



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Ana Carolina Amorim Pellicoli

**EXPRESSÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E CÉLULAS T EM  
LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA  
ESPINOCELULAR DE BOCA**

**EXPRESSION OF DENDRITIC AND T CELLS IN POTENTIALLY MALIGNANT  
LESIONS AND ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

Piracicaba

2016

Ana Carolina Amorim Pellicoli

**EXPRESSÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E CÉLULAS T EM LESÕES  
POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA**

**EXPRESSION OF DENDRITIC AND T CELLS IN POTENTIALLY MALIGNANT  
LESIONS AND ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Estomatopatologia, na Área de Patologia.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Pathology, in the Pathology area.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Co-orientador: Dra. Lynne Bingle

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA CAROLINA AMORIM PELLICOLI E ORIENTADA PELO PROF. DR. PABLO AGUSTIN VARGAS.

Piracicaba  
2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2013/18321-8; CAPES, PDSE 99999.008317/2014-03

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

P365e Pellicoli, Ana Carolina Amorim, 1986-  
Expressão de células dendríticas e células T em lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular de boca / Ana Carolina Amorim Pellicoli. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Pablo Agustin Vargas.  
Coorientador: Lynne Bingle.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Sistema imunológico. 2. Células dendríticas. 3. Carcinoma de células escamosas.. I. Vargas, Pablo Agustin,1973-. II. Bingle, Lynne. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Expression of dendritic and T cells in potentially malignant lesions and oral squamous cell carcinoma

**Palavras-chave em inglês:**

Immune system

Dendritic cells

Carcinoma, squamous cell

**Área de concentração:** Patologia

**Titulação:** Doutora em Estomatopatologia

**Banca examinadora:**

Pablo Agustin Vargas [Orientador]

Fernanda Visioli

Fábio de Abreu Alves

Manoela Domingues Martins

Alan Roger dos Santos Silva

**Data de defesa:** 19-09-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Estomatopatologia



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 19 de Setembro de 2016, considerou a candidata ANA CAROLINA AMORIM PELLICOLI aprovada.

PROF. DR. PABLO AGUSTIN VARGAS

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. FERNANDA VISIOLI

PROF. DR. FÁBIO DE ABREU ALVES

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MANOELA DOMINGUES MARTINS

PROF. DR. ALAN ROGER DOS SANTOS SILVA

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese à minha mãe Lilian, minha irmã Maria Fernanda, minhas Alices e meu marido Charles.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

*Nelson Mandela*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelas bênçãos diárias, por me manter forte e me fazer companhia em todos os momentos.

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques e seu Diretor Associado, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto.

À Prof Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Aos Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva (2012-2016) e Prof. Titular Dr. Márcio Ajudarte Lopes (2016-atual).

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa (em momentos distintos) para a realização dessa tese de Doutorado. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa para o Programa de Doutorado Sanduiche (PDSE).

Ao meu orientador, Prof. Titular Dr. Pablo Agustin Vargas por me receber como sua orientada, pelas oportunidades oferecidas, por todos os ensinamentos e incentivo ao longo do curso e por respeitar as minhas decisões acadêmicas.

Aos Profs. Drs. das Áreas de Semiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba: Alan Roger dos Santos Silva, Edgard Graner, Jacks Jorge, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, e Ricardo Della Coletta por me receberem com gentileza e respeito e por todos os ensinamentos e momentos de discussão durante as disciplinas do currículo. Aos apoios técnicos, Adriano, Emílio, Fabiana, Geovania, Joãozinho e Luana pelos auxílios e ensinamentos junto ao laboratório e secretaria.

Aos professores, funcionários e alunos do Orocentro Profs. Drs. Alan Roger dos Santos Silva e Márcio Ajudarte Lopes, Dr. Rogério de Andrade Elias, Dra. Érika Graf Pedroso, Danile Gabriele Castelli Morelli e Aparecida Campion e à equipe da Rotina de Histopatologia Profs. Drs. Pablo Agustin Vargas e Oslei Paes de Almeida, alunos e técnicos por me ensinarem a importância de trabalhar em equipe, pelo exemplo de dedicação e respeito aos pacientes, pela oportunidade de vivenciar e estudar os casos, pela generosidade em ensinar.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, local onde iniciei minha jornada acadêmica. Aos professores, funcionários e alunos do Laboratório de Patologia Bucal. À Profª. Dra. Manoela Domingues Martins pelas colaborações nesta tese, por todo o incentivo, auxílio e amizade.

À Universidade de Sheffield (Inglaterra), em especial aos Profs. Paul Michael Speight e Paula Farthing, à Dra. Lynne Bingle e demais professores, funcionários e alunos da Faculdade de Odontologia Clínica por gentilmente me receberem pelo período de 12 meses durante o programa de doutorado sanduíche no exterior. Pelos ensinamentos, oportunidades e por todo suporte ao longo do estágio. Esse período foi de muito crescimento acadêmico e pessoal.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, na pessoa do Dr. Marcelo Corrêa Alves pelo trabalho prestado junto as análises estatísticas dessa tese.

Aos amigos Débora Lima Pereira, Renata Lucena Markman, Karina Morais Faria, Ana Camila Pereira Messetti e Wagner Gomes da Silva pelo companheirismo, carinho e amizade. Vocês são amigos muito especiais, tivemos afinidade desde o princípio, compartilhamos muitos momentos, torcemos uns pelos outros, nos apoiamos nas dificuldades, vibramos com as conquistas de cada um. Vocês representam uma das melhores partes deste doutorado e tudo que vocês fizeram por mim desde que nos conhecemos está guardado com muito carinho em meu coração.

Às demais amigas do Sinto Muito, Camilla Borges, Luciana Yamamoto e Marisol Martínez pelo apoio, amizade e pelos momentos de descontração.



Aos demais amigos e colegas de pós graduação que foram sempre tão generosos no compartilhamento dos conhecimentos, pelos momentos de discussões científicas e não científicas.

À minha família meu maior exemplo de amor, respeito, carinho e bons valores. Pela segurança e apoio que me passam em saber que não importa o quão longe eu vá sempre terei um local para retornar. À minha mãe meu maior exemplo de determinação e força, meu porto seguro. Tenho por você uma admiração imensurável, um amor infinito e uma gratidão eterna. À minha irmã minha melhor amiga, minha fã número um, a pessoa com quem posso contar a qualquer hora. Às minhas Alices que enchem minha vida do amor mais puro, de muita alegria e muita bagunça. Ao meu marido, meu amor, meu amigo, meu companheiro, dono de um coração enorme. Obrigada por todo o apoio, por aceitar e viver junto comigo as minhas decisões acadêmicas. Você foi um dos melhores presentes que a vida me deu. Aos meus sogros pelo apoio e compreensão.

## **RESUMO**

O carcinoma espinocelular de boca usualmente se desenvolve a partir de uma lesão oral potencialmente maligna, como por exemplo, a leucoplasia ou eritroleucoplasia. O sistema imune, por sua vez, desempenha importante papel no reconhecimento de células malignas precursoras. No entanto, as células tumorais através do mecanismo de imunoeedição são capazes de escapar da imuno vigilância.

**Objetivo:** Avaliar a expressão de células dendríticas de Langerhans (CDL) imaturas e maduras, células dendríticas plasmocitoides (CD plasmocitoides) e linfócitos T em displasia epitelial oral (DE), leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e carcinoma espinocelular bucal (CEC) e correlacionar essa expressão com os dados clínicos disponíveis.

**Material e métodos:** Cinquenta casos de CEC, 48 casos de DE e 15 casos de LVP foram submetidos a técnica imunoistoquímica para os anticorpos CD1a, CD83, CD303 e CD8. Os resultados dessas imunomarcações foram avaliados através da análise quantitativa de cinco campos consecutivos de cada lâmina utilizando um aumento de 400x.

**Resultados:** A análise mostrou diminuição significativa da expressão de CD83 no grupo CEC em comparação ao grupo DE. CD303 mostrou aumento significativo no grupo CEC em comparação ao grupo DE. A expressão de CD8 não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados. Para o grupo LVP a expressão de CD1a e CD8 apresentou aumento gradual nas lesões de hiperqueratose, displasia leve/moderada e displasia epitelial intensa. A expressão de CD83 apresentou diminuição gradual nas lesões de hiperqueratose, displasia leve/moderada e displasia epitelial intensa. Não houve correlação estatística com os dados clínicos.

**Conclusão:** O aumento no número de CDL maduras no grupo DE em relação ao grupo CEC sugere que essas células possam ter migrado até os linfonodos para dar início a resposta imune. O aumento no número de CD plasmocitoides no grupo CEC, sugere que essas células desempenham papel importante na defesa do organismo contra lesões tumorais, no entanto não está claro se promovendo ou inibindo a progressão tumoral. No grupo LVP a expressão de CDL imaturas e linfócitos T CD8 sugere que o sistema imune encontra-se vigilante e ativo, respectivamente. No entanto, a expressão de CDL maduras sugere que pode haver algum tipo de falha na resposta imune.

**Palavras-chave:** sistema imunológico, células dendríticas, células dendríticas plasmocitoides, carcinoma de células escamosas, leucoplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa, displasia epitelial.

