes de acordo com os grupos estão resumidas nos gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 - Média de idade dos pacientes por grupo. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



*diferença estatisticamente significativa ($p = 0.0218$).
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 2 - Gênero dos pacientes por grupo. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



*diferença estatisticamente significativa ($p = 0.0004$).

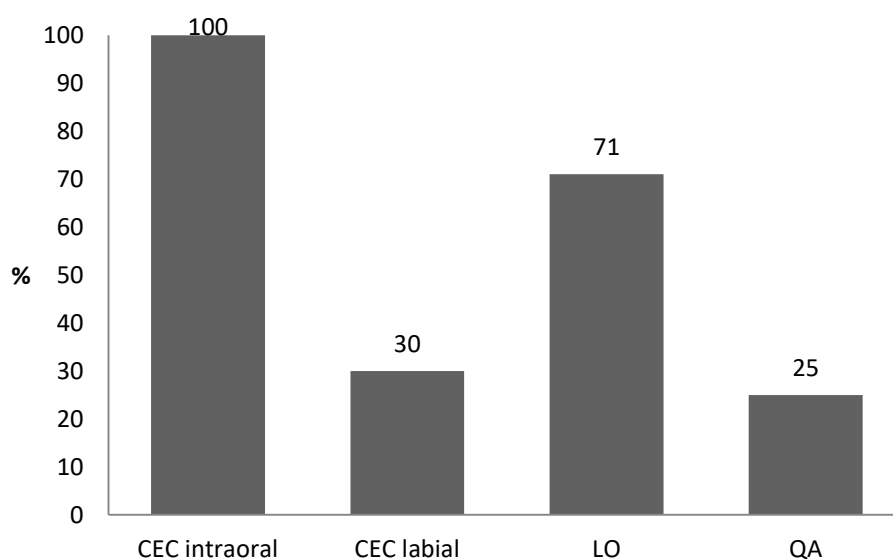
**diferença estatisticamente significativa ($p = 0.0004$).

Fonte: Elaboração própria.

5.1 Escore de Intensidade da IDO

A expressão da IDO foi detectada nas amostras, sendo que o padrão predominante de marcação da IDO nas células epiteliais foi citoplasmático; no entanto, cerca de metade dos casos positivos de IDO em cada grupo também exibiram padrão de coloração nuclear. Além disso, os casos mais positivos de IDO mostraram também um número variável de células mononucleares inflamatórias positivas para IDO em localização intravascular ou perivascular. O CEC intraoral apresentou todas as suas amostras positivas, seguido da LO com 71% de positividade. Já o CEC labial e QA tiveram um menor número de amostras expressando IDO, sendo 30% e 25% dos casos, respectivamente (gráfico 3).

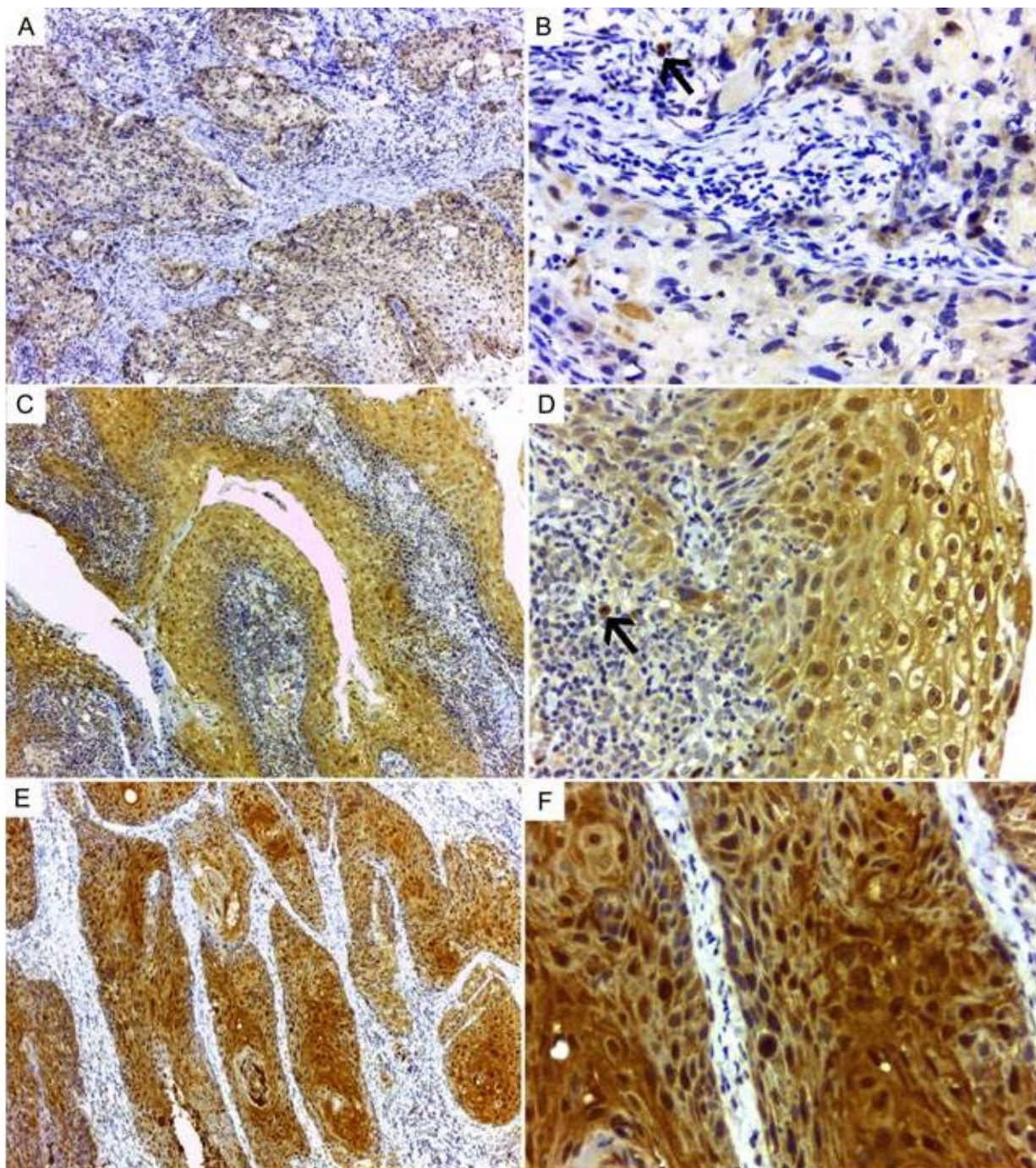
Gráfico 3 - Quantidade de amostras positivas para IDO por grupo. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



Fonte: elaboração própria.

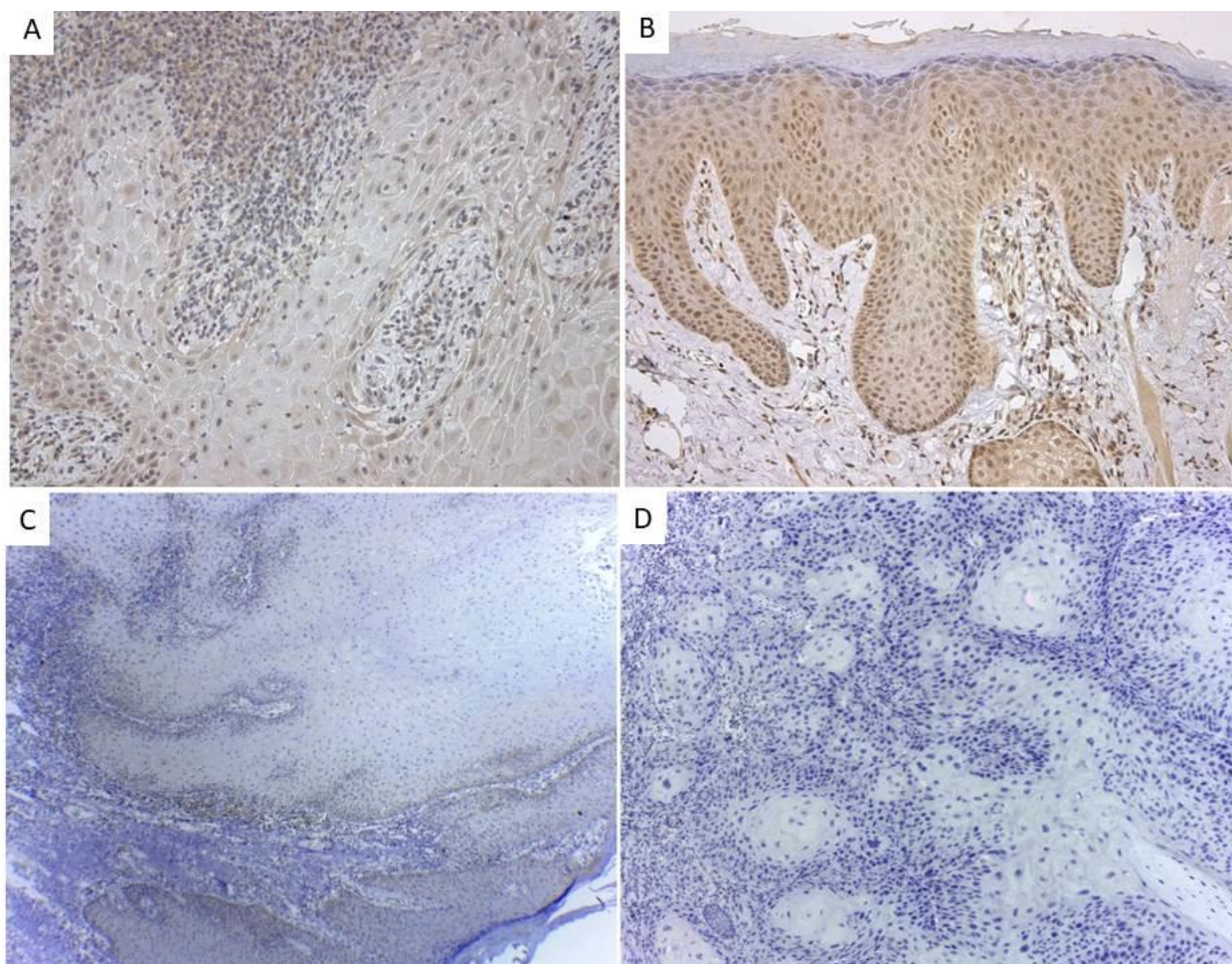
As amostras positivas foram dicotomizadas em dois grupos com baixa expressão (IDO baixo escore ≤ 4 ; $n = 20$; 40.82%) e alta expressão (IDO alto > 4 ; $n = 29$; 59.18%). O grupo de CEC intraoral apresentou mais de 90% das suas amostras no grupo IDO alto e com diferença estatística relevante em relação aos outros grupos ($p = 0.0011$). Os outros três grupos apresentaram mais da metade de suas amostras com baixa expressão de IDO, sendo a QA com 80% de amostras IDO baixo (Figura 1, 2, 3 e 4). As diferenças dos escores de intensidade dos grupos são mostradas no gráfico 4.

