

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 13/03/2022.



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Darcy Fernandes

Estudo *ex vivo* e *in vitro* da modulação da imunidade inata e adaptativa por queratinócitos displásicos em leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Darcy Fernandes

Estudo *ex vivo* e *in vitro* da modulação da imunidade inata e adaptativa por queratinócitos displásicos em leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Área de Diagnóstico e Cirurgia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Orientadora:

Prof.^a. Dr.^a. Andreia Bufalino

Araraquara

2020

Fernandes, Darcy

Estudo ex vivo e in vitro da modulação da imunidade inata e adaptativa por queratinócitos displásicos em leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa / Darcy Fernandes.-- Araraquara: [s.n.], 2020

78 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Andreia Bufalino

1. Leucoplasia 2. Sistema imunitário 3. Neoplasias
bucais 4. Técnicas de Cultura de Células 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

Darcy Fernandes

Estudo *ex vivo* e *in vitro* da modulação da imunidade inata e adaptativa por queratinócitos displásicos em leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências Odontológicas na área de Diagnóstico e Cirurgia

Presidente e orientador: Profa. Dra. Andreia Bufalino

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

3º Examinador: Profa. Dra. Marlise Inês Klein Furlan

4º Examinador: Dr. Renato Assis Machado

5º Examinador: Dr. Mauricio da Rocha Dourado

Araraquara, 13 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Darcy Fernandes

Nascimento	10 de novembro de 1989 – Araraquara – SP
Filiação	Darci Aparecido Fernandes Isabel Cristina Devito Fernandes
Formação 2008 a 2012	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP
2013 a 2014	Programa de Aprimoramento Profissional em Estomatologia pela PAP/FUNDAP – Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP
2013 a 2015	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Diagnóstico e Cirurgia, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP
2016 a 2020	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Diagnóstico e Cirurgia, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP com período sanduíche na University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

Aos meus pais, Darci e Isabel, pelo apoio incondicional às minhas escolhas, pelo exemplo de honestidade e força, e por terem muitas vezes abdicado de seus desejos em prol de seus filhos. Agradeço também a eles e ao meu irmão Rafael pelo incentivo, a compreensão, a cooperação e o apoio durante essa etapa. Obrigado pela longa espera.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À professora Dr.^a Andreia Bufalino, por acreditar em mim e pela a liberdade e confiança referente ao presente trabalho, além da indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis. Também agradeço a dedicação, paciência, vontade e tempo investido na minha formação. Obrigado pela oportunidade me oferecida de trabalhar ao seu lado e compartilhar de suas experiências. Levo comigo um grande exemplo de pessoa e docente. Serei sempre muito grato.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr.^a Mirian Aparecida Onofre e a professora Dr.^a Cláudia Maria Navarro pelos ensinamentos, atenção, companheirismo e cooperação sempre que requisitadas.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, por terem compartilhado todas as etapas e as dificuldades dos momentos deste trabalho.

Aos meus amigos Heitor Albergoni da Silveira, Camila de Oliveira Barbeiro, Mariel. Ruivo Biancardi, Vinícius Krieger Costa Nogueira, Igor Paulino Mendes Soares, Gabriel Grando Barbosa e André Luiz Alselmi pela amizade e companheirismo. Também aos meus amigos Danielle Wajngarten, André Luís dos Santos, Ana Carolina Massariolo e Jessica Hayakawa pela amizade e carinho. Vocês fizeram com que esse caminho fosse traçado de maneira mais feliz. Levarei vocês para sempre comigo.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representada pela digníssima Diretora Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Sgavioli Massucato.

À Coordenação da Pós-Graduação do programa Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2017/01798-0; 2017/01438-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

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

E a todos que me incentivaram, apoiaram, ajudaram e contribuíram nessa minha etapa.

"Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A mágica presença das estrelas!"

Mário Quintana*

* Quintana, M. Espelho Mágico. Porto Alegre: Editora Globo; 1951.