## **ABSTRACT**

Oral squamous cell carcinomas (OSCC) may arise from potential malignant lesions, such as leukoplakia. The immune system plays an important role recognizing tumor precursor cells. However, due to the immunoeediting mechanisms cancer cells are able to escape the immune system surveillance.

**Objective:** Evaluate the profile of imature and mature dendritic Langerhans cells (DLC), plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid DC) and T cells in epithelial displasya (OED), proliferative verrucous leukoplakia (PVL) and OSCC and correlate these findings with clinical data available.

**Study design:** Fifty cases of OSCC, 48 of OED and 15 of PVL were immunostained for CD1a, CD83, CD303 and CD8 followed by a quantitative analysis.

**Results:** Analysis revealed a significant decrease in the number of CD83 positive cells in OSCC compared with OED group. CD303 positivity was significantly increased in the OSCC group when compared to OED whilst there was no statistical difference in CD8 positivity between OSCC and OED. In the PVL group analysis revealed increased expression of CD1a from hyperkeratosis to severe epithelial dysplasia and decreased expression of CD83 from hyperkeratosis to severe epithelial dysplasia. The expression of CD8 increased from hyperkeratosis to severe epithelial dysplasia. No statisticant correlation was found for clinical data.

**Conclusion:** The numbers of mature DLC were decreased in OSCC compared with OED lesions suggesting that maybe these cells might have migrated to lymph nodes to present the tumour antigen and activate the immune system. The numbers of plasmacytoid DC was significantly increased in the OSCC group compared with the OED group. This suggests they may play an important role in the defence against tumours although it is not clear whether this is promoting or inhibiting malignant progression. In the PVL group, the expression of immature DLC and CD8 T cells suggest that the immune system is vigilant and active, respectively, however the expression of mature DLC suggest that in some extent it is impaired.

**Key words:** immune system, dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, squamous cell carcinoma, leukoplakia, epithelial dysplasia, proliferative verrucous leukoplakia

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
1.1 LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS .....	14
1.1.1 LEUCOPLASIA .....	14
1.1.2 LEUCOPLASIA VERRUCOSA PROLIFERATIVA .....	17
1.2 CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL .....	19
1.3 SISTEMA IMUNE, CÉLULAS DENDRÍTICAS E ONCOGÊNESE .....	21
2 ARTIGOS .....	32
2.1 Artigo: Expression of dendritic, langerhans and T cells in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. ....	33
2.2 Artigo: Expression of dendritic cells and T cells in oral proliferative verrucous leukoplakia .....	51
3 DISCUSSÃO .....	60
4 CONCLUSÃO .....	64
REFERENCIAS .....	65
ANEXOS .....	80
Anexo 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa .....	80
Anexo 2 - Confirmação de submissão do artigo científico .....	81

## INTRODUÇÃO

### 1.1 LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS

Em 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reclassificou uma série de lesões da mucosa oral e orofaríngea que apresentavam risco de transformação maligna e convencionou chamá-las de lesões potencialmente malignas (LPM) (Waal, 2009). Dentre as lesões que apresentam risco de malignização é possível citar a leucoplasia, eritroplasia, liquen plano oral, fibrose submucosa oral, queilite actínica, lúpus eritematoso, epidermólise bolhosa e disceratose congênita (Warnakulasuriya et al, 2007).

Uma lesão pode ser considerada como potencialmente maligna quando apresentar alterações morfológicas teciduais que favoreçam o desenvolvimento de um câncer em comparação a sua contraparte normal. Da mesma forma, existem alterações sistêmicas que estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Ambos os casos são ditos LPM (Nair et al, 2012).

Nesta tese iremos abordar duas alterações que se classificam como LPM: a leucoplasia oral e a leucoplasia verrucosa proliferativa.

#### 1.1.1 LEUCOPLASIA

De acordo com a OMS o termo leucoplasia deve ser utilizado para descrever uma lesão da mucosa oral caracterizada como uma mancha ou placa branca que não pode ser diagnosticada clinicamente como nenhuma outra patologia (Kramer et al, 1978). O termo leucoplasia é exclusivamente clínico não devendo ser usado para designar um diagnóstico histopatológico (Neville & Day, 2002).

Leucoplasias ocorrem principalmente em indivíduos do gênero masculino com idade superior a 30 anos e os sítios mais acometidos são mucosa jugal, mucosa alveolar e lábio inferior (Neville & Day, 2002). Além disso, tais lesões são seis vezes mais frequentes em paciente fumantes do que não-fumantes (Maserejian et al, 2006) e sua prevalência mundial é de 2,6% (Petti, 2003), podendo variar em algumas regiões. É considerada uma das LPM com maior risco de transformação maligna (1%, ou seja, 20/100.000 habitantes por ano) (Waal & Reichart, 2008; Liu et al, 2012).

Clinicamente as leucoplasias podem ser classificadas em dois tipos: homogênea e não-homogênea. Lesões homogêneas apresentam superfície lisa, uniforme e coloração exclusivamente branca. Já as lesões não-homogêneas apresentam superfície irregular ou verrucosa e coloração mista (mesclando áreas brancas e áreas vermelhas) (Waal & Reichart, 2008).

Histologicamente essas lesões classificam-se em displásicas ou não-displásicas. Acredita-se que as lesões displásicas são as que apresentam maior potencial de transformação maligna, o qual está intimamente relacionado ao grau de severidade das lesões, no entanto essa questão permanece controversa (Liu et al, 2012). O grau de severidade das displasias compreende uma série de alterações arquiteturais na morfologia do epitélio, bem como atipias celulares (Waal & Reichart, 2008). Existem várias classificações para graduar as displasias. De acordo com a classificação da OMS de 2005 existem cinco estágios para a graduação das lesões displásicas (Barnes et al, 2005):

- Hiperplasia escamosa: caracterizada pela acantose do epitélio ou duplicação da camada basal.
- Displasia epitelial leve: as alterações epiteliais estão restritas ao terço inferior da camada epitelial.
- Displasia epitelial moderada: as alterações epiteliais estão restritas ao terço inferior e médio da camada epitelial.
- Displasia epitelial severa: as alterações epiteliais envolvem mais de dois terços da camada epitelial.
- Carcinoma *in situ*: toda a espessura do epitélio está alterada e apresentando pronunciada atipia celular.

Essa classificação preconizada pela OMS, apesar de amplamente utilizada apresenta falhas como variabilidade inter e intra examinadores e baixa reprodutibilidade (Tilakaratne et al, 2011; Fleskens et al, 2011). Na tentativa de minimizar essas falhas, outras classificações foram propostas. Smith & Pindborg (1969) desenvolveram um sistema baseado em treze características histológicas a serem analisadas e pontuadas, ao final é gerado um escore que classifica as lesões em não displásicas, com displasia epitelial leve, moderada ou severa. Esse método não foi bem aceito pela sua subjetividade e tempo para categorização de

cada lesão (Warnakulasuriya et al, 2007). Banoczy & Csiba (1976) avaliaram 500 casos de leucoplasia baseados em nove critérios e a partir desses critérios as lesões foram classificadas em displasias leves, moderadas ou severas. Kramer et al (1978) avaliaram catorze características epiteliais e se duas delas estivessem presentes a lesão seria considerada displásica. Burkhardt & Maerker (1981) listaram seis características histológicas e citológicas nas quais se baseavam para diagnosticar a lesão como displasia leve, moderada ou severa ou carcinoma *in situ* (Sharma et al, 2010). Ljubljana propôs um sistema com quatro categorias: hiperplasia simples e anormal representando alterações benignas, hiperplasia atípica representando alterações pré-malignas e carcinoma *in situ* considerado uma alteração maligna com ausência de invasão evidente (Zerdoner, 2003). Lumerman et al (1995) avaliaram 308 casos de leucoplasia baseado em onze critérios, a partir desses critérios as lesões foram classificadas em displasias leves, moderadas ou severas, carcinoma *in situ* ou hiperplasia verrucosa com displasia. Speight considerou a espessura do epitélio para graduar as lesões (Speight, 2007). Kuffer & Lombardi (2002) propuseram uma classificação baseada no sistema ginecológico, no qual lesões sem displasia seriam classificadas como lesão de risco e lesões displásicas como lesões precursoras de carcinoma espinocelular (CEC).

Kujan et al (2006) propuseram uma nova classificação binária complementar à classificação de 2005 da OMS. Nessa classificação as lesões displásicas são graduadas em lesões de baixo risco e alto risco de malignização. Um estudo piloto com catorze lesões que evoluíram para CEC e catorze que não evoluíram foram selecionadas e analisadas por dois patologistas levando em consideração as características arquiteturais e citológicas do epitélio. Os resultados obtidos mostraram que as lesões ditas de alto risco apresentaram quatro ou mais alterações arquiteturais e cinco ou mais alterações citológicas, já as lesões de baixo risco apresentaram menos de quatro alterações arquiteturais e menos de cinco alterações citológicas.