Figura 1 - Análise imuno-histoquímica da expressão de IDO no CEC intraoral (A a F)



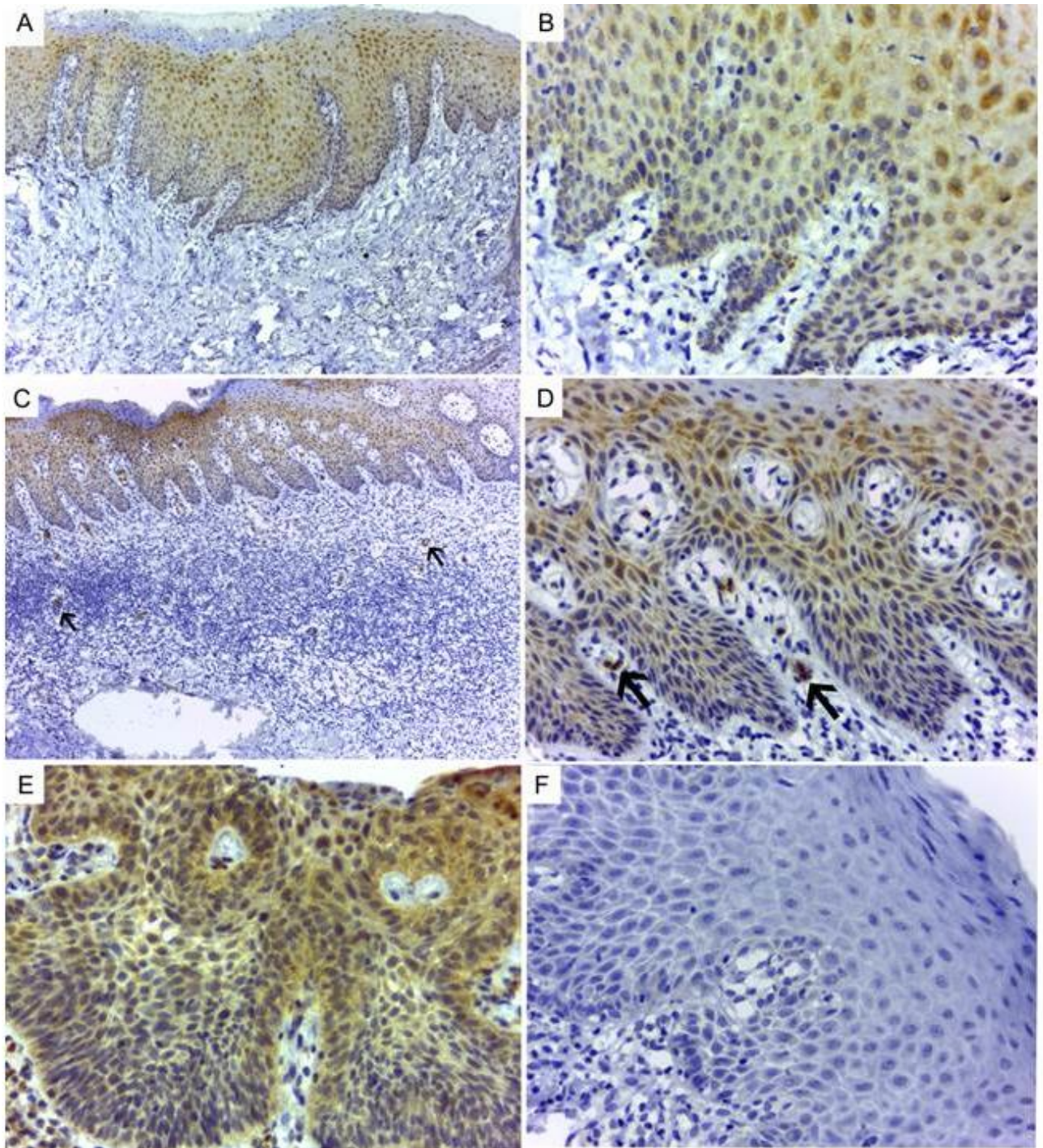
Expressão da IDO baixo (A e B) e expressão da IDO alto (C a F). Observando a expressão de IDO, notamos que apresenta uma intensidade variável. Assim, em relação ao escore de intensidade, os casos com menor expressão apresentaram padrão citoplasmático preferencialmente (A, ampliação original de 100x; B, 400x MO); os casos com expressão moderada mostraram padrões citoplasmáticos e nucleares (C, 100x; D, 400x; MO); e nos casos com forte expressão, o padrão nuclear era muito evidente (E, 100x; F, 400x; OM). Observe as células mononucleares inflamatórias positivas para IDO (setas) (B e D, 400x OM). Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 - Análise imuno-histoquímica da expressão de IDO no CEC labial



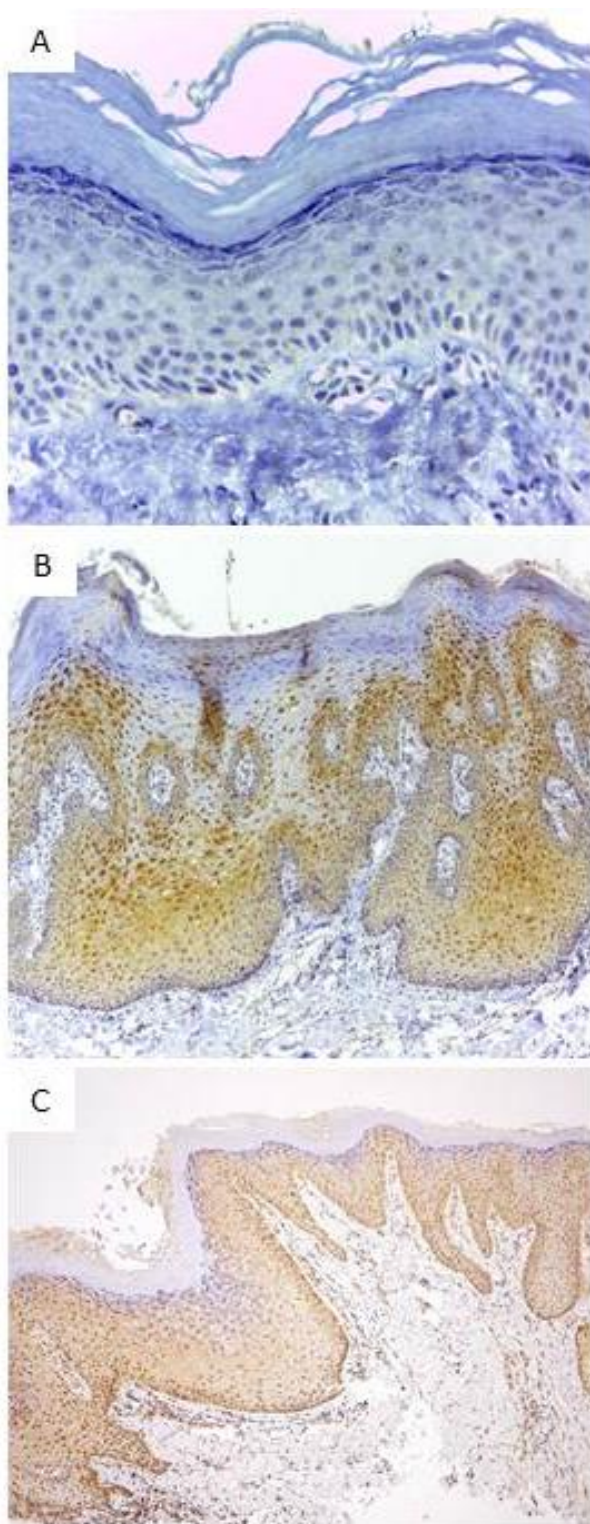
Apenas 30% do CEC labial foi positivo para IDO, em A vemos IDO baixo e em B IDO alto (A, 200x; B, 200x; MO). Em C e D temos casos negativos (C, 100x; D, 400x; MO). Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 - Análise imuno-histoquímica da expressão da IDO na LO (A a F)