Fernandes D. Estudo *ex vivo* e *in vitro* da modulação da imunidade inata e adaptativa por queratinócitos displásicos em leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral e muitas vezes estes tumores são precedidos por alterações clínicas que apresentam um evidente potencial de transformação maligna, as quais são chamadas de distúrbios potencialmente malignos orais (DPMOs). Dentre estas, a leucoplasia oral (LO) possui taxa de transformação maligna que varia de 0,2% até 17,5%; contudo, uma outra DPMO conhecida como leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) apresenta um comportamento persistente e progressivo para malignidade, com taxa de transformação maligna maior que 70%. Diferente da LO, fator de risco como tabaco, álcool e noz de areca não parecem estar associados com o desenvolvimento da LVP. Adicionalmente, a LVP frequentemente apresenta resposta inadequada a todas as modalidades de tratamento, sofre rápida disseminação pelos sítios orais e muitas vezes demonstra recorrência. Estudos recentes sugerem que o infiltrado inflamatório associado às lesões leucoplásicas de paciente com LVP pode estar relacionado a etiologia e/ou comportamento clínico agressivo desta DPMO. Assim, foi realizada uma análise comparativa entre amostras de LO e LVP que consistiu em: (1) avaliar a porcentagem e identificar os subtipos de linfócitos T auxiliares e estado de ativação de linfócitos T citotóxicos, (2) avaliar a densidade e estado de ativação das células dendríticas, e (3) determinar o efeito de produtos solúveis de células displásicas na modulação da imunidade inata e/ou adaptativa e se tal modulação confere uma vantagem para a progressão do tumor. Para alcançar estes objetivos, a expressão imuno-histoquímica de marcadores linfócitos T e B, para células dendríticas (CD) de Langerhans, CD submucosas imaturas e maduras, CD plasmocitóides, foram utilizados. Adicionalmente, ensaios com cultura de células foram realizados para acessar o potencial modelador de fatores solúveis produzidos por culturas celulares derivadas de PVL sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Estes ensaios incluíram a avaliação das taxas de apoptose e imunofenotipagem dos PBMCs após contato com meios de cultura condicionados de diferentes culturas celulares, incluindo queratinócitos normais (HOK), displásicos (DOK e DOK-PVL) e tumorais (SCC-25). Os resultados da análise imuno-histoquímica mostraram uma redução global de células T e B acompanhada de uma inibição da ativação de células Th17 e consequente indução de uma resposta imune mediada por células Treg na LVP, parece favorecer o comportamento mais agressivo desta DPMO em relação a LO. Adicionalmente, CD de Langerhans, maduras e plasmocitóides estão reduzidas nos compartimentos epitelial e subepiteliais na LO e LVP em relação ao controle. Por outro lado, CD imaturas encontram-se aumentadas nos compartimentos epitelial e subepiteliais destas duas DPMOs. Juntos, estes achados favorecem uma apresentação inadequada dos antígenos pré-tumorais facilitando a tolerância imunológica. Os experimentos com cultura de células revelaram ainda, que os produtos solúveis de queratinócitos displásicos tem capacidade de alterar o fenótipo dos PBMCs favorecendo a transformação maligna de DPMOs. Assim, os resultados deste estudo indicam que os produtos solúveis dos queratinócitos derivados de LVP são capazes de modular de forma distinta a resposta imunológica desta DPMO em relação à LO, sendo esta modulação acompanhada do ganho de vantagens que favorecem o processo de tumorigênese.

Palavras-chave: Leucoplasia. Sistema imunitário. Neoplasias bucais. Técnicas de cultura de células.