Speight et al (2015) propuseram uma metodologia na qual avaliaram 775 casos de casos de LPM, 4 casos de CEC e 150 casos livres de lesão. Cada caso foi avaliado por dois patologistas, caso não houvesse concordância entre ambos um terceiro patologista avaliaria o caso, se ainda assim não houvesse concordância o caso seria revisado em conjunto pelos três patologistas. Os resultados obtidos mostraram que após a análise inicial de dois patologistas 69.9% foram concordantes, após a intervenção do terceiro patologista 22.8% dos casos restantes foram concordantes e com a avaliação conjunta dos casos restantes (7.3%) os patologistas atingiram um consenso.



Manchanda & Shetty (2012) classificaram 45 casos de displasia epitelial oral (15 casos de displasia leve, 15 moderada e 15 severa) utilizando os sistemas de Smith & Pindborg, a classificação da OMS de 2005 e o sistema de Brothwell. Os resultados mostraram maior concordância inter examinador para o sistema de Brothwell e maior concordância intra examinador no sistema de Smith & Pindborg.

Zerdoner (2003) avaliou 135 biópsias utilizando o sistema de Ljubljana. 121 casos foram diagnosticados como hiperplasia simples ou anormal, 11 como hiperplasia atípica e 3 como carcinoma *in situ*. No acompanhamento clínico de 3 meses a 6 anos dois casos de hiperplasia atípica evoluíram para CEC. Portanto, os autores concluíram que esse método de classificação pode ser útil na classificação de lesões epiteliais displásicas.

### **1.1.2 LEUCOPLASIA VERRUCOSA PROLIFERATIVA**

A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é uma variante da leucoplasia não-homogênea. É uma condição rara descrita por Hansen et al (1985) no estudo em que os autores acompanharam 30 pacientes que apresentavam uma forma distinta de leucoplasia, de etiologia desconhecida e com alto risco de transformação maligna. Clinicamente a LVP se inicia pelo aparecimento de uma lesão branca de hiperqueratose, desenvolvimento lento que tende a se manifestar em outras áreas da mucosa bucal tornando-se multifocal. Com o passar do tempo áreas verrucosas, exofíticas e eritoplásicas se desenvolvem (Bagan et al, 2010). Lopes et al (2015) descreveram que lesões de LVP podem se apresentar inicialmente com aspecto liquenóide. Os autores relataram um caso clínico no qual uma paciente feminina de 64 anos de idade apresentou lesão de aspecto liquenoide na borda lingual com diagnóstico inicial de reação liquenoide por restauração de amálgama. Após a troca da restauração não houve regressão da lesão. Foi realizada uma biópsia incisional e a histopatologia mostrou displasia epitelial moderada. Essa paciente desenvolveu outras lesões de aspecto liquenoide e leucoplásico e o diagnóstico de LVP foi estabelecido. Após 15 meses de acompanhamento a lesão leucoplásica mudou de aspecto e nova biópsia incisional foi realizada com diagnóstico de CEC.

Cabay et al (2007) definiram a LVP como uma forma de leucoplasia distinta, que por sua vez é definida pela sua evolução clínica progressiva, alterações das suas características clínicas e histopatológicas e alto potencial de transformação maligna. Além

disso, a LVP pode acometer qualquer sítio da cavidade bucal, apresenta predileção por mulheres acima de 60 anos, forte tendência à recorrência após tratamento e geralmente não está associada ao uso de tabaco e álcool (Gouvêa et al, 2010; Carrard et al, 2013; Gouvêa et al, 2013).

Cerero-Lapiedra et al (2010) definiram uma série de critérios para o diagnóstico de LVP os quais foram divididos em maiores e menores. Os maiores são acometimento de mais de dois sítios; presença de pelo menos uma área verrucosa; as lesões devem mudar de aspecto com o tempo; recorrência de lesão em sítio previamente tratado; histopatologicamente apresentar hiperqueratose, displasia epitelial, hiperplasia verrucosa, carcinoma verrucoso ou CEC *in situ* ou infiltrativo. Os critérios menores são área total somando todas as leucoplasias igual ou maior a 3 cm; indivíduo feminino; indivíduo não fumante; tempo de evolução da doença de mais de 5 anos. Para confirmar o diagnóstico de LVP deve haver a combinação de dois ou três critérios maiores associados a dois critérios menores.

Diversos estudos têm mostrado que a LVP apresenta maior risco de transformação maligna. Abadie et al (2016) em uma revisão sistemática de 26 artigos científicos, contendo 329 pacientes com LVP, encontraram uma taxa de transformação maligna de 63.9%. Owosho et al (2015) descreveram 7 casos de LVP com transformação maligna de 28%. Bagan et al (2016) quantificaram os níveis de interleucina-6 (IL-6) em amostras de saliva de 20 indivíduos com LVP, 20 com CEC e 20 controles. Os resultados mostraram maior nível de IL-6 no grupo CEC quando comparado ao controle. No grupo LVP os níveis foram menores que no CEC, porém maiores que no controle. Os autores concluíram que os níveis dessa citocina podem servir para o monitoramento da progressão das lesões de LVP.

Gouvêa et al (2013) avaliaram a imunoexpressão de Mcm2, geminina e Ki-67, bem como anormalidades no material genético em 21 casos de LVP. Os resultados desse estudo mostraram correlação positiva entre a expressão de Mcm2 e o grau de intensidade das lesões displásicas. Para os marcadores geminina e ki-67 não foram encontradas correlações com o grau de intensidade das displasias. 95% dos casos nos quais foram analisadas anormalidades no DNA mostraram aneuploidia. Os autores concluíram que a expressão de Mcm2 e a ploidia de DNA podem ser ferramentas úteis para indicar áreas com maior potencial de transformação maligna.

Gouvêa et al (2010) avaliaram as características clínico-patológicas e a distribuição de marcadores da proliferação celular em 12 casos de LVP utilizando a técnica de imunohistoquímica. Dos 12 casos estudados 4 sofreram transformação maligna ao longo do tempo. Os marcadores analisados foram p53, Ki-67, Mcm2 e Mcm5. Os resultados obtidos mostraram intensa imunomarcção para todos os marcadores nos casos de CEC. Interessantemente, alguns indivíduos que apresentavam displasia moderada ou severa também apresentaram intensa imunomarcção para Mcm2 e Mcm5. Os autores concluíram que os marcadores Mcm 2 e 5 podem ser úteis na indicação de quais lesões apresentam maior risco de transformação maligna.

## 1.2 CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

De acordo com a Global Cancer Statistics foram estimados 300.400 novos casos de câncer de boca e 145.400 mortes pela doença no mundo no ano de 2012 (Torre et al, 2015). Nos Estados Unidos, segundo a American Cancer Society, foram estimados 45.780 novos casos de câncer de boca e orofaringe e 8.650 mortes pela doença no ano de 2015 (Siegel et al, 2015). Segundo a International Conference of Innovative Approaches in Head and Neck Oncology essa mesma lesão representa 4% de todas as neoplasias malignas na Europa (Stoeckli & Broglie, 2013). No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer/INCA, 15.490 novos casos de câncer de boca serão diagnosticados no ano de 2016, representando 7.3% de todas as lesões malignas. Ainda segundo o INCA o câncer de boca é a quinta lesão maligna mais frequente em homens e a décima segunda mais frequente em mulheres.

O CEC, dentre as lesões malignas, é a lesão mais frequente representando aproximadamente 90% dos casos (Chi et al, 2015). Muitas dessas lesões são precedidas por LPM (Nair et al 2012). Dentre elas podemos citar leucoplasia, eritroplasia, líquen plano oral, fibrose submucosa oral, queilite actínica, lúpus eritematoso, epidermólise bolhosa e disceratose congênita (Warnakulasuriya et al, 2007).

Lesões de CEC acometem principalmente indivíduos do sexo masculino com idade superior a 50 anos (Carvalho et al, 2004). Os sítios mais acometidos são borda lateral de língua, assoalho bucal e lábio inferior (Bagan et al, 2010). Tanto o CEC como as LPM apresentam agentes causadores intrínsecos e extrínsecos (Zygianni et al, 2011). Os fatores

de risco mais comuns para o desenvolvimento de lesões malignas são o fumo de tabaco e a ingestão de bebidas alcoólicas (Dissanayaka et al, 2012). De acordo com Gandini et al (2008) o risco de indivíduos fumantes desenvolverem um câncer bucal é três vezes maior do que indivíduos não-fumantes. O consumo crônico de bebidas alcólicas causa aumento da permeabilidade da mucosa bucal, alteração nos processos de síntese e reparo de DNA e prejudica o bom funcionamento do sistema imunológico (Reidy et al, 2011; Carrard et al, 2009). O papiloma-vírus humano (HPV) também é considerado fator de risco para o desenvolvimento de CECs que acometem a região posterior de língua, tonsilas e orofaringe; nesses casos os indivíduos comumente acometidos são jovens do sexo masculino (Gooi et al, 2016).

Clinicamente as lesões clássicas de CEC se caracterizam por uma placa branca ou avermelhada que com o passar do tempo, se não tratadas, evoluem para uma lesão ulcerada endofítica ou exofítica de bordas elevadas e endurecidas. Dor não é um sintoma comum, exceto para lesões em estágios avançados (Scully & Felix, 2006). Outra variação clínica é o carcinoma verrucoso, que representa 3% dos CECs de boca e se caracteriza por ser uma lesão de baixo grau de malignidade (Bouquot, 1998).