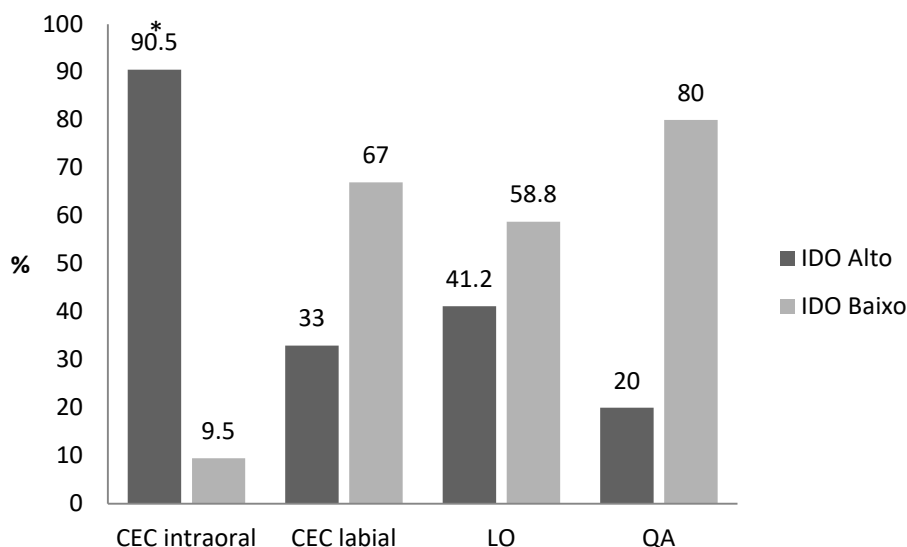
LO com displasia epitelial de baixo grau e IDO alto (A, ampliação original de 100x; B, 400x; MO). Em C e D também notamos a presença de células mononucleares inflamatórias (setas) (C, 100x; D, 400x; MO). Em E temos LO com displasia epitelial de alto grau e IDO alto (E, 400x MO). No entanto, 29% dos casos de LO foi negativa para IDO (F, 400x MO). Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Análise imuno-histoquímica da expressão da IDO na QA



A maioria dos casos de QA foi negativa para IDO (A, 400x MO); entretanto, houve um caso de QA diagnosticado com displasia epitelial de baixo grau que mostrou expressão de IDO alto (B, 400x MO). Em C vemos um caso de displasia epitelial de baixo grau que mostrou expressão de IDO baixo (D, 200x MO). Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 4 - Características da IDO alto e baixo. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



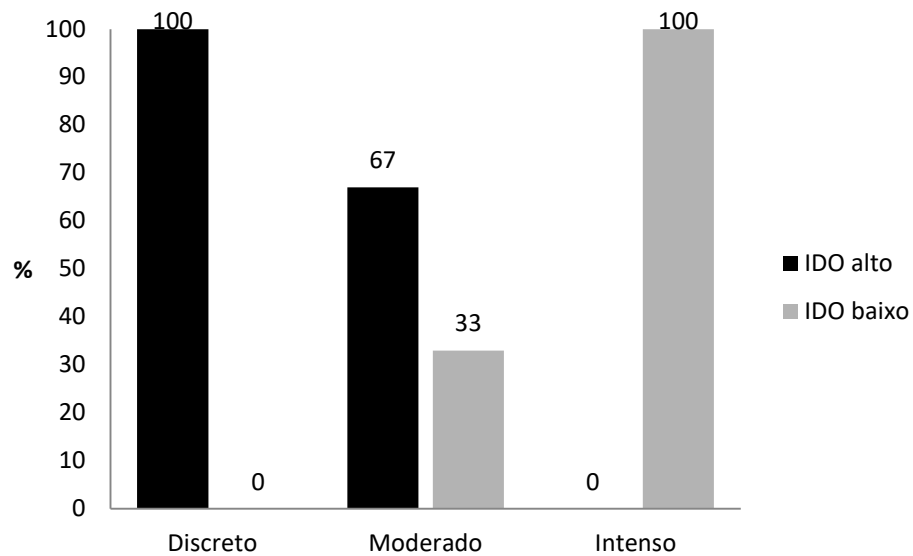
*diferença estatisticamente significativa ($p = 0.0011$).

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Escore de Intensidade e Infiltrado Inflamatório

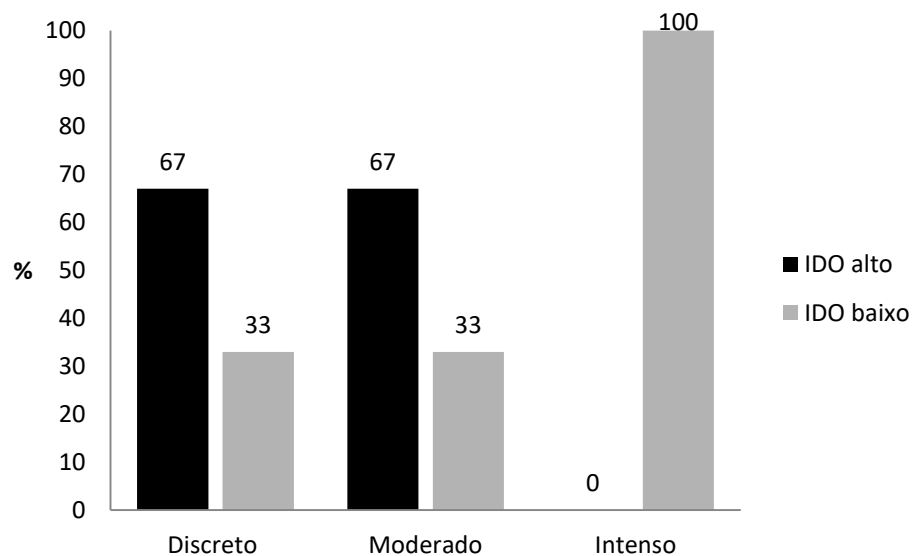
Quando o infiltrado inflamatório foi analisado de acordo com o escore de intensidade, o CEC intraoral apresentou todas as suas amostras IDO alto com discreto infiltrado inflamatório e a única amostra IDO baixo com intenso infiltrado inflamatório. O teste G apresentou diferença estatística nesse grupo ($p = 0.005$). Já no grupo de CEC labial e LO, não houve diferença estatística entre os escores alto e baixo ($p = 0.5012$ e $p = 0.242$, respectivamente). Na QA, não foi possível análise devido ao grupo apresentar apenas uma amostra com infiltrado inflamatório discreto e não ter mais amostras com infiltrado inflamatório associado a IDO positivo, sendo assim, o tamanho da amostra foi insuficiente para análise. As diferenças do infiltrado inflamatório nos grupos de acordo com o escore de intensidade são mostradas nos gráficos 5, 6, 7 e 8.