Fernandes D. Ex vivo and in vitro study of the modulation of innate and adaptive immunity by dysplastic keratinocytes in oral leukoplakia and proliferative verrucous leukoplakia [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (SCC) represents more than 95% of all malignant neoplasms that affect the oral cavity and these tumors are often preceded by clinical changes that have an evident potential for malignant transformation, which are called potentially malignant oral disorders (OPMDs). Among these, oral leukoplakia (OL) has a malignant transformation rate that varies from 0.2% to 17.5%; however, another OPMD known as proliferative verrucous leukoplakia (PVL) has a persistent and progressive behavior for malignancy, with a malignant transformation rate greater than 70%. Unlike OL, a risk factor such as tobacco, alcohol and areca nut does not seem to be associated with the development of PVL. Additionally, PVL often presents an inadequate response to all treatment modalities, suffers rapid dissemination through oral sites and often shows recurrence. Recent studies suggest that the inflammatory infiltrate associated with leukoplakic lesions in a patient with PVL may be related to the etiology and / or aggressive clinical behavior of this OPMD. Thus, a comparative analysis was performed between OL and PVL samples that consisted of: (1) evaluating the percentage and identify subtypes of auxiliary T lymphocytes and activation status of cytotoxic T lymphocytes, (2) evaluating the density and activation status of dendritic cells, and (3) determine the effect of soluble products of dysplastic cells on the modulation of innate and / or adaptive immunity and whether such modulation confers an advantage for progression of the tumor. To achieve these goals, immunohistochemical expression of markers for Langerhans dendritic cells (DC), immature and mature submucous DC, plasmacytoid DC, T and B lymphocytes were used. In addition, cell culture assays were performed to access the potential modeling of soluble factors produced by PVL-derived cell cultures on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). These trials included the assessment of apoptosis and immunophenotyping rates of PBMCs after contact with conditioned culture media from different cell cultures, including normal keratinocytes (HOK), dysplastic (DOK and DOK-PVL) and tumor (SCC-25). The results of the immunohistochemical analysis showed a global reduction in T and B cells accompanied by an inhibition of Th17 cell activation and the consequent induction of an immune response mediated by Treg cells in PVL, seems to favor the more aggressive behavior of this OPMD in relation to OL. In addition, Langerhans DC, matures and plasmacytoids are reduced in the epithelial and subepithelial compartments in the OL and PVL in relation to the control. In contrast, immature DCs are increased in the epithelial and subepithelial compartments of these two OPMD. Together, these findings favor an inadequate presentation of pre-tumor antigens, facilitating immunological tolerance. The experiments with cell culture also revealed that the soluble products from dysplastic keratinocytes may to change the PBMCs phenotype favoring the malignant transformation of OPMD. Thus, the results of this study indicate that soluble product from PVL-derived keratinocytes are capable of differently modulating the immune response of this DPMO in relation to OL, and this modulation is accompanied by the gain of advantages that favor the tumorigenesis process.

Keywords: Leukoplakia. Immune System. Mouth Neoplasms. Cell Culture Techniques.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PROPOSIÇÃO	18
	2.1. Objetivo Geral	18
	2.2. Objetivos Específicos	18
3	PUBLICAÇÕES	19
	3.1 Publicação 1	19
	3.2 Publicação 2	36
	3.3 Publicação 2	54
4	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A – COMPROVANTE DO CEP	76

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC), também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral¹. Apesar dos recentes avanços no entendimento e nos protocolos de tratamento em diferentes tipos de tumores malignos, a taxa de sobrevida de 5 anos para pacientes com CEC oral permanece entre 50 e 60%^{1,2}. Portanto, prevenir e diagnosticar a doença nos estágios iniciais, é indispensável para um melhor prognóstico. Partindo deste princípio, um melhor entendimento das desordens potencialmente malignas da mucosa oral (DPMOs) representa uma estratégia interessante para elucidar mecanismos moleculares relacionados com a carcinogênese oral. As DPMOs são apresentações clínicas que possuem maior potencial para se transformar em uma neoplasia maligna, quando comparadas com a mucosa clinicamente normal. Neste contexto, são consideradas como as principais DPMOs a leucoplasia, eritroplasias, líquen plano, queilite actínica; além de outras como a fibrose submucosa, xeroderma pigmentoso e anemia de Fanconi^{3,4}.