Histopatologicamente observa-se uma proliferação atípica das células epiteliais seguida da invasão do tecido conjuntivo formando ilhas epiteliais no tecido subjacente. Pleomorfismo celular, figuras de mitoses aberrantes e pérolas de queratina também são frequentemente observadas (Rinker et al, 2001). Diversas classificações histológicas foram propostas com o objetivo de fornecer as características biológicas e o comportamento tumoral. Broder et al (1920) sugeriram uma classificação baseada no grau de diferenciação e na queratinização das células tumorais (Doshi et al, 2011). Jakobsson et al (1973) avaliaram em sua classificação padrões morfológicos e a relação entre a lesão e o hospedeiro. Diversos autores modificaram a classificação de Jakobsson (Doshi et al, 2011), dentre eles Anneroth et al (1987) que omitiram o parâmetro invasão vascular. Bryne et al (1989) propuseram uma classificação na qual a avaliação das características morfológicas e moleculares no fronte de invasão tumoral seriam mais relevantes para o prognóstico. Em 2005 a OMS adotou a classificação de Broder (Barnes et al, 2005). Brandwein-Gensler et al (2005) desenvolveram um sistema de classificação baseado no padrão de invasão tumoral, resposta imunitária à lesão e invasão perineural. Almangush et al (2015) sugeriram uma classificação baseada na análise das ilhas tumorais e na profundidade de invasão.

Apesar dos avanços significativos nas modalidades de tratamento para esse tipo de lesão – cirurgia, quimioterapia e radioterapia – a taxa de sobrevivência em cinco anos permanece próxima aos 50% nas últimas décadas. O prognóstico ruim dessas lesões se deve a diversos fatores, dentre eles ao estadiamento clínico do tumor e a sua significativa influência no sistema imune do hospedeiro (Patel & Shah, 2005; Duray et al, 2010). O estadiamento clínico das lesões é crucial para a escolha do tratamento mais adequado a ser empregado. Ele é baseado no sistema TNM, onde T diz respeito ao tamanho da lesão, N indica a presença ou ausência de linfonodos regionais comprometidos e M se há ou não metástases à distância (Barnes et al, 2005).

### 1.3 SISTEMA IMUNE, CÉLULAS DENDRÍTICAS E ONCOGÊNESE

O sistema imunitário, responsável por combater possíveis agentes agressores que alterem a homeostase do organismo, é composto por uma grande variedade de células. As células dendríticas (CD) são oriundas da medula óssea encontradas em grande parte dos tecidos humanos (Banchereau et al, 2000; Steinman & Banchereau, 2007). Descritas por Steinman e Cohn em 1973 as CD são células apresentadoras de antígeno que apresentam número elevado de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) tipos I e II responsáveis por dar início à resposta imune mediada por linfócitos B e T (Banchereau & Steinman, 1998).

Em humanos os subtipos de CD podem ser classificadas em CD convencionais, CD plasmocitoides e CD derivadas de monócitos. As CD convencionais subclassificam-se em células migratórias ou células residentes em linfonodos. As CD migratórias localizam-se em órgãos periféricos como pulmões, pele e fígado e são capazes de migrar dos tecidos periféricos até os linfonodos. As CD residentes em linfonodos residem nesses locais e não apresentam capacidade migratória (Kushwah & Hu, 2011). As CD plasmocitoides caracterizam-se por ser um subtipo raro de CD e por apresentarem o formato semelhante a um plasmócito. Localizadas em tecidos linfoides e não-linfoides, essas células são responsáveis por produzir grandes quantidades de interferon tipo I (Lande & Gilliet, 2010). As CD derivadas de monócitos localizam-se em órgãos periféricos e são capazes de reconhecer antígenos e migrar para os linfonodos (Kushwah & Hu, 2011). Na pele e mucosas essas células recebem o nome de CD de Langerhans (CDL) (Banchereau et al, 2000). As CDL

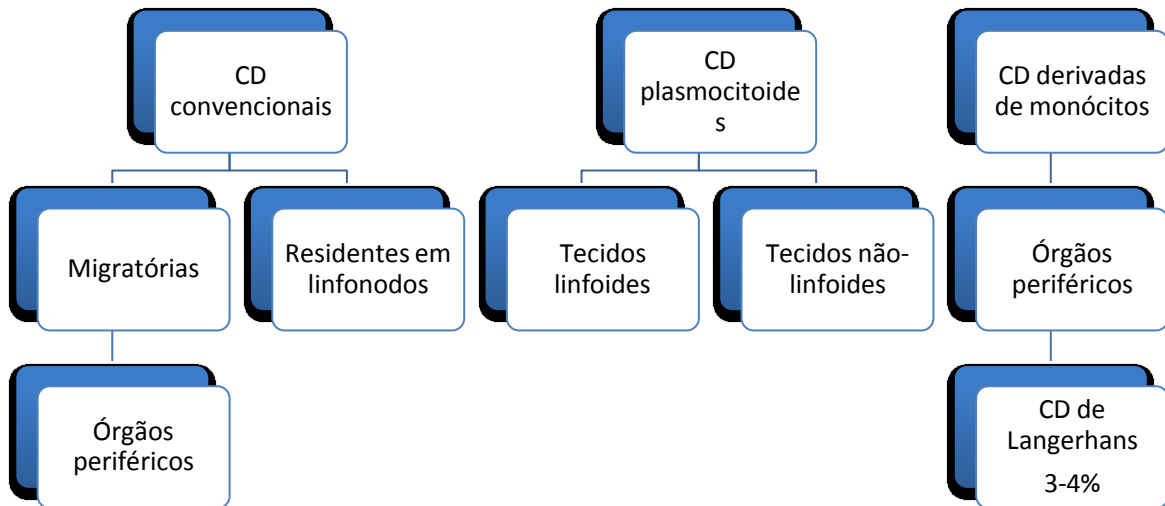
constituem uma subpopulação de 3-4% das células da epiderme que apresentam receptores para imunoglobulinas e sistema complemento (Esteban et al, 2012).

As células do sistema imune desempenham importante papel na defesa do organismo contra células tumorais e o desenvolvimento do câncer. Elas são capazes de reconhecer células malignas precursoras e destruí-las (Öhman et al, 2012). As células neoplásicas, por sua vez, apresentam diversas características que lhes conferem resistência e longevidade, dentre elas proliferação descontrolada, manutenção da angiogênese, invasão tecidual e mais recentemente foi descrita uma nova característica denominada anulação da imunovigilância (Zitvogel et al, 2006). Na anulação da imunovigilância as células neoplásicas são capazes de burlar ou até mesmo suprimir a resposta imune inata e adaptativa através de mecanismos denominados de imuno-seleção e imunoedição, respectivamente (Dunn et al, 2006). A importância do papel desses mecanismos no processo de oncogênese é bastante controverso e não está completamente elucidado, no entanto evidências de que o sistema imune desempenha papel crucial no desenvolvimento do câncer tem se tornado cada vez mais consistente (Zitvogel et al, 2006).

Diversos são os marcadores imunoistoquímicos utilizados para evidenciar a presença de CD nos diversos tecidos humanos. As CDL podem ser encontradas em dois estados distintos. No estado imaturo apresentam marcação imunoistoquímica para CD1a, CD207, grande capacidade fagocitária e número reduzido de MHC, já no estado maduro apresentam marcação imunoistoquímica para CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86, aumento do número de MHC na superfície externa da membrana celular, capacidade de estimular células T e redução da atividade fagocitária (Mellman & Steinman, 2001). Além disso, apresentam outros marcadores de membrana para os antígenos HLA-DR e proteína S-100 (Esteban et al, 2012). As CD plasmocitoides são imunomarcadas por CD4, CD45RA, CD303, CD123 e ILT-3 (Rock et al, 2007; Vermi et al, 2009).

No presente estudo, optamos por estudar a presença de CDL e CD plasmocitoides através dos marcadores CD1a, CD83 e CD303. CD1a corresponde a uma glicoproteína transmembranar responsável por mediar a apresentação de antígenos às células T (Brigl & Brenner, 2004). CD83 é um glicoproteína associada à maturação das CD. Após a captação de antígenos as CD passam a expressar CD83, essas células CD83 positivas são responsáveis por migrar até os linfonodos e iniciar a resposta imunológica (Aerts-Toegaert et al, 2007). CD303

ou BDCL2 corresponde a uma lectina tipo c responsável pela regulação e produção de interferon tipo I (Boiocchi et al, 2013).



Youne et al (1968) foram os primeiros autores a descrever a presença de CDL em CEC de cervix. Segundo Noone et al (1970) lesões malignas apresentam melhor prognóstico quando linfócitos T estão presentes nos tecidos tumorais. Sabe-se que o linfócito T quando ativado pela apresentação de um antígeno atua na destruição das células malignas. Uma das células responsáveis pela apresentação de antígenos ao sistema imune são as CD (Karakök et al, 2002). O papel das CD vem sendo estudado em diversos tipos de cânceres (Fujita et al, 2012; Esteban et al, 2012), além disso sugere-se uma associação entre prognóstico e intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear em lesões tumorais (Gallo et al, 1991). Segundo Gottfried et al (2008) as CD infiltram diversos tumores na tentativa de combater as células malignas, entretanto elas parecem estar fenotípica e funcionalmente alteradas por diversos metabólitos produzidos pelas próprias células neoplásicas, como VEGF, IL-6, IL-10, ácido láctico. Esses autores sugerem que a correção dessas CD alteradas poderia representar uma alternativa promissora no desenvolvimento de drogas anti-neoplásicas.