Gráfico 5 - Porcentagem do infiltrado inflamatório do CEC intraoral de acordo com o escore de intensidade da IDO ($p = 0.005$). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



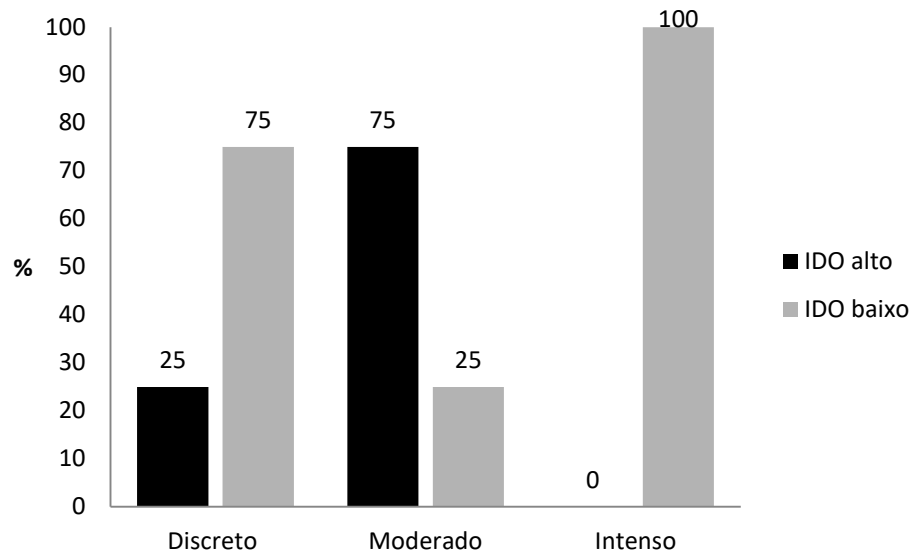
. Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 6 - Porcentagem do infiltrado inflamatório do CEC labial de acordo com o escore de intensidade da IDO ($p = 0.5012$). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



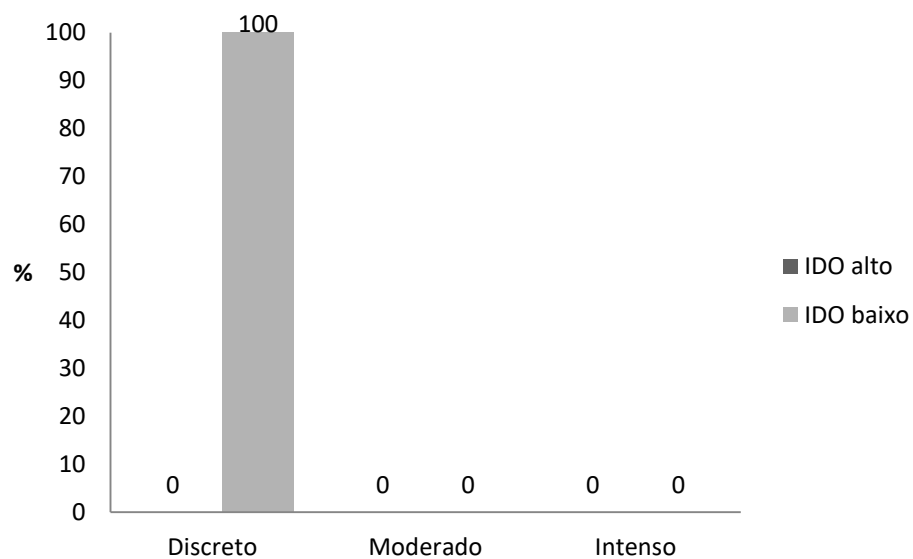
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 7 - Porcentagem do infiltrado inflamatório da LO de acordo com o escore de intensidade da IDO ($p = 0.242$). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 8 - Porcentagem do infiltrado inflamatório da QA de acordo com o escore de intensidade da IDO Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020

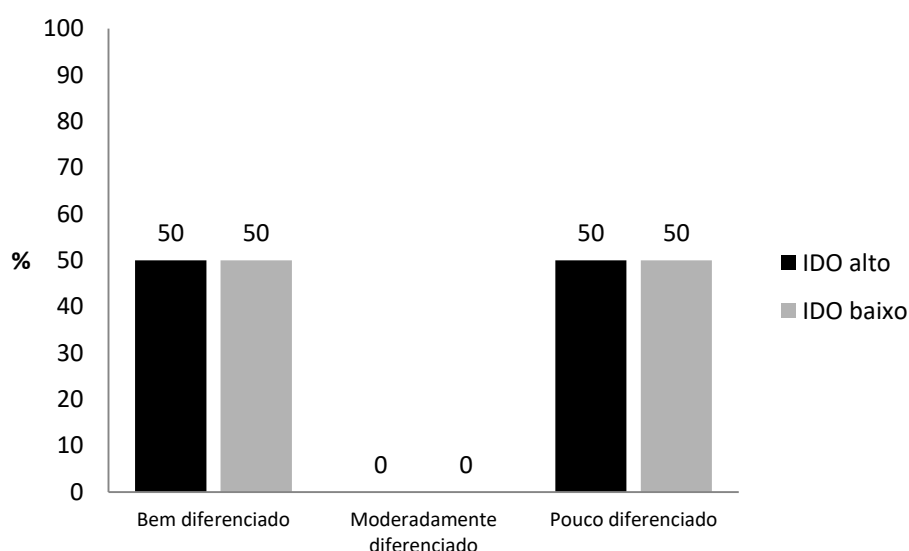


Fonte: Elaboração própria.

5.3 Escore de Intensidade e Classificação Histológica

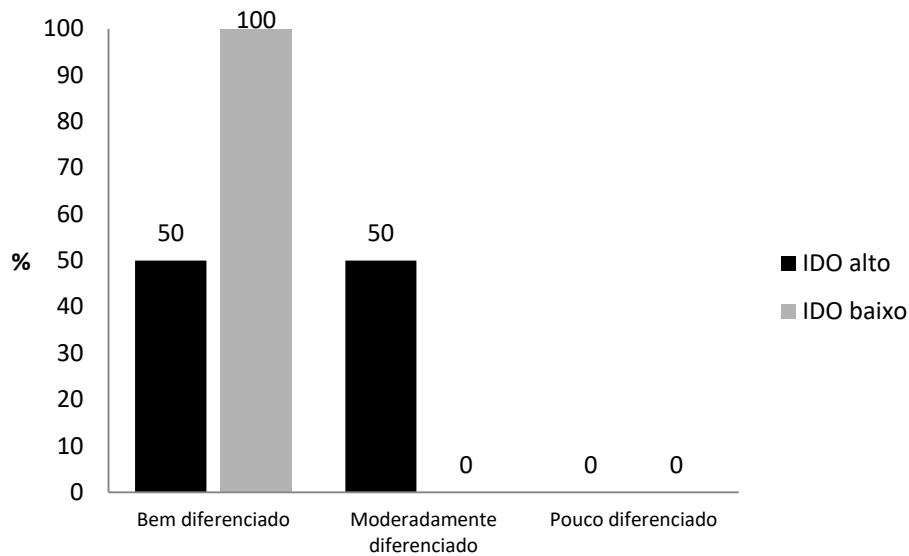
Ao observar os grupos de CEC de acordo com a classificação histológica e escore de intensidade, notamos que o CEC intraoral apresentou 50% das suas amostras IDO alto com classificação histológica bem diferenciada, mas não houve diferença estatística de acordo com o teste Qui Quadrado ($p = 0.2735$). O CEC labial também não apresentou diferença estatística pelo teste Exato de Fisher ($p = 0.3333$) entre a classificação histológica e o escore de intensidade (gráfico 9 e 10).

Gráfico 9 - Porcentagem de amostras positivas de acordo com a classificação histológica e escore de intensidade do CEC intraoral ($p = 0.2735$). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



Fonte: Elaboração própria

Gráfico 10 - Porcentagem de amostras positivas de acordo com a classificação histológica e escore de intensidade do CEC labial ($p = 0.3333$). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020

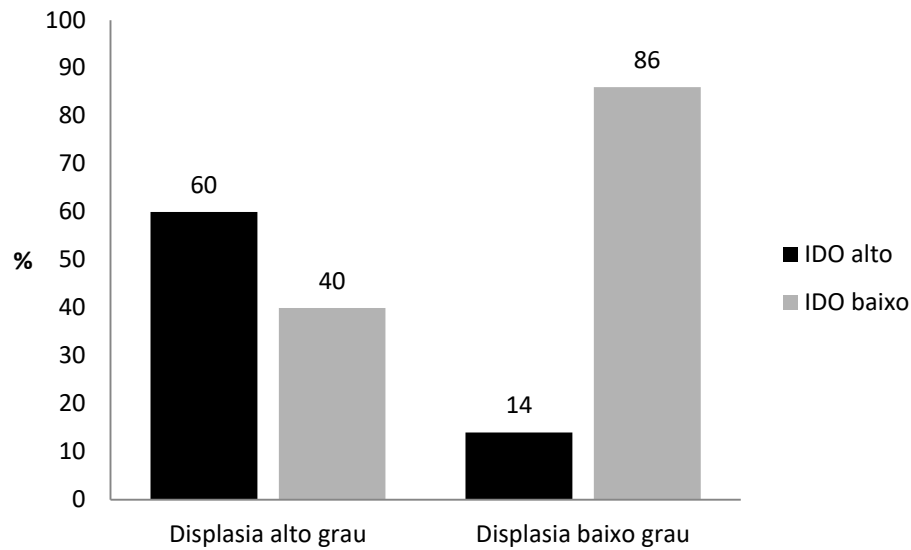


Fonte: Elaboração própria.