A leucoplasia oral (LO) é a principal entre as DPMOs, com uma taxa de incidência igual a 3,4% e taxa de transformação maligna que varia de 0,2% até 17,5%^{4,5}. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a LO é definida como "uma placa branca de risco questionável definida após a exclusão de outras doenças ou distúrbios conhecidos que mimetizam este aspecto, mas que não carregam nenhum risco conhecido para o câncer"⁶. Portanto, LO é considerado atualmente um termo clínico usado temporariamente como hipótese diagnóstica que implica na exclusão de outras lesões de aspecto similar. A LO é mais frequente entre homens caucasianos acima de 40 anos, e sua prevalência aumenta com o avanço da idade⁷. A etiopatogenia da LO abrange duas grandes categorias, incluindo: LO de etiologia desconhecida ou idiopática e LO associada ao uso do tabaco⁸. As LOs podem exibir características clínicas similares entre si, mas apresentam um considerável grau de heterogeneidade microscópica. Segundo a OMS (2005), a OL pode se apresentar microscopicamente com aspectos que variam de uma hiperqueratose sem ou com variados graus de displasia (leve, moderada ou severa) até um carcinoma in situ; sendo assim, a realização de uma biópsia é mandatória para o estabelecimento do diagnóstico definitivo. Atualmente estes achados microscópicos são utilizados para prever o risco de transformação maligna deste grupo de lesões. No entanto, não há métodos objetivos ainda disponíveis para tipificar lesões displásicas e permitir resultados consistentes e reprodutíveis, uma vez que nem todas as lesões orais com displasia progridem

para uma neoplasia maligna⁹. Além disto, a utilidade desta subdivisão de displasia tem sido questionada devido à grande variabilidade inter e intra observador no que diz respeito a avaliação de presença/ausência e grau de displasia¹⁰. A maioria das OLs convencionais permanecem benignas ao longo do tempo, caracterizando-se por acantose ou hiperqueratose com um pequeno grupo de lesões progredindo para displasias de alto grau ou carcinoma francamente invasivo^{3,4}. Assim, um dos maiores desafios entre os casos de OLs é o dilema de tentar prever quais lesões irão de fato progredir para uma neoplasia maligna, em particular o CEC oral.

Interessantemente, existe uma variante menos conhecida entre as leucoplasias que apresenta um comportamento único de persistente progressão para malignidade, conhecida como leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP). O termo LVP foi definido pela primeira vez por Hansen e colaboradores em 1985, que descreveram uma desordem agressiva de etiologia desconhecida e tendência a se tornar multifocal ao longo do tempo¹¹. A LVP é caracterizada por placas brancas difusas e múltiplas, com prevalência quatro vezes maior no gênero feminino, sendo frequentemente diagnosticada a partir da sexta década de vida em indivíduos usualmente não fumantes e apresentando alta taxa de recorrência e malignização, a qual pode variar de 40 a 70%^{12,13}. Devemos destacar que o perfil epidemiológico da OL convencional se aproxima do observado no CEC oral, sendo associado ao uso do tabaco e apresentando maior incidência entre os homens. Em contrapartida na LVP isso parece não ocorrer, demonstrando um possível padrão biológico distinto entre LO e LVP. Esta apresentação clínica distinta associada ao comportamento biológico agressivo permitem que a LVP seja classificada como uma entidade distinta da LO convencional, sendo descrita pela OMS como a DPMO com maior risco de progressão para o CEC oral. Contudo, o diagnóstico definitivo da LVP deve ser realizado de forma retrospectiva com base na observação temporal das lesões, devido a inexistência de características clínicas e microscópicas específicas da doença nas fases iniciais. Assim, um particular desafio tem sido encontrado para realizar um diagnóstico diferencial e precoce entre os casos de LO convencional e LVP.