Abaixo segue uma revisão da literatura de língua inglesa a respeito dos artigos que avaliaram o sistema imune em lesões de CEC, DE e LVP.

Costa et al (2015) avaliaram a presença de CDL maduras e imaturas em 39 espécimes de CEC, 23 de CEC de lábio, 21 de leucoplasias e 13 de queilite actínica através da imunomarcagem para os anticorpos CD83 e CD1a. Os autores encontraram maior número de

CDL nos tumores de lábio em comparação aos tumores orais, sugerindo maior resposta imune nos casos de CEC de lábio.

Rani et al (2015) em um estudo piloto avaliaram a presença de CDL em 27 casos de displasias epiteliais e 28 casos CEC através da imunomarcção para o anticorpo S100. Os resultados mostraram um aumento significativo no número de células positivas para o anticorpo em lesões de CEC. Com isso, concluíram que CDL não funcionantes se acumulam nos tecidos tumorais. Além disso, nos casos de displasia epitelial esse acúmulo pode ser um indicativo de lesões mais agressivas com maior potencial de transformação maligna.

Öhman et al (2015) avaliaram a presença de CDL e células T em leucoplasias displásicas com ou sem transformação para CEC através da técnica imunistoquímica para os anticorpos anti-CD1a, CD3, p53 e Ki67. Os resultados mostraram menor imunomarcção para CD3 nos casos que não evoluíram para CEC.

Maloth et al (2015) avaliaram a presença de CDL em 30 espécimes de mucosa controle, 30 lesões de líquen plano oral (LPO) e 35 CEC (15 tumores bem diferenciados, 14 moderadamente diferenciados e 6 pobremente diferenciados) através da imunomarcção para o anticorpo S100. Os resultados mostraram um aumento no número de CDL nos grupos LPO e CEC e uma diminuição na contagem de CDL com a progressão das lesões de CEC.

Gomes et al (2015) avaliaram a distribuição de CDL em lesões displásicas e neoplásicas de lábio. 63 lesões e 42 lesões controle (mucocele) foram submetidas à técnica imunistoquímica para CD1a e CD83. Os resultados mostraram aumento no número de CDL nas lesões em comparação ao grupo controle. Os autores concluíram que a redução no número de CDL no epitélio desempenha papel importante no desenvolvimento do câncer de lábio.

Shevchuk et al (2014) avaliaram a presença de CDL em lesões de queratose actínica, carcinoma de células basais e CEC através dos marcadores CD1a e CD207. 40 espécimes de cada lesão e 11 espécimes controle foram submetidas à técnica de imunistoquímica. Os resultados mostraram número reduzido de CDL nos tumores em comparação ao tecido controle. Os autores concluíram que o número de CDL pode servir como um fator prognóstico para essas lesões.

Ni et al (2014) avaliaram a distribuição de CD CD208 positivas em espécimes de CEC de boca. Os resultados mostraram maior número de células positivas no estroma tumoral



em comparação com as células neoplásicas. Além disso, o número de células positivas foi maior no estroma tumoral de pacientes com envolvimento linfonodal.

Lasisi et al (2013) quantificaram a presença de CDL em 30 espécimes de mucosa controle e 48 casos de CEC (22 com baixo potencial de malignização e 26 com alto potencial de malignização) através da imunomarcagem para o anticorpo CD1a. Os resultados mostraram um número significativamente maior de CDL no grupo controle quando comparado ao grupo CEC. O número de CDL por milímetro quadrado foi significativamente maior nos tumores com baixo potencial de malignização quando comparado aos tumores com alto potencial de malignização. Os autores concluíram que o número de CDL nos tumores poderia ser um indicativo para a graduação da lesão servindo como fator prognóstico.

Gonçalves et al (2013) avaliaram a resposta imune em linfonodos de pacientes com CEC de boca. A densidade de CD imaturas e maduras foi avaliada utilizando os anticorpos CD1a e CD83 respectivamente. Os resultados demonstraram maior densidade de CD imaturas e menor densidade de CD maduras em lesões metastáticas comparado a linfonodos não-metastáticos. Esses achados sugerem uma imunossupressão do microambiente tumoral que pode estar associado ao perfil metastático dessas células.

Fujita et al (2012) investigaram o potencial das CDL isoladas em CEC humanos em induzir a proliferação e polarização de linfócitos T. Os achados desses autores mostraram que as CDL dos CEC eram mais eficazes em induzir a proliferação das células T em comparação as CDL localizadas nas adjacências do tumor. Com isso, concluíram que as CDL apresentam-se como um novo alvo terapêutico para o tratamento de pacientes com câncer.

Öhman et al (2012) avaliaram a presença e distribuição de CDL e células T em leucoplasias displásicas e não displásicas e em CEC através da técnica imunoistoquímica para os anticorpos anti-CD1a, CD207, CD3, CD4, CD8 e Ki67. Os resultados mostraram maior imunomarcagem para CD1a em leucoplasias displásicas comparadas às não displásicas. A presença de CD207 foi semelhante em todas as lesões. Leucoplasias displásicas e não displásicas apresentaram imunomarcagem semelhante para CD4 e CD8, no entanto houve um aumento significativo desses marcadores em CEC. A velocidade de proliferação celular mostrou-se significativamente maior em CEC comparada a leucoplasias displásicas. Este estudo concluiu que células epiteliais displásicas e células malignas são capazes de induzir a ativação do sistema imune.

Upadhyay et al (2012) avaliaram a presença e o padrão de distribuição de CDL em displasia epitelial oral e CEC. 45 espécimes de lesão foram analisados através da expressão do anticorpo CD1a. Os resultados mostraram um declínio na contagem de CDL na progressão de ambas as lesões analisadas. As camadas basal e suprabasal das displasias e a periferia dos CEC apresentavam aumento na densidade de CDL, além disso, a área de estroma tumoral também apresentava altos níveis de CDL. Por outro lado displasias severas e CEC pouco diferenciados apresentavam uma diminuição significativa na contagem dessas células. Os autores concluíram que parece haver um recrutamento de CDL nos processos neoplásicos e que as variações nos níveis de CDL dentro de cada lesão podem ser interpretadas de acordo com a sua função biológica.

Klatka et al (2012) analisaram a correlação entre CD imaturas e maduras e parâmetros clínicos em espécimes de CEC de laringe e em sangue periférico de 66 pacientes. Os resultados demonstraram que os espécimes tumorais indiferenciados apresentavam aumento no número de CD em comparação ao sangue periférico. Além disso, no sangue de pacientes com maior estadiamento clínico (T4) o número de CD era significativamente menor que em tumores T1. Em pacientes com metástases linfonodais o sangue periférico apresentava menor quantidade de células imaturas e maior quantidade de células maduras do que os tumores. Os autores concluíram que alterações na proporção de CD de pacientes com CEC de laringe podem resultar no desenvolvimento de resistência imunológica.

O'Donnell et al (2007) avaliaram a distribuição de CDL imaturas e maduras e CD plasmocitoides em 63 CEC e 8 metástases linfonodais através da expressão imunoistoquímica dos anticorpos CD207 e CD209. Os resultados mostraram que células imaturas estavam presentes no tumor primário, no entanto raramente encontravam-se infiltrando o tumor. A presença de células maduras foi escassa e geralmente estava associada a pior prognóstico. Os autores concluíram que a resposta deficiente das CD em lesões tumorais parece estar relacionada a função alterada e não a falhas no recrutamento dessas células. Portanto, uma estratégia mais eficaz para restabelecer a função imunológica em resposta a lesões malignas seria manter o equilíbrio dos fatores secretados no microambiente tumoral, ao invés de restaurar somente uma única população de CD.

Sakakura et al (2006) avaliaram a proporção de CD e o perfil de citocinas de células T no sangue periférico de pacientes com CEC de cabeça e pescoço utilizando

citometria de fluxo. Os resultados demonstraram uma diminuição na proporção de CD circulantes nesses pacientes.

Goldman et al (1998) avaliaram a correlação entre recidiva e sobrevida de pacientes com CEC de língua e a quantidade de CD no tumor e em áreas adjacentes. Os espécimes foram submetidos à técnica de imunistoquímica para os anticorpos S100 e CD1a. Os resultados obtidos demonstraram que pacientes com imunexpressão positiva de CD1a nas CD adjacentes ao tumor apresentaram maior sobrevida e menor taxa de recidiva. Além disso, a quantidade de CD positivas para CD1a no epitélio peritumoral apresentou correlação inversamente proporcional ao estágio do tumor e à presença de metástases linfonodais.