5.4 Escore de Intensidade da LO

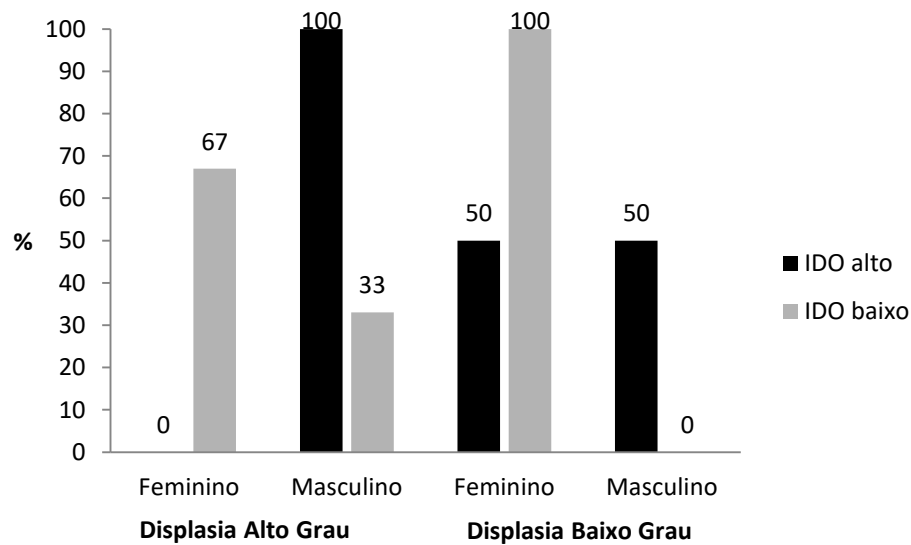
A LO apresentou mais amostras IDO alto com displasia de alto grau e IDO baixo com displasia de baixo grau, porém não houve diferença estatística entre a classificação histológica de alto e baixo grau e o escore de intensidade pelo teste Exato de Fisher ($p = 0.1340$). Quando o escore foi analisado de acordo com o gênero, também não apresentou diferença estatística ($p = 0.4286$ e $p = 0.200$), assim como a classificação do infiltrado inflamatório, pelo teste Exato de Fisher e o teste G ($p = 0.5357$ e $p = 0.4286$). Tanto a LO com displasia de alto, como de baixo grau, não apresentaram amostras sem infiltrado inflamatório e houve apenas uma amostra com infiltrado inflamatório discreto (gráficos 11, 12 e 13).

Gráfico 11 - Porcentagem da displasia da LO de acordo com o escore de intensidade da IDO ($p = 0.1340$). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



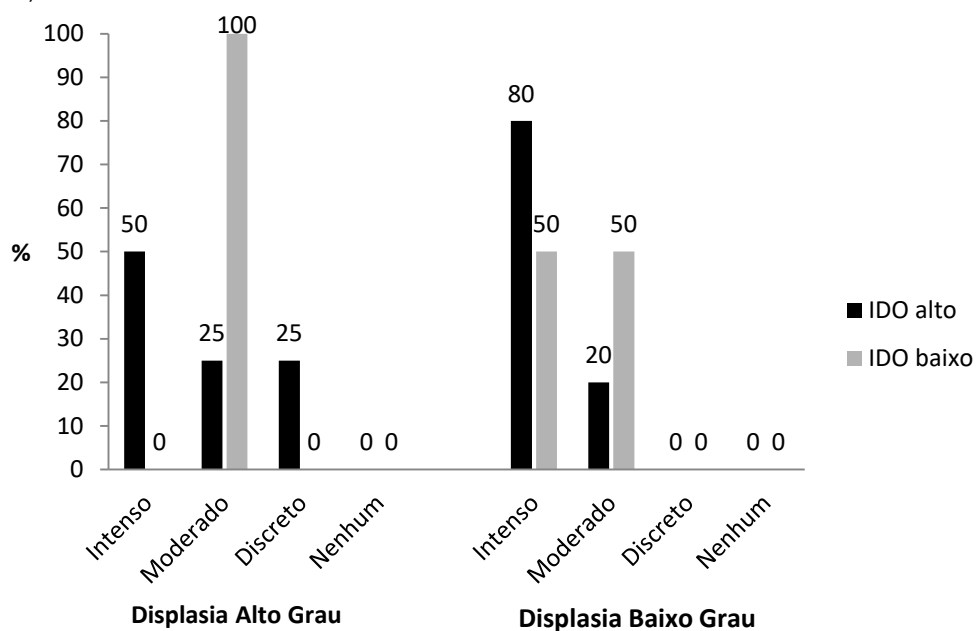
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 12 - Porcentagem da incidência do gênero da LO de acordo com o grau de displasia e o escore de intensidade da IDO ($p = 0.4286$ e $p = 0.2000$). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 13 - Porcentagem do infiltrado inflamatório da LO de acordo com o grau de displasia e o escore de intensidade da IDO ($p = 0.5357$ e $p = 0.4286$). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020

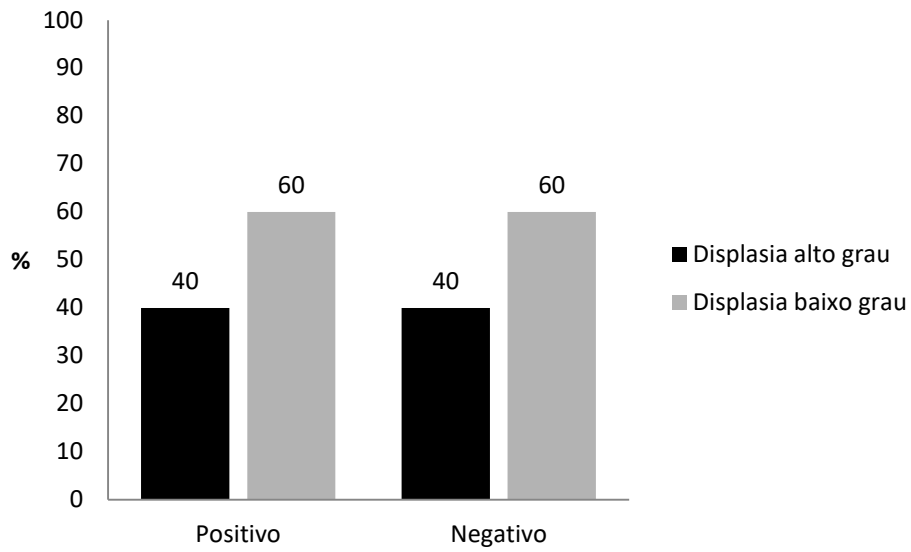


Fonte: Elaboração própria.

5.5 Positividade da QA

A QA apresentou 70% das suas amostras negativas para a IDO. Quando as amostras positivas foram analisadas de acordo com a classificação histológica de alto e baixo grau pelo teste Qui Quadrado, não houve diferença estatística ($p = 0.9964$). As amostras positivas e negativas da QA de acordo com a displasia de alto e baixo grau estão resumidas no gráfico 14.

Gráfico 14 - Amostras positivas e negativas da QA de acordo com o grau de displasia.
Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2020



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O potencial de transformação maligna de algumas desordens estimulou o interesse crescente em pesquisa em níveis celulares e moleculares, contudo a evolução da LO e QA para o CEC ainda não está bem esclarecida. Assim sendo, um passo fundamental para melhorar os resultados dos tratamentos contra o câncer oral é identificar os fatores que impulsionam o início e a progressão da doença, posto que esses fatores possam representar bons candidatos a terapias específicas e individualizadas³³.

Esse é o primeiro estudo da literatura que avaliou e correlacionou a expressão de IDO em CEC intraoral, labial, LO e QA. Existem apenas quatro estudos sobre IDO em carcinoma em cavidade oral^{59,60,64,65}. Outros dois estudos fizeram análises em lábio inferior, um em CEC e o outro em QA, sendo este último, o único que estudou a expressão da IDO em uma DPMO, não existindo assim, até o momento, nenhum estudo em LO^{61,67}.

O mau prognóstico de alguns tipos de câncer está relacionado à alta expressão da IDO, já que ela atua, facilitando o desenvolvimento do câncer por meio da formação de tolerância imunológica. A IDO pode atuar melhorando a proliferação e invasão celular, além de contribuir com a metástase de células cancerígenas.⁵⁸ No presente estudo, todas as amostras de CEC intraoral foram positivas para IDO, considerando que mais de 90% das amostras apresentavam uma alta expressão. Laimer et al.⁶⁰ encontrou todas as amostras de CEC intraoral positivas para IDO, sendo que os pacientes que tiveram uma alta expressão apresentaram menor tempo de sobrevida em relação aos pacientes com baixa expressão. A alta expressão de IDO representou um fator prognóstico negativo significativo em pacientes com CEC intraoral, especialmente naqueles pacientes submetidos à radioquimioterapia. No CEC em língua e em outras doenças oncológicas, a expressão de IDO também está associada ao mau prognóstico^{50,70}.