Ainda, a classificação proposta pela OMS enfatiza os critérios microscópicos para definir o estágio clínico das DPMOs, no entanto, pouca importância tem sido dada à caracterização das células do sistema imune nestas desordens⁶. Neste contexto, a utilização de técnicas de biologia molecular em estudos com LO e LVP poderiam melhorar acentuadamente a detecção de alterações que são invisíveis ao microscópio, melhorando a eficácia na identificação dos pacientes com maior risco de transformação maligna¹⁴. Assim, o

entendimento mais aprofundado da natureza molecular e do comportamento destas DPMOs é fundamental para que seja possível o desenvolvimento de potenciais ferramentas diagnósticas e prognósticas em casos de LO e LVP. Além disto, a LVP frequentemente apresenta resposta inadequada a todas as modalidades de tratamento e muitas vezes sofre recorrência. Então, o melhor entendimento dos mecanismos moleculares relacionados a LVP, incluindo os mecanismos relacionados à imunidade inata e adaptativa, podem auxiliar no desenvolvimento de medidas terapêuticas mais eficazes.

No modelo atual de oncogênese, o câncer surge a partir de uma sequência de alterações celulares resultantes de fatores intrínsecos e extrínsecos; sendo bem estabelecido e aceito que existem seis alterações fundamentais na fisiologia celular que determinam o início da oncogênese¹⁵. Segundo este conceito as células tumorais caracteristicamente fornecem seus próprios sinais de crescimento, ignoram os sinais inibidores do crescimento, evitam a morte celular (evasão da apoptose), replicam-se de forma ilimitada, sustentam a angiogênese e invadem os tecidos através da membrana basal e da parede dos capilares (invasão tecidual e metástase). Além disso, como recentemente proposto, evitar a vigilância imunológica pode ser a sétima característica do câncer^{16,17}. Este conceito mostrou que apesar das evidências a favor do papel fundamental do sistema imunológico no combate à formação do câncer (“imunovigilância”), as células e fatores que compõem este sistema podem agir selecionando ou editando os tumores emergentes¹⁸. Neste contexto, surgiu o conceito da “imunoedição” que é composto por três fases conhecidas como os três “Es” da imunoedição: (I) eliminação, (II) equilíbrio e (III) escape^{16,18}. Recentemente e baseado no conceito da imunoedição, foi reconhecido também que as células tumorais têm a interessante capacidade de utilizar a presença do infiltrado inflamatório tumoral em seu favor. Processo chamado de cooptação e subversão do sistema imunológico^{19,20}.

O conceito de imunovigilância tumoral presume que o sistema imunológico pode reconhecer precursores de câncer e, na maioria dos casos, destruir esses precursores antes de se tornarem clinicamente aparentes. Se a imunovigilância tem um papel importante na supressão de tumores, então seria de esperar que pacientes com lesões potencialmente malignas apresentassem respostas imunológicas vigorosas. Há, de fato, várias linhas de evidência que indicam que este pode ser o caso. Por exemplo, pacientes com gamopatia monoclonal, que é uma lesão potencialmente maligna, mostram uma vigorosa resposta inflamatória mediada por linfócitos T (LT) contra linfócitos B (LB) pré-malignas autólogas, enquanto tais respostas não

são encontradas em pacientes com mieloma múltiplo, que é uma condição maligna²¹. Contudo, outros estudos têm demonstrado que a resposta imune associada ao tumor não é exclusivamente antitumoral e a evasão da resposta imune adaptativa pelos tumores pode ocorrer por meio de dois possíveis mecanismos: 1) depleção de células T, inibindo a detecção de células tumorais; e 2) indução de imunotolerância²²⁻²⁵. Em suporte ao primeiro mecanismo, o aumento da produção de Fas ligante por células tumorais pode induzir apoptose de células da resposta imune²⁶ e, de fato, linfócitos T expostos a lesões de HNSCC metastáticas são mais susceptíveis à apoptose²⁷. Contudo, a falta de eficiência de abordagens terapêuticas de CECs de cabeça e pescoço em modelos pré-clínicos utilizando a estimulação da resposta imune por citocinas e da transferência (transplante) de células T citotóxicas juntamente com as evidências que demonstram que as células T presentes no microambiente tumoral se tornam suprimidas ou inativadas sugerem a possibilidade do segundo mecanismo (imunotolerância) também estar envolvido^{28,29}. Diante do exposto, um estudo detalhado da resposta imune nas DPMOs, pode contribuir para elucidação de tais eventos na fase inicial da oncogênese.