Gallo et al (1991) avaliaram a expressão de CDL em 88 espécimes de CEC de laringe. Foram utilizados anticorpos para a proteína S100 e observou-se que havia uma correlação positiva entre a densidade de CDL e a sobrevida dos pacientes, ou seja, pacientes com densidade alta ou intermediária apresentaram sobrevida maior quando comparados aos pacientes com baixa densidade de CDL (sobrevida média: 61%, 62%, e 0%, respectivamente). Além disso, a marcada presença de infiltrado linfoide junto ao tumor também pode ser considerada um bom fator prognóstico para pacientes com CEC de laringe.

Kurihara & Hashimoto (1985) avaliaram o papel da CDL em 48 casos de CEC oral. Foi realizada análise imunistoquímica das CDL através do anticorpo S100. Os resultados obtidos mostraram um aumento no número de CDL e linfócitos nos casos avaliados. Os autores concluíram que parece existir alguma influência do sistema imunológico em carcinomas de boca.

Sendo assim, essa tese visa avaliar a expressão de CDL imaturas e maduras, CD plasmocitoides e linfócitos T em leucoplasias com displasia epitelial, LVP e CEC de boca e correlacionar esses achados com as características clínicas. Para tanto, os resultados foram divididos em dois artigos científicos.

Tabela 1. Perfil das células dendríticas.

	Localização preferencial	Anticorpos
CD madura	linfonodo, pele e mucosa	CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86
CD imatura	pele e mucosa	CD1a, CD207
CD plasmocitoide	tecidos linfoides e não-linfoides	CD4, CD45RA, CD303, CD123 e ILT-3

Tabela 2. Artigos publicados nos últimos 10 anos (2007 à 2016) a cerca de CD, LPM e CEC.

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Número de casos</b>	<b>Anticorpos</b>	<b>Análise</b>	<b>Conclusão</b>
<b>O'Donnell et al</b>	2007	63	CD207 e CD209	semiquantitativa	A resposta deficiente das CD em lesões tumorais parece estar relacionada a função alterada e não a falhas no recrutamento dessas células.
<b>Klatka et al</b>	2012	66	CD1c, CD123, CD303, CD19-PE-Cy5, CD83, CD1a e HLA-DR	citometria de fluxo	Alterações na proporção de CD de pacientes com CEC de laringe podem resultar no desenvolvimento de resistência imunológica.
<b>Upadhyay et al</b>	2012	44	CD1a	quantitativa	Parece haver um recrutamento de CDL nos processos neoplásicos e as variações nos níveis de CDL dentro de cada lesão podem ser interpretadas de acordo com a sua função biológica.
<b>Öhman et al</b>	2012	35	CD1a, CD207, CD3, CD4, CD8 e Ki67	escaner à laser	Células epiteliais displásicas e células malignas são capazes de induzir a ativação do sistema imune.
<b>Fujita et al</b>	2012	-	-	citometria de fluxo	CDL apresentam-se como um novo alvo terapêutico para o tratamento de pacientes com câncer.

---

<b>Gonçalves et al</b>	2013	30	CD1a, CD83, CD8, perforina e Foxp3	quantitativa	A maior densidade de CD imaturas e menor densidade de CD maduras em lesões metastáticas comparada a linfonodos não-metastáticos sugere uma imunossupressão do microambiente tumoral que pode estar associado ao perfil metastático dessas células.
<b>Lasisi et al</b>	2013	48	CD1a	quantitativa	O número de CDL nos tumores poderia ser um indicativo para a graduação da lesão servindo como fator prognóstico.
<b>Ni et al</b>	2014	79	CD208	quantitativa	O acúmulo de CD208 não está correlacionado a sobrevida dos pacientes com CEC.
<b>Schevchuk et al</b>	2014	120	CD1a e CD207	quantitativa	O número de CDL pode servir como um fator prognóstico para carcinoma de células basais e CEC.
<b>Gomes et al</b>	2015	63	CD1a e CD83	quantitativa	A redução no número de CDL no epitélio desempenha papel importante no desenvolvimento do câncer de lábio.
<b>Maloth et al</b>	2015	95	S100	-	Uma melhor compreensão das CDL é essencial para o desenvolvimento de terapias.

---

---

<b>Öhman et al</b>	2015	16	CD1a, CD3, p53 e Ki67	quantitativa	A presença de CD3 sugere menor risco de malignização das leucoplasias.
<b>Rani et al</b>	2015	55	S100	quantitativa	CDL não funcionantes se acumulam nos tecidos tumorais. Além disso, nos casos de displasia epitelial esse acúmulo pode ser um indicativo de lesões mais agressivas com maior potencial de transformação maligna.
<b>Costa et al</b>	2015	96	CD1a e CD83	quantitativa	Os maior número de CDL nos tumores de lábio em comparação aos tumores orais sugere maior resposta imune nos casos de CEC de lábio.

---

## ARTIGOS

Este trabalho foi realizado no formato alternativo, conforme Informação CCPG/001/2015, da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas.

### **Artigo 01: Expression of dendritic, langerhans and T cells in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma.**

Ana Carolina Amorim Pelliccioli (Pelliccioli ACA), Paula Farthing (Farthing P), Lynne Bingle (Bingle L), Márcio Ajudarte Lopes (Lopes MA), Manoela Domingues Martins (Martins MD), Pablo Agustin Vargas (Vargas PA)

Artigo em processo de submissão ao periódico: *Journal of Oral Pathology and Medicine*

### **Artigo 02: Expression of dendritic cells and T cells in oral proliferative verrucous leukoplakia**

Ana Carolina Amorim Pelliccioli (Pelliccioli ACA), Paula Farthing (Farthing P), Lynne Bingle (Bingle L), Márcio Ajudarte Lopes (Lopes MA), Manoela Domingues Martins (Martins MD), Pablo Agustin Vargas (Vargas PA)

Artigo submetido ao periódico: *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology (TRIPLEO-D-16-01091)*



## 2.1 Expression of dendritic, langerhans and T cells in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma.

Expression of DC and T cells in OED and OSCC.

Ana Carolina Amorim Pelliccioli - DDS, PhD student<sup>1</sup>

Lynne Bingle - BSc, PhD<sup>1,2</sup>

Paula Farthing - BSc, BDS, FDSRCS, PhD, FRCPath, FHEA<sup>2</sup>

Márcio Ajudarte Lopes - DDS, PhD<sup>1</sup>

Manoela Domingues Martins - DDS, PhD<sup>1,3</sup>

Pablo Agustin Vargas - DDS, PhD<sup>1</sup>, FRCPath

<sup>1</sup> Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Brazil.

<sup>2</sup> School of Clinical Dentistry, University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom.

<sup>3</sup> School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

### **Corresponding Author:**

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

Departamento de Diagnóstico Oral – Patologia

Av. Limeira, 901

CEP: 13414-903

Piracicaba – São Paulo – Brazil

Tel.: +55 19 21065319

E-mail: [pavargas@unicamp.br](mailto:pavargas@unicamp.br)

### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

### **Funding**

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP – grant: 2013/18321-8), Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES – grant: 008317/2014-03) and National Council of Technological and Scientific Development (CNPq – grant: 305967/2014-2).

## Abstract

Oral squamous cell carcinomas (OSCC) can arise from potentially malignant disorders, such as leukoplakia. The immune system plays an important role recognizing tumour precursor cells. However, due to immunoediting mechanisms cancer cells are able to escape immune system surveillance.

**Objective:** Evaluate the profile of dendritic, plasmacytoid and T cells in oral epithelial dysplasia (OED) and OSCC and correlate these findings with clinical data.

**Materials and Methods:** Fifty cases of OSCC and 48 of OED were immunostained for CD1a, CD83, CD303 and CD8 followed by quantitative analysis.

**Results:** Analysis revealed a significant decrease in the number of CD1a and CD83 positive cells in OSCC compared with OED group. CD303 positivity was significantly increased in the OSCC group when compared to OED whilst there was no statistical difference in CD8 positivity between OSCC and OED. No statistical correlation was found with clinical data.

**Conclusion:** The number of mature dendritic cells (DC) was increased in OED compared with OSCC lesions suggesting that maybe these cells might have migrated to lymph nodes to present the tumour antigen and activate the immune system. The numbers of plasmacytoid DC was significantly increased in the OSCC group compared with the OED group. This suggests they may play an important role in the defence against tumours although it is not clear whether this is promoting or inhibiting malignant progression.

**Key words:** immune system, dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, oral squamous cell carcinoma, epithelial dysplasia.

## Introduction

Global Cancer Statistics estimated 442,760 cases of oral and oropharyngeal cancer worldwide in 2012 (1). Brazilian National Institute of Cancer showed that oral cavity cancer accounted for 61% (31,583) of the cases analysed, whereas 39% (20,222) affected the oropharynx in the period 2000–2010 (2). The majority of these tumours are squamous cell carcinoma (OSCC) and some of them arise from previous lesions known as potentially malignant disorders (PMD) (3). If these show oral epithelial dysplasia (OED) there may be an increased malignant transformation rate (4).

According to the immunosurveillance and immunoediting hypothesis the immune system plays an important role protecting the organism against precursor malignant cells (5). Tumour cells have, however, developed mechanisms by which they can evade the immune system (6). The hypothesis incorporates these evasion techniques and suggests that the interaction between the host and the malignant cells is driven by three phases; tumour cells are recognised and eliminated in the elimination phase, some malignant transformed cells survive into the equilibrium phase, so that finally, in the escape phase, the persistent cells proliferate into a tumour (7).