Os casos de CEC intraoral, no estudo de Laimer et al.⁶⁰, exibiram positividade para IDO em células tumorais com um padrão predominante de coloração citoplasmática. Alta expressão de IDO foi observada em 44,2% desses casos, representando um fator prognóstico negativo significativo. Da mesma forma,

observamos a positividade do IDO em todos os casos de CEC intraoral; no entanto, algumas diferenças eram evidentes. A coloração nuclear do IDO nas células tumorais também foi visualizada em cerca de metade dos casos, os tecidos epiteliais de aparência normal adjacentes ao tumor, bem como as células mononucleares inflamatórias também eram frequentemente positivos para IDO. Embora o padrão de coloração citoplasmática da IDO seja frequentemente observado em muitos tipos de cânceres humanos, o padrão de coloração nuclear IDO também pode ser observado como evidenciado no presente estudo e principalmente nos casos de CEC intraoral, que mostram um forte padrão de imunocoloração^{60,65}. Quando os níveis citoplasmáticos da IDO são altos, ele pode se translocar para o núcleo e se envolver na regulação de genes e / ou fatores de transcrição, caminho que ainda não foi discutido. Além disso, a positividade da IDO observada nos tecidos epiteliais de aparência normal adjacentes ao tumor pode indicar alterações morfológicas e / ou moleculares precoces envolvidas na carcinogênese oral.

Pacientes com câncer intraoral, especialmente de língua, assoalho bucal e gengiva apresentam sobrevida de cinco anos 2 a 3 vezes menor em comparação a pacientes com câncer de lábio^{5,6,7}. Kualet et al.⁶¹ avaliaram a expressão da IDO no CEC labial e observaram positividade em 25% dos casos, preferencialmente expressa em células mielóide CD11, S100 e células dendríticas, enquanto o epitélio foi uniformemente negativo. No entanto, diferentemente, a positividade da IDO nos casos de CEC labial foi significativamente associada à intensidade do infiltrado associado ao câncer. No nosso estudo, observamos positividade da IDO em percentual semelhante ao estudo de Kualet et al.⁶¹; no entanto, preferencialmente o epitélio e as escassas células mononucleares inflamatórias foram positivas para IDO, sem associação significativa com a intensidade do infiltrado inflamatório. Esses achados podem indicar que a expressão de IDO nas células tumorais e nas células inflamatórias / imunológicas contribui para a patogênese do CEC labial.

Diversos fatores influenciam o desenvolvimento do CEC labial e QA, entretanto a exposição à radiação UV é, fortemente, aceita como a principal causa de desenvolvimento do CEC labial⁷¹. No entanto, a perda do controle do microambiente determina o desenvolvimento da QA e posteriormente do CEC labial. Apenas um estudo avaliou a expressão de IDO na QA, que mostrou positividade em 48% dos casos, preferencialmente expressa em células mielóides S100, CD11c, e

células dendríticas, enquanto o epitélio foi consistentemente negativo para IDO. A expressão do IDO foi correlacionada significativamente com o grau de atipia epitelial, mas não com a extensão da inflamação⁶⁷. Diferentemente, na série atual, apenas 25% dos casos de QA apresentaram positividade para IDO e que foi expressa preferencialmente no epitélio e em células mononucleares inflamatórias escassas, sem correlação com o grau de displasia epitelial. Esses achados sugeriram uma heterogeneidade fenotípica de subconjuntos celulares em relação à expressão de IDO na QA e possíveis mecanismos imunomoduladores para evitar respostas imunes antitumorais. Sendo assim, a IDO parece não ser um fator necessário para a evolução da QA em CEC labial.

O perfil demográfico de pacientes com QA relatado na literatura é de homens com mais de 50 anos, pele clara e elevado tempo de exposição solar⁴⁰. Os resultados do presente estudo estão de acordo com esse perfil de pacientes, já que mostrou uma média de idade de 59 anos nos pacientes com QA, enquanto que nos pacientes com CEC labial, a média de idade foi de 68 anos e, em ambos, o gênero predominante foi o masculino. As mulheres podem ter menor probabilidade de desenvolver QA durante a vida devido ao uso de batom e protetor solar labial, o que protege parcialmente os lábios do sol, além do tipo de ocupação de trabalho que ela realizam⁷². As nossas amostras de LO tiveram uma predominância do gênero feminino, diferente do perfil demográfico relatado na literatura, porém condizente com o perfil encontrado no nosso Serviço, que mostra um predominância feminina. Tal fato pode ser explicado pelas mulheres procurarem mais atendimentos odontológicos para avaliação de lesões em estágio inicial do que os homens, sendo essa uma característica encontrada no nosso Serviço.

Ao utilizar um sistema de classificação microscópica binária, em que a displasia oral foi classificadas como de baixo ou alto grau, a LO com displasia classificada como de alto grau apresentou mais amostras com alta expressão de IDO em relação à LO com baixo grau, que teve mais amostras com baixa expressão. Tal fato demonstra que, embora não estatisticamente significante, a IDO foi, predominantemente, expressa em displasias de alto grau em comparação às de baixo grau. A ausência de diferenças comparando a expressão IDO e lesões com displasia de baixo ou alto grau nos grupos de LO e QA poderia sugerir o envolvimento da IDO na regulação das respostas imunes, e não nas alterações morfológicas e / ou moleculares precoces observadas nas DPMO. Nesse caso,

possivelmente, a LO com displasia de alto grau, provavelmente, está em processo de carcinogênese, apesar de não visível morfológicamente na análise anatomopatológica. Em conjunto, é possível que a expressão da IDO na LO apoie a progressão do câncer inibindo as respostas imunes mediadas por células.

Comparando a expressão de IDO do CEC intraoral com as displasias de alto e baixo grau na LO, verifica-se que a maior expressão ocorre no CEC intraoral, porém a LO também apresenta uma grande quantidade de amostras positivas. A expressão de IDO nesta DPMO sugere que à medida que essa lesão se desenvolve para um câncer, em algum estágio específico, ocorrerá a expressão de IDO. Esse evento pode facilitar o crescimento do tumor ou, se ele não ocorrer, manter o status de DPMO⁶⁸. Tal fato aumenta a evidência de que a IDO está envolvida na formação do ambiente que apoia o crescimento tumoral⁵⁹.

7 CONCLUSÃO

O CEC intraoral apresenta alta expressão de IDO, o que, possivelmente, fomenta o seu comportamento mais agressivo e pior prognóstico em relação ao CEC labial, que apresenta pouca expressão de IDO. Nesse cenário, as abordagens imunoterapêuticas direcionadas às células que expressam IDO podem melhorar a sobrevivência de pacientes com CEC intraoral.

A IDO atua, indicando uma progressão tumoral, evidenciando a sua participação em mecanismos importantes para o desenvolvimento do câncer. Porém, esse fato ocorre mais especificamente para a LO que teve maior expressão, sendo que a LO com displasia epitelial de alto grau teve predomínio de alta expressão de IDO. Na QA a expressão foi, predominantemente, negativa e sem diferença com o grau de displasia.

REFERÊNCIAS*

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68 (6): 394-424.
2. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol.* 2018; 52(Pt 2): 228-40.
3. The Oral Cancer Foundation 2019 [acesso em 9 out 2019]. Disponível em: <https://oralcancerfoundation.org/facts/>.
4. Sarode SC, Sarode GS, Tupkari JV. Oral potentially malignant disorders: a proposal for terminology and definition with review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014; 18(1): S77-80.
5. Schneider IJ, Flores ME, Nickel DA, Martins LG, Traebert J. Survival rates of patients with cancer of the lip, mouth and pharynx: a cohort study of 10 years. *Rev Bras Epidemiol.* 2014; 17(3): 680-91.
6. Olaleye O, Ekrikpo U, Lyne O, Wiseberg J. Incidence and survival trends of lip, intra-oral cavity and tongue base cancers in south-east England. *Ann R Coll Surg Engl.* 2015; 97(3): 229-34.
7. Kerawala C, Roques T, Jeannon JP, Bisase B. Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol.* 2016; 130(S2): S83-S89.
8. Reibel J, Gale N, Hille J, Hunt JL, Lingen M, Muller S, et al. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PPJ, eds. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th ed. Lyon: IARC; 2017: p. 112-15.
9. 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.
10. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* 2009; 45(4-5): 301-8.
11. Yap T, Celentano A, Seers C, McCullough MJ, Farah CS. Molecular diagnostics in oral cancer and oral potentially malignant disorders- a clinician's guide. *J Oral Pathol Med.* 2019; Jul 16.
12. Tilakaratne WM, Sherriff M, Morgan PR, Odell EW. Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 533-40.