Os estudos que avaliam a participação da imunidade inata e adaptativa em DPMOs são escassos e não incluem amostras de LVP. Um estudo preliminar realizado por Bondad-Palmario (1995) avaliou superficialmente o fenótipo e a distribuição de células da imunidade em amostras de LO, revelando que a diminuição da razão entre linfócitos T auxiliares/citotóxicos (CD4/CD8), aumento das células natural killer (NK) CD57+ e expressão do receptor HLA-DR por queratinócitos ocorreram simultaneamente em casos de OL com displasia severa³⁰. Posteriormente, Gannot e colaboradores (2002) mostraram que a intensidade de células inflamatórias é maior em LOs com displasia moderada e severa (170 ± 27 e 176 ± 30 células por $0,04\text{mm}^2$, respectivamente) quando comparadas com LO sem ou com grau leve de displasia (102 ± 15 e 82 ± 24 células por $0,04\text{mm}^2$, respectivamente). A caracterização superficial desta população de células inflamatórias, mostrou que linfócitos B foram significativamente mais proeminentes em casos de LO com displasia moderada e severa³¹.

Outro estudo mostrou que células de Langerhans (CLs) e LTCD8+ são mais abundantes em OLs com displasia em comparação com LOs sem células displásicas³². Em CECs orais o número de CLs e LT são aumentados em comparação com os casos de LOs³². Estes resultados suportam os resultados apresentados por Syafriadi e colaboradores (2005), que encontraram uma correlação significativa entre o número aumentado de células LTCD8+ e o grau de severidade da displasia³³. Deve-se destacar que moléculas CD8 não são expressas

exclusivamente em LT, uma vez que células NK e células dendríticas (CD) plasmocitóides expressam moléculas CD8 α ^{34,35}. Consequentemente, é possível que algumas das células CD8+ registradas nestes estudos possam ser em parte células NK ou CD plasmocitóides. Posteriormente, um estudo realizado por Öhman e colaboradores (2015) revelou que pacientes com LO que evoluíram para CEC oral apresentavam uma redução significativa no número de LTCD3+ em comparação com os casos que não desenvolveram um CEC³⁶. Estes estudos suportam a hipótese da imunovigilância, mas uma caracterização detalhada dos subtipos de LT se faz necessária para uma exploração adequada desta hipótese.

Um estudo recente investigou o padrão de expressão do genes da IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e COX-2 em casos de LOs, sugerindo que estes fatores da inflamação aparentemente não contribuem para a progressão destas lesões³⁷. Segundo os resultados deste estudo, houve apenas uma redução na expressão da citocina próinflamatória IL-1 β em amostras de LO quando comparadas ao tecido gengival normal.

Woodford e colaboradores (2014) mostraram mudanças dinâmicas na resposta imunológica de DPMOs, revelando um aumento proeminente da IL-17 nestas lesões e redução desta mesma citocina em CECs³⁸. O estudo demonstrou ainda que um declínio na produção de IL-23 e o aumento na produção TGF- β por células de CEC são os prováveis contribuintes na polarização de Th17 para Treg no ambiente tumoral. Contudo, nenhuma diferença na produção de IL-2, IL-6 e IFN- γ foi observada nos grupos estudados³⁸. Resultados semelhantes foram observados em um estudo que mostrou uma redução gradual na expressão sorológica de IL-17 de pacientes saudáveis, pacientes com LO para casos de CEC oral³⁹. Em contraste, a concentração de TNF- α , IL-6 e IL-8 no soro e saliva de pacientes com LO foi apontada como significativamente aumentada em relação ao grupo de pacientes saudáveis⁴⁰.