Dendritic cells (DC) are antigen-presenting cells responsible for recognizing tumour cells and presenting tumour antigens to lymphocytes, consequently initiating the immune response (8). DC localized in the epithelium are called dendritic Langerhans cells (DLC). Immature DLC are vigilant cells with an increased capacity for antigen uptake whilst mature DLC migrate from the epithelium to lymphoid organs to present antigens to T cells (9). Plasmacytoid DC comprise a rare subset of DC that produce large amounts of type I interferon, a tumour suppressor cytokine (10).

Multiple subsets of DC are involved in the activation of the immune system (11) and while many studies have analysed the role DC play in different types of cancer (12, 13) most have focussed on only one or two subsets. The aim of this study was to evaluate the expression of immature and mature DLC, plasmacytoid DC and T lymphocytes in OED and OSCC and correlate these findings with clinical data.

## Materials and methods

### *Samples*

The samples used in this study were collected with ethical approval (protocol number 086/2013). Fifty cases of OSCC and 48 cases of OED were retrospectively retrieved from the files of two institutions: the Department of Oral Diagnosis of the University of Campinas (Piracicaba Dental School, Brazil) and the Department of Pathology of Porto Alegre University Hospital (Porto Alegre, Brazil). Clinical information was collected from patients' records.

The histopathological diagnoses were confirmed by reviewing the original 5 $\mu$ m histological sections stained with hematoxylin and eosin (H&E). OED were classified according to WHO classification for dysplastic lesions (14). OSCC were classified according to Broder's grading system, which was the same grading system adopted by WHO (14).

### *Immunohistochemistry*

Immunohistochemistry was carried out on 3 $\mu$ m sections of the original formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Slides were de-waxed with xylene and hydrated in 100% ethanol. Antigen retrieval (AR) was performed as stated in Table 1 and the slides were treated with 3% hydrogen peroxide in methanol to quench endogenous peroxidase activity. After washing in PBS buffer (pH 7.4), slides were incubated with 100% normal horse serum at room temperature for 30 minutes and then incubated overnight at 4°C with the following antibodies CD1a, CD83, CD303 and CD8 diluted in the same serum previously mentioned. The antibody dilutions, clone, AR used, stained cells and positive controls are given on table 1. The following day, a Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA), containing an appropriate biotin-labelled secondary antibody, was used according to the manufacturer's instructions. Reactions were developed with a diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to the manufacturer's instructions, sections counterstained with haematoxylin, dehydrated with xylene and mounted in distyrene, a plasticizer, and xylene (DPX).

Quantification of positive DC and T cells was performed by a single pathologist using a light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with a 40x eyepiece in five sequential fields randomly selected (16). In the OSCC group cells were counted in the epithelial nests and surrounding stroma. In the OED group cells were counted in the epithelial layer and in the lamina propria. In both groups cells from the five fields counted were taken as a total number.

### *Statistical analysis*

Analysis of variance (ANOVA) was applied to analyze data distributions. Tukey-Kramer and t test were applied to perform multiple comparisons among groups. For all tests, a P-value of  $< 0.05$  was considered to be statistically significant. Statistical data were calculated using SAS (SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2010).

## Results

Clinical data of the patients is shown in Tables 2 and 3. No statistical differences were found when correlating clinical findings with DC and T cell number (data not shown).

The OSCC group comprised mainly males (78%), aged 45 years or more. The most affected site was the floor of the mouth (38%) followed by the palate (22%) and thirty (60%) cases were associated with symptoms of pain. With regard to the TNM system (14), 14 (28%) cases were T1/T2 and 35 (70%) cases T3/T4. 24 cases (48%) were N0 for regional lymph nodes, 20 (40%) were N1/N2/N3 and 3 (6%) cases could not be assessed. 40 cases (80%) were M0 for distant metastases, 2 (4%) were M1 and 5 (10%) cases could not be assessed. According to the tumour stage, 8 cases (16%) were classified as stage 0/I/II and 39 (78%) were stage III/IV. The treatment consisted mainly of surgery with/without radiotherapy and/or chemotherapy. Twenty-five (50%) patients showed signs of recurrence of the disease. Thirty patients (60%) were alive, 14 (28%) died from their tumour and 2 (4%) died from other causes (Table 2).

In the OED group, 25 (52%) cases were males, 23 (48%) females and thirty eight (79%) were aged 45 or older. The most affected sites were the tongue with 16 (33%) cases and the buccal mucosa with 15 (32%) cases followed by the floor of the mouth with 7 (15%) cases, palate with 4 (8%) and alveolar ridge with 2 (4%) cases (Table 3).

According to Broder's histological grading system 17 (34%) tumours were well differentiated, 20 (40%) moderately differentiated and 10 (20%) poorly differentiated, 3 (6%) cases were non available. The number of mature CD83 DLC was significantly increased in poorly differentiated OSCC when compared to well and moderate differentiated tumours. The dysplastic lesions were graded according to WHO classification (14) and 37 (74%) cases in the OED group presented with mild or moderate dysplasia and 11 (22%) with severe dysplasia (Table 4).

Distribution of DC and T lymphocytes in all groups is shown in Table 5 and Figure 1. CD1a positive cells were seen mainly in the epithelial compartment of the lesions as dendritic cells and CD83 and CD303 positive cells were seen mainly in the connective tissue and stroma as round shaped and plasmacytoid cells, respectively. The expression of immature CD1a positive DLC and mature CD83 positive DLC was significantly lower in the OSCC group when compared to OED. Conversely the expression of plasmacytoid DC CD303 positive cells was significantly higher in the OSCC group when compared with the OED group. Quantification of CD8 positive T cells indicated no statistical difference between OSCC and OED.

## Discussion

The immune system plays an important role in the tumour microenvironment (17). DC are important antigen presenting cells responsible for detecting tumour antigens, recruiting T cells and thereby initiating the immune response (18). Grulich et al (2007) (19) have shown that immuno-compromised patients are more susceptible to the development of malignant diseases due to an impaired immune response. An adequate response of the mucosal immune system is essential to protect the mucosa against malignant transformed cells (20). In this study we analyzed the expression of immature and mature DLC and plasmacytoid DC and T cells within OSCC and OED.

Several histological grading systems have been developed to categorize dysplastic and malignant lesions. Broder's grading system was based on level of keratinization, mitotic activity, cellular and nuclear pleomorphism. This classification grades tumour into well, moderately and poorly differentiated (14). In the present study Broder's grading system was used to evaluate OSCC lesions. Our results showed significantly greater numbers of mature CD83 DLC in poorly differentiated compared with moderately and well differentiated OSCC. Therefore, we may imply that as the number of mature DLC is higher in poorly differentiated lesions the immune system might be identifying tumor antigens. Maybe DLC are recognizing and presenting antigens, however their capacity to properly activate T cells and initiate the immune response might be impaired.

According to the literature, Gomes et al (2016) (12) found that the number of DLC is increased in OED and normal epithelium compared with lip SCC, while Costa et al (2016) (20) found reduced number of DC in dysplastic lesions when compared to OSCC. Our

results showed an increase in the number of mature DC in OED compared with OSCC lesions. Gomes et al (2016) stated that an imbalance in the immune response may be responsible for the development of oral cancer. However, we suggest that maybe mature DC are reduced in number within the tumor because they might have migrated to lymph nodes to present the tumour antigen and activate the immune system.

The presence of DC infiltrating solid tumours remains controversial, some studies have found a negative correlation with prognosis whilst others have shown DC infiltration as being beneficial in terms of prognosis (23, 24). Liao et al (2015) (23) evaluated mature DC in esophageal OSCC and demonstrated increased expression of DC in cancer tissues was associated with a poor prognosis. Ladányi (2015) (24) analysed the role of DC infiltrating melanomas and found that an increase in the number of T and B cells and DC was associated with a better outcome, while an increase in the number of plasmacytoid DC was associated with a poor prognosis. O'Donnell et al (2007) (13) suggested that the lack of immune response, possible even in cases with increased numbers of DC, was due to a failure of the recruited DC to initiate a powerful immune response. CD303 or blood dendritic cell antigen (BDCA) is a type II lectin used to identify plasmacytoid DC. Plasmacytoid DC reside in lymphoid and non-lymphoid organs and produce large amounts of type I interferon (IFN) (25). Type I IFN, particularly IFN alpha, has been used in the treatment of several solid tumours due to its antitumour behaviour (26, 27). Saadeh et al (2016) (28) reviewed the role of pDC in inflammatory/autoimmune cutaneous diseases. Authors stated that in general type I IFN levels play a protective role towards the organism. However, in some skin disorders this cytokine is involved in the development of the disease. Moschos et al (2005) (27) suggested that although plasmacytoid DC colonize tumours their effectiveness in producing IFN was negatively affected. Our results indicated that numbers of plasmacytoid DC was significantly increased in the OSCC group compared with the OED group. This suggests they may play an important role in the defence against tumours although it is not clear whether this is promoting or inhibiting malignant progression. However, we found no association with clinical data.