* 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. Farah CS, Woo S-B, Zain RB, Sklavounou A, McCullough MJ, Lingen M. Oral cancer and oral potentially malignant disorders. *Int J Dent.* 2014; 2014: 853479.
14. Sarode GS, Sarode SC, Maniyar N, Sharma N, Yerwadekar S, Patil S. Recent trends in predictive biomarkers for determining malignant potential of oral potentially malignant disorders. *Oncol Rev.* 2019; 13(2): 424.
15. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(10): 715-27.
16. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 2002; 9(10): 1069-77.
17. Hornyak L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, et al. The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in cancer development, diagnostics, and therapy. *Front Immunol.* 2018; 9: 151.
18. Munn DH, Mellor AL. IDO in the tumor microenvironment: inflammation, counter-regulation, and tolerance. *Trends Immunol.* 2016; 37(3): 193-207.
19. Ye Z, Yue L, Shi J, Shao M, Wu T. Role of IDO and TDO in cancers and related diseases and the therapeutic implications. *J Cancer.* 2019; 10(12): 2771–82.
20. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003; 39(8): 770-80.
21. Mello FW, Miguel AFP, Dutra KL, Porporatti AL, Warnakulasuriya S, Guerra ENS, Rivero ERC. Prevalence of oral potentially malignant disorders: a systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med.* 2018; 47(7): 633-40.
22. Kumar S, Narayanan VS, Ananda SR, Kavitha AP, Krupashankar R. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in adult population visiting primary health centers and community health centers in Kodagu district. *J Family Med Prim Care.* 2019; 8(7): 2337-42.
23. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018; 125(6): 582-90.
24. Nadeau C, Kerr AR. Evaluation and management of oral potentially malignant disorders. *Dent Clin North Am.* 2018; 62(1): 1-27.
25. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. World Health Organization Classification of Tumors: pathology and genetics: Head and Neck Tumors, 4th Edition, Volume 9, 2017.

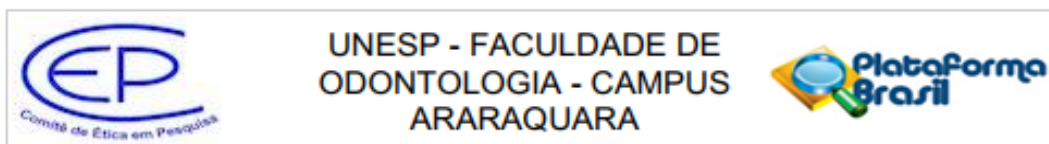
26. Tadakamadla J, Kumar S, Lalloo R, Jhonson NW. Development and validation of a quality-of-life questionnaire for patients with oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2017; 123(3): 338–49
27. Mehanna HM, Rattay T, Smith J, McConkey CC. Treatment and follow-up of oral dysplasia - a systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2009; 31(12): 1600-9.
28. Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral Oncol*. 2009; 45 (8): 647-53.
29. Ramos-García P, González-Moles MÁ, Ayén Á, González-Ruiz L, Gil-Montoya JA, Ruiz-Ávila I. Predictive value of CCND1/cyclin D1 alterations in the malignant transformation of potentially malignant head and neck disorders: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2019; 41 (9): 3395-407.
30. Alaizari NA, Sperandio M, Odell EW, Peruzzo D, Al-Maweri SA. Meta-analysis of the predictive value of DNA aneuploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. *J Oral Pathol Med*. 2018; 47 (2): 97-103.
31. 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.
32. Scully C. Challenges in predicting which oral mucosal potentially malignant disease will progress to neoplasia. *Oral Dis*. 2014; 20 (1):1-5.
33. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(1): 1–10.
34. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med*. 2016; 45 (3): 155-66.
35. 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.
36. Villa A, Celentano A, Glurich I, Borgnakke WS, Jensen SB, Peterson DE, et al. World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia: A systematic review of longitudinal studies. *Oral Dis*. 2019; 25 Suppl 1: 64-78.
37. Boy SC. Leukoplakia and erythroplakia of the oral mucosa--a brief overview. *SADJ*. 2012; 67(10): 558-60.
38. Wood NH, Khammissa R, Meyerov R, Lemmer J, Feller L. Actinic cheilitis: a case report and a review of the literature. *Eur J Dent*. 2011; 5: 101-106.

39. de Oliveira Ribeiro A, da Silva LC, Martins-Filho PR. Prevalence of and risk factors for actinic cheilitis in Brazilian fishermen and women. *Int J Dermatol*. 2014; 53: 1370-76
40. Jadotte YT, Schwartz RA. Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66: 173-184.
41. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis*. 2004; 10(4): 212-6.
42. Rocha AFL. Caracterização da queilite actínica como desordem potencialmente maligna oral [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2019.
43. Custódio M, Pelissari C, Santana T, Trierveiler M. Expression of cancer stem cell markers CD44, ALDH1 and p75NTR in actinic cheilitis and lip cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2018; 275(7): 1877-83.
44. Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Damante JH, de Mello EF Jr, Ikoma MR, Garlet GP, Costa MR, Cavassani KA, da Silva JS, Campanelli AP. 51 Regulatory T cells in the actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med*. 2014 Nov; 43(10):754-60.
45. Lopes MLDS, Gonzaga AKG, Mosconi C, Palomino GM, Mendonça EF, Batista AC, Silveira ÉJDD. Immune response and evasion mechanisms in lip carcinogenesis: An immunohistochemical study. *Arch Oral Biol*. 2019; 98: 99-107.
46. Tang H, Qiao J, Fu YX. Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 2016; 370(1): 85-90.
47. Onuchic, A. C., & Chammas, R. Câncer e o microambiente tumoral. *Revista De Medicina*, 2010; 89(1): 21-31.
48. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(10): 715-27.
49. Prendergast GC, Malachowski WJ, Mondal A, Scherle P, Muller AJ. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and its therapeutic inhibition in cancer. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018; 336: 175-203.
50. Thackray SJ, Mowat CG, Chapman SK. Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36: 1120-3.
51. O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res*. 2015; 277: 32-48.
52. Huang L, Baban B, Johnson BA 3rd, Mellor AL. Dendritic cells, indoleamine 2,3 dioxygenase and acquired immune privilege. *Int Rev Immunol*. 2010; 29(2): 133-55.

53. Paveglio SA, Allard J, Foster Hodgkins SR, Ather JL, Bevelander M, Campbell JM, et al. Airway epithelial indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits CD4⁺ T cells during *Aspergillus fumigatus* antigen exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 44(1): 11-23.
54. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998; 281(5380): 1191-3
55. Yang R, Gao N, Chang Q, Meng X, Wang W. The role of IDO, IL-10, and TGF- β in the HCV-associated chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *J Med Virol*. 2019; 91(2): 265-71.
56. Muller AJ, Mandik-Nayak L, Prendergast GC. Beyond immunosuppression: reconsidering indoleamine 2,3-dioxygenase as a pathogenic element of chronic inflammation. *Immunotherapy*. 2010; 2(4): 590.
57. Nishi M, Yoshikawa K, Higashijima J, Tokunaga T, Kashihara H, Takasu C, et al. The impact of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression on stage III gastric cancer. *Anticancer Res*. 2018; 38: 3387-92
58. Jia YQ, Yang B, Wen LL, Mu WX, Wang Z, Cheng B. Prognostic value of immune checkpoint molecules in head and neck cancer: a meta-analysis. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(2): 501-22.
59. Foy JP, Bertolus C, Michallet MC, Deneuve S, Incitti R, Bendriss-Vermare N, et al. The immune microenvironment of HPV-negative oral squamous cell carcinoma from never-smokers and never-drinkers patients suggests higher clinical benefit of IDO1 and PD1/PD-L1 blockade. *Ann Oncol*. 2017; 28(8): 1934-41.
60. Laimer K, Troester B, Kloss F, Schafer G, Obrist P, Perathoner A, et al. Expression and prognostic impact of indoleamine 2,3-dioxygenase in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2011; 47(5): 352-7.
61. Kualess MA, Wenzel J, Schmid-Wendtner MH, Bieber T, von Bubnoff D. Myeloid CD11c⁺ S100⁺ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase at the inflammatory border to invasive lower lip squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. 2011; 26(8): 997-1006.
62. Ye J, Liu H, Hu Y, Li P, Zhang G, Li Y. Tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts poor outcome in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2013; 462(1): 73-81.
63. Ben-Haj-Ayed A, Moussa A, Ghedira R, Gabbouj S, Miled S, Bouzid N, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in nasopharyngeal carcinoma. *Immunol Lett*. 2016; 169: 23-32.
64. Seppälä M, Halme E, Tiilikainen L, Luukkainen A, Laranne J, Rautiainen M, et al. The expression and prognostic relevance of indoleamine 2,3-dioxygenase in tongue squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2016; 136(7): 729-35.