Outro estudo recente, avaliou a relação entre o perfil de LT e a polarização de macrófagos (M1/M2) em amostras de LO e encontraram uma correlação positiva entre o número de LTCD4+ e macrófagos CD163+. Curiosamente, os LTCD4+ revelaram um perfil Th1 (CXCR3+ e CCR5+), principal subtipo celular produtor de IFN, enquanto o fenótipo Th2 foi escasso nestas lesões. Estes resultados demonstram que embora o CD163 tenha sido considerado um marcador de macrófagos M2 em muitos tumores sólidos, os macrófagos CD163+ nas LOs parecem possuir um fenótipo M1 caracterizado pela expressão de produtos gênicos induzidos por IFN^{41,42}. Como revelado pela dupla marcação que demonstrou que os macrófagos CD163+ coexpressavam STAT1 ativo (pSTAT1).

A maioria dos estudos indica que DPMOs provavelmente representam um estado de equilíbrio entre ativação do sistema imune e a proliferação de células displásicas, como originalmente sugerido por Dunn^{16,18}. Contudo, um estudo molecular mais profundo sobre as células imunes e citocinas relacionadas com LO e LVP representa uma estratégia de pesquisa interessante para a elucidação da etiologia destas DPMOs. Assim, os resultados deste estudo podem indicar potenciais novas ferramentas para prever de forma mais confiável quais as lesões que sofrerão transformação maligna.

4 CONCLUSÃO

Por meio desse trabalho chegamos então as seguintes conclusões:

A presença de infiltrado inflamatório moderado/intenso, displasia de alto risco, altas taxas de recidivas e taxas elevadas de transformação maligna são fortemente correlacionadas com o diagnóstico de LVP;

Redução de CD de Langerhans, maduras e plasmocitóides nos compartimentos epitelial e subepiteliais na LO e LVP em relação ao controle, sugere uma apresentação inadequada de antígenos pré-tumorais pelas CDs;

Aumento de CD imaturas nos compartimentos epitelial e subepiteliais na LO e LVP em relação ao controle, pode favorecer a tolerância imunológica em relação às células pré-tumorais;

Redução global de células T e a atividade citotóxica das células T é reduzida em LO e LVP;

O processo de carcinogênese na LVP passa pela ativação da via NF- κ B e provavelmente esta via é ativada por altos níveis de TNF- α ;

O perfil de citocinas e quimiocinas observado em lesões leucoplásicas de LVP provavelmente favorecem a ativação dos Tregs quando comparados a LO;

Os fatores solúveis produzidos por queratinócitos de LVP são capazes de inibir a apoptose de PBMCs em um modelo in vitro;

Fatores solúveis produzidos por queratinócitos de LVP são capazes de inibir a ativação de células Th17 em um modelo in vitro, provavelmente promovendo uma resposta imune mediada por Treg.

REFERÊNCIAS*

1. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009; 15(6): 388-99.
2. Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(6): 1270-5.
3. 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.
4. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010; 46(6): 423-5.
5. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003; 39(8):770-80.
6. Takta T, Slootweg PJ. Tumours of the oral cavity and mobile tongue. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. *World health organization classification of head and neck tumours.* 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017. p. 109-111.
7. Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent.* 2010; 2010: 186018.
8. Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco- related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25(2): 49-54.
9. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006; 42: 987-93.
10. Warnakulasuriya KA, Tavassoli M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1998; 27: 376-81.
11. Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60(3): 285-98.
12. Bagan J, Scully C, Jimenez Y, Martorell M. Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. *Oral Dis.* 2010; 16(4): 328-32.
13. Gouvea AF, Moreira AE, Reis RR, de Almeida OP, Lopes MA. Proliferative verrucous leukoplakia, squamous cell carcinoma and axillary metastasis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15(5) :e704-8.
14. Joseph BK. Oral cancer: prevention and detection. *Med Princ Pract.* 2002; 11(1): 32-5.
15. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1): 57-70.