According to Savina and Amigorena (2007) (27) an effective immune response against tumour antigens requires the activation and recruitment of CD8 positive T cells. To make this happen DC must take up the tumour antigen, process it via major histocompatibility complex (MHC) class I or class II molecules and initiate the cytotoxic immune response. Öhman et al (2012) (3) were one of the first authors to evaluate the role of CD8 positive cells

in oral leukoplakias with and without dysplasia and OSCC. Results showed significantly increased number of CD8 positive cells in the OSCC group when compared to the epithelial compartment of dysplastic leukoplakias. In the present study the CD8 positive cells response showed no statistical differences between OED and OSCC. Our result might be different for the study previous mentioned because we analysed the whole specimen of both lesions, while Öhman et al (2012) compared OSCC lesions with the epithelial compartment of dysplastic leukoplakias.

In conclusion, the immune system may play a role in the progression of PMD to OSCC. According to our findings we can conclude that in both the OED and OSCC groups antigen presenting cells and T lymphocytes are present. We further suggest that increased expression of plasmacytoid DC in the OSCC group may play a role in the immune response against OSCC. Finally, due to the multiple subsets of DC it would be interesting to fully elucidate their function and activation status in OED and OSCC.



## References

1. TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL et al. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 2015; 65: 87-108.
2. CURADO MP, JONHSON N, KERR AR, MENDONÇA E SILVA DR, LANFRANCHI H, PEREIRA DL, FONSECA FP, LOPES MA, KOWALSKI LP, VARGAS PA Oral and oropharynx cancer in South America: Incidence, mortality trends and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Translational Research in Oral Oncology* 2016: 1-7.
3. OHMAN J, MAGNUSSON B, TELEMO E et al. Langerhans cells and T cells sense cell dysplasia in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas--evidence for immunosurveillance. *Scandinavian journal of immunology* 2012; 76: 39-48.
4. LIU W, SHI LJ, WU L et al. Oral cancer development in patients with leukoplakia--clinicopathological factors affecting outcome. *PloS one* 2012; 7: e34773.
5. DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-48.
6. DUNN GP, BRUCE AT, IKEDA H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 2002; 3: 991-8.
7. DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology* 2004; 22: 329-60.
8. ESTEBAN F, RUIZ-CABELLO F, GONZALEZ-MOLES MA et al. Clinical significance of langerhans cells in squamous cell carcinoma of the larynx. *Journal of oncology* 2012; 2012: 753296.
9. MELLMAN I, STEINMAN RM Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106: 255-8.
10. LANDE R, GILLIET M Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010; 1183: 89-103.
11. BANCHEREAU J, PALUCKA AK Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature reviews Immunology* 2005; 5: 296-306.
12. GOMES JO, DE VASCONCELOS CARVALHO M, FONSECA FP et al. CD1a+ and CD83+ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2016; 45: 433-9.

13. O'DONNELL RK, MICK R, FELDMAN M et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. *Cancer letters* 2007; 255: 145-52.
14. BARNES L EJ, REICHART P SD. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. 2005.
15. MALOTH AK, DORANKULA SP, PASUPULA AP et al. A Comparative Immunohistochemical Analysis of Langerhans Cells in Oral Mucosa, Oral Lichen Planus and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2015; 9: ZC76-9.
16. MA Y, SHURIN GV, PEIYUAN Z et al. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *Journal of Cancer* 2013; 4: 36-44.
17. TRAN JANCO JM, LAMICHHANE P, KARYAMPUDI L et al. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *Journal of immunology* 2015; 194: 2985-91.
18. GRULICH AE, VAN LEEUWEN MT, FALSTER MO et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 370: 59-67.
19. UPADHYAY RB UJ, RAO NN, AGRAWAL P The role of Langerhans cells in oral squamous cell carcinoma. *Chinese-German J Clin Oncol* 2011; 10: 606-611.
20. COSTA NL, GONCALVES AS, MARTINS AF et al. Characterization of dendritic cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2016; 45: 418-24.
21. LIAO X, CHEN Y, LIU D et al. High Expression of LAMP3 Is a Novel Biomarker of Poor Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences* 2015; 16: 17655-67.
22. LADANYI A Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 2015; 28: 490-500.
23. DZIOONEK A, SOHMA Y, NAGAFUNE J et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *The Journal of experimental medicine* 2001; 194: 1823-34.
24. ZITVOGEL L, GALLUZZI L, KEPP O et al. Type I interferons in anticancer immunity. *Nature reviews Immunology* 2015; 15: 405-14.

25. MOSCHOS S, VARANASI S, KIRKWOOD JM Interferons in the treatment of solid tumors. *Cancer treatment and research* 2005; 126: 207-41.
26. SAADEH D, KURBAN M, ABBAS O Update on the role of plasmacytoid dendritic cells in inflammatory/autoimmune skin diseases. *Experimental dermatology* 2016; 25: 415-21.
27. SAVINA A, AMIGORENA S Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological reviews* 2007; 219: 143-56.

## TABLES

Table 1. Antibodies and AR specifications.

<b>Antibody</b>	<b>Source</b>	<b>Clone</b>	<b>Dilution</b>	<b>Antigen retrieval (AR)*</b>	<b>Stained cells</b>	<b>Positive control</b>
<b>CD1a</b>	Abcam	CD1a007	1:50	Citrate buffer (pH 6.0)	Imature DLC	Langerhans cell histiocytosis
<b>CD83</b>	Abcam	1H4b	1:50	Tris/EDTA (pH 9.0)	Mature DLC	lymph node
<b>CD303</b>	Dendritics	124B3.13	1:50	EDTA (pH 8.0)	pDC	lymph node
<b>CD8</b>	Dako	144B	1:90	EDTA (pH 8.0)	cytotoxic T cells	lymph node

\*AR was performed using a microwave at 700W of power.

Table 2. Clinical features of OSCC group.

<b>Parameter</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Gender</b>		
Male	39	78
Female	10	20
NS	1	2
<b>Age</b>		
< 45	6	12
≥ 45	43	86
NS	1	2
<b>Site</b>		
Floor of the mouth	19	38
Tongue	8	16
Palate	11	22
Others	10	20
NS	2	4

NS: non specified

Table 3. Clinical features of OED group.

<b>Parameter</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Gender</b>		
Male	25	52
Female	23	48
<b>Age</b>		
< 45	8	16
≥ 45	38	79
NS	2	5
<b>Site</b>		
Tongue	16	33
Buccal mucosa	15	32
Floor of the mouth	7	15
Palate	4	8
Alveolar ridge	2	4
Other	3	6
NS	1	2

NS: non specified

Table 4. Quantification of positive cells for all the antibodies according to the histological grading in each group.

Antibody	Group	Histological grading	Mean and SD
CD1a	OSCC*	well differentiated	16.23±21.99 <sup>A</sup>
		moderately differentiated	9.95±22.39 <sup>A</sup>
		poorly differentiated	16.80 ±11.84 <sup>A</sup>
	OED**	mild/moderate	22.37 ±19.09 <sup>A</sup>
		severe	12.18 ±10.28 <sup>A</sup>
CD83	OSCC*	well differentiated	13.17±14.74 <sup>A</sup>
		moderately differentiated	11.90±19.42 <sup>A</sup>
		poorly differentiated	100.1 ±174.23 <sup>B</sup>
	OED**	mild/moderate	84.18±98.96 <sup>A</sup>
		severe	80.09±91.09 <sup>A</sup>
CD303	OSCC*	well differentiated	21.58±58.44 <sup>A</sup>
		moderately differentiated	15.30±26.93 <sup>A</sup>
		poorly differentiated	18.20 ±22.14 <sup>A</sup>
	OED**	mild/moderate	5.00 ±11.08 <sup>A</sup>
		severe	3.27 ±8.52 <sup>A</sup>
CD8	OSCC*	well differentiated	92.94±92.85 <sup>A</sup>
		moderately differentiated	76.00±96.81 <sup>A</sup>
		poorly differentiated	49.00 ±51.54 <sup>A</sup>
	OED**	mild/moderate	103.35 ±102.19 <sup>A</sup>
		severe	115.36 ±69.70 <sup>A</sup>

SD: standard deviation

\*Different upper case letter indicates the statistical difference comparing each group through the ANOVA test with significant level of 5%.

\*\*Different upper case letter indicates the statistical difference comparing each group through the t test with significant level of 5%.

Table 5. Quantification of positive cells for all the antibodies in each group.

Antibody	Group	Mean and SD
CD1a*	OSCC	0.04±0.08 <sup>A</sup>
	OED	0.07±0.14 <sup>A</sup>
CD83**	OSCC	34.94± 88.87 <sup>B</sup>
	OED	94.00±99.72 <sup>A</sup>
CD303**	OSCC	22.79±24.67 <sup>A</sup>
	OED	7.13±12.67 <sup>B</sup>
CD8**	OSCC	83.24±86.53 <sup>A</sup>
	OED	105.46±96.78 <sup>A</sup>

SD: standard deviation

\*Different upper case letter indicates the statistical difference comparing each group through the t test with significant level of  $P < 0.05$

\*\* Different upper case letter indicates the statistical difference comparing each group through the Tukey-Kramer test with significant level of  $p < 0.05$ .



## FIGURE