65. Wang H, Mao L, Zhang T, Zhang L, Wu Y, Guo W, et al. Altered expression of TIM-3, LAG-3, IDO, PD-L1, and CTLA-4 during nimotuzumab therapy correlates with responses and prognosis of oral squamous cell carcinoma patients. *J Oral Pathol Med*. 2019; 48(8): 669-76.
66. Vichaya EG, Vermeer DW, Budac D, Lee A, Grossberg A, Vermeer PD, et al. Inhibition of indoleamine 2,3 dioxygenase does not improve cancer-related symptoms in a murine model of human papilloma virus-related head and neck cancer. *Int J Tryptophan Res*. 2019 28; 12: 1178646919872508.
67. von Bubnoff D, Zahn S, Wenzel J, Wilms H, Bieber T, Lüftl M. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in early keratocyte neoplasia of the lower lip correlates to the degree of cell atypia. *Pathol Int*. 2012; 62(2): 105-11.
68. Costa NL, Oton-Leite AF, Cheim-Júnior AP, Alencar Rde C, Bittar GO, Silva TA, Batista AC. Density and migration of mast cells in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. *Histol Histopathol*. 2009; 24(4): 457-65.
69. Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dünser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet*. 2000; 356(9246): 1981-2.
70. Weng T, Qiu X, Wang J, Li Z, Bian J. Recent discovery of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibitors targeting cancer immunotherapy. *Eur J Med Chem*. 2018; 143: 656-69.
71. Muthukrishnan A, Bijai Kumar L. Actinic cheilosis: early intervention prevents malignant transformation. *BMJ Case Rep*. 2017
72. Cintra JS, Torres SCM, Silva MBF, Manhães Júnior LRC, Silva Filho JP, Junqueira JLC. Queilite actínica: estudo epidemiológico entre trabalhadores rurais do município de Piracaia - SP. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2013; 67(2): 118– 21.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Identificação de potenciais biomarcadores envolvidos no processo de transformação maligna das desordens potencialmente malignas da cavidade oral.

Pesquisador: Andreia Bufalino

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 34361814.9.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.760.331

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda com relatório parcial, solicitando prorrogação de prazo para maio/2020, alteração do número de participantes e do título. O resumo do projeto original menciona: A transição da mucosa normal para um carcinoma invasivo é um processo complexo que envolve múltiplas etapas e uma etiologia multifatorial. As alterações da mucosa que precedem a ocorrência de uma neoplasia maligna são de grande interesse neste contexto, sendo estas desordens potencialmente malignas orais (DPMO) alvos de inúmeros estudos. Apesar do enorme progresso no campo da biologia molecular, não há ainda marcadores que preveem de forma confiável a transformação maligna das desordens. Diante disto, identificar potenciais biomarcadores tumorais possam futuramente ser auxiliares no diagnóstico, prognóstico e tratamento dessas doenças. Para isso, amostras de tecidos oriundos de biópsia de DPMOs, carcinomas orais e controle (hiperplasia fibrosa inflamatória) serão analisadas através da associação da microdissecção a laser (ML) com espectrometria de massas (MS). Para esta análise será realizada uma microdissecção do tecido epitelial e conjuntivo das amostras, os quais serão analisados separadamente por MS. Adicionalmente, serão avaliados possíveis mecanismos biológicos associados aos principais biomarcadores identificados com auxílio de ferramentas de bioinformática. Como forma de complementar os achados da MS, iremos avaliar as possíveis diferenças no padrão de resposta imunológica entre as DPMOs. Posteriormente o estudo será validado através de imunohistoquímica

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

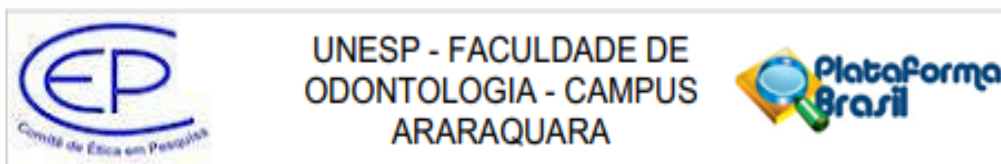
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.760.331

e cultura de células. Portanto, esperamos encontrar com estes estudos novos marcadores biológicos que possam contribuir para o melhor entendimento da natureza molecular e desenvolvimento de potenciais ferramentas diagnósticas e prognósticas auxiliares destas DPMOs.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar potenciais biomarcadores tumorais e/ou diferenças no padrão de resposta imunológica em distúrbios potencialmente malignos e carcinomas que possam futuramente ser auxiliares no diagnóstico, prognóstico e tratamento dessas doenças.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os participantes da pesquisa não estão sujeitos a nenhum risco adicional a biópsia, pois esta é um procedimento necessário para o diagnóstico e acompanhamento da doença sendo necessária para o paciente. Os pacientes receberão acompanhamento durante o a execução do projeto concomitantemente com o Serviço de Medicina Bucal, em caso de qualquer intercorrência os participantes da pesquisa receberão o suporte necessário pela equipe de pesquisa. Os espécimes serão armazenados individualmente em freezer -80°C, em recipientes próprios e identificados por códigos, garantindo a preservação do material e o seu anonimato. O material ficará sob a guarda da Profa. Dra. Andreia Bufalino do departamento de Diagnóstico e Cirurgia, a qual ficará como responsável pela autorização de uso do material. Além disso, as células de cultura primária serão igualmente armazenadas em freezer -80°C em recipientes próprios e identificados por códigos. Devemos destacar que somente um paciente dentre aqueles do grupo LVP, que aceitar participar voluntariamente, será necessária esta etapa do projeto. Após a conclusão do projeto, em caso de ainda haver alguma linhagem celular viável, tais células serão devidamente descartadas ou reutilizadas em estudos futuros mediante informação e concordância do respectivo paciente.

Benefícios: Diagnóstico histopatológico das lesões orais e acompanhamento durante o período de duração do projeto visando o diagnóstico precoce de qualquer displasia nestas lesões. O estabelecimento da cultura primária também permitirá a realização de futuros testes laboratoriais diagnósticos e terapêuticos pré-clínicos, sem a necessidade da realização de novas biópsias, auxiliando no futuro na compreensão e tratamento e diminuindo os riscos diretos ao paciente de qualquer nova proposta terapêutica. Além disto, o estabelecimento desta linhagem celular representa uma excelente oportunidade de melhorar a compreensão destas patologias por meio de ensaios in vitro.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

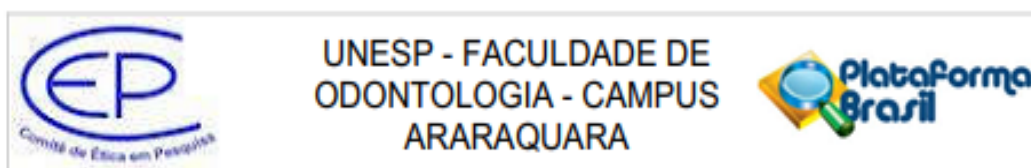
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.760.331

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Fatores negativos: Houve problemas com um dos reagentes utilizados no cultivo da cultura primária, o que levou a perda da culturas estabelecidas e necessidade de isolamento de novas cultura. Contudo, mesmo com essa intercorrência é esperado que a conclusão do projeto ocorra dentro do prazo previsto. Não houve ocorrência de danos. O projeto foi contemplado com os seguintes apoios: Auxílio Regular - FAPESP (Proc. 2017/01438-0) e Projeto Universal - CNPq (Proc. N. 423945/2016-5).

A justificativa para a emenda se dá devido ao atendimento de recomendação de assessor de agência de fomento para a inclusão de outros grupos experimentais para uma melhor validação e confirmação dos resultados. Adicionalmente, foi solicitado alteração de título (novo título "Identificação de potenciais biomarcadores envolvidos no processo de transformação maligna das desordens potencialmente malignas da cavidade oral") para que ficasse mais compatível com o atual desenho do estudo e foram incluídos novos participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda APROVADA em reunião de 05 de dezembro de 2019.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_143514_4_E3.pdf	07/11/2019 11:38:13		Aceito
Cronograma	cronograma.jpeg	07/11/2019 11:37:46	Andreia Bufalino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisaEmendacep.pdf	07/11/2019 11:35:33	Andreia Bufalino	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 3.760.331

Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	20/09/2019 11:24:30	Andreia Bufalino	Aceito
Outros	Emenda.pdf	20/09/2019 10:39:34	Andreia Bufalino	Aceito
Outros	RelatorioParcial2017.pdf	08/06/2017 17:22:45	Andreia Bufalino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmodificado.docx	08/06/2017 17:20:37	Andreia Bufalino	Aceito
Outros	relatorio_parcial_17_03_2016.pdf	17/03/2016 14:22:39	Andreia Bufalino	Aceito
Outros	carta resposta_projeto_Darcy - Copy.jpg	19/09/2014 10:37:15		Aceito
Outros	SOLICITAÇÃO DISPENSA - Copy.jpg	18/07/2014 12:00:00		Aceito
Outros	AUTORIZAÇÃO 2 - Copy.jpg	18/07/2014 11:59:05		Aceito
Outros	AUTORIZAÇÃO 1 - Copy.jpg	18/07/2014 11:58:00		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO CUMPRIMENTO - Copy.jpg	18/07/2014 11:51:21		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO NÃO RESSARCIMENTO - Copy.jpg	18/07/2014 11:51:10		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 11 de Dezembro de 2019

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Autorizo a reprodução e publicação deste trabalho.

Direitos de publicação reservado ao autor

Araraquara, 18 de março de 2020

Maria Leticia de Almeida Lança