* 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>

16. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 329-60.
17. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 2006; 90: 1-50.
18. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004; 21(2): 137-48.
19. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420(6917): 860-7.
20. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(10): 715-27.
21. Dhodapkar MV, Krasovsky J, Osman K, Geller MD. Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med.* 2003; 198(11): 1753-7.
22. Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJ Jr, Costa MR, Damante JH et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59(6): 819-28.
23. Bluth MJ, Zaba LC, Moussai D, Suárez-Fariñas M, Kaporis H, Fan L et al. Myeloid dendritic cells from human cutaneous squamous cell carcinoma are poor stimulators of T-cell proliferation. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(10): 2451-62.
24. Muller AJ, Sharma MD, Chandler PR, Duhadaway JB, Everhart ME, Johnson BA 3rd et al. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(44): 17073-8.
25. O'Donnell RK, Mick R, Feldman M, Hino S, Wang Y, Brose MS et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. *Cancer Lett.* 2007; 255(1): 145-52.
26. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res.* 2006; 66: 5527-36.
27. Ku TK, Nguyen DC, Karaman M, Gill P, Hacia JG, Crowe DL. Loss of p53 expression correlates with metastatic phenotype and transcriptional profile in a new mouse model of head and neck cancer. *Mol Cancer Res.* 2007; 5: 351-62.
28. Whiteside TL, Chikamatsu K, Nagashima S, Okada K. Antitumor effects of cytolytic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells in head and neck cancer. *Anticancer Res.* 1996; 16: 2357-64.
29. Whiteside TL, Letessier E, Hirabayashi H, Vitolo D, Bryant J, Barnes L et al. Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin 2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 1993; 53: 5654-62.
30. Bondad-Palmario GG. Histological and immunochemical studies of oral leukoplakia: phenotype and distribution of immunocompetent cells. *J Philipp Dent Assoc.* 1995; 47(1): 3-18.

31. Gannot G, Gannot I, Vered H, Buchner A, Keisari Y. Increase in immune cell infiltration with progression of oral epithelium from hyperkeratosis to dysplasia and carcinoma. *Br J Cancer*. 2002; 86(9): 1444–8.
32. Öhman J, Magnusson B, Telemo E, Jontell M, Hasséus B. Langerhans cells and T cells sense cell dysplasia in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas--evidence for immunosurveillance. *Scand J Immunol*. 2012; 76(1): 39-48.
33. Syafriadi M, Cheng J, Jen KY, Ida-Yonemochi H, Suzuki M, Saku T. Two-phase appearance of oral epithelial dysplasia resulting from focal proliferation of parabasal cells and apoptosis of prickly cells. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34(3): 140-9.
34. Zancoppe E, Costa NL, Junqueira-Kipnis AP, Valadares MC, Silva TA, Leles CR et al. Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39(2): 162-7.
35. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1183: 89-103.
36. Öhman J, Mowjood R, Larsson L, Kovacs A, Magnusson B, Kjeller G et al. Presence of CD3-positive T-cells in oral premalignant leukoplakia indicates prevention of cancer transformation. *Anticancer Res*. 2015; 35(1): 311-7.
37. Wenghoefer M, Pantelis A, Najafi T, Deschner J, Allam JP, Novak N et al. Gene expression of oncogenes, antimicrobial peptides, and cytokines in the development of oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 110(3): 351-6.
38. Woodford D, Johnson SD, De Costa AM, Young MR. An Inflammatory Cytokine Milieu is Prominent in Premalignant Oral Lesions, but Subsides when Lesions Progress to Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Cell Immunol*. 2014; 5(3): 230.
39. Ding L, Hu EL, Xu YJ, Huang XF, Zhang DY, Li B et al. Serum IL-17F combined with VEGF as potential diagnostic biomarkers for oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2015; 36(4): 2523-9.
40. Kaur J, Jacobs R. Proinflammatory cytokine levels in oral lichen planus, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2015; 41(4): 171-5.
41. van Dongen M, Savage ND, Jordanova ES, Briaire-de Bruijn IH, Walburg KV, Ottenhoff TH et al. Anti-inflammatory M2 type macrophages characterize metastasized and tyrosine kinase inhibitor-treated gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer*. 2010; 127(4): 899-909.
42. Zhang B, Yao G, Zhang Y, Gao J, Yang B, Rao Z et al. M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics*. 2011; 66(11): 1879-86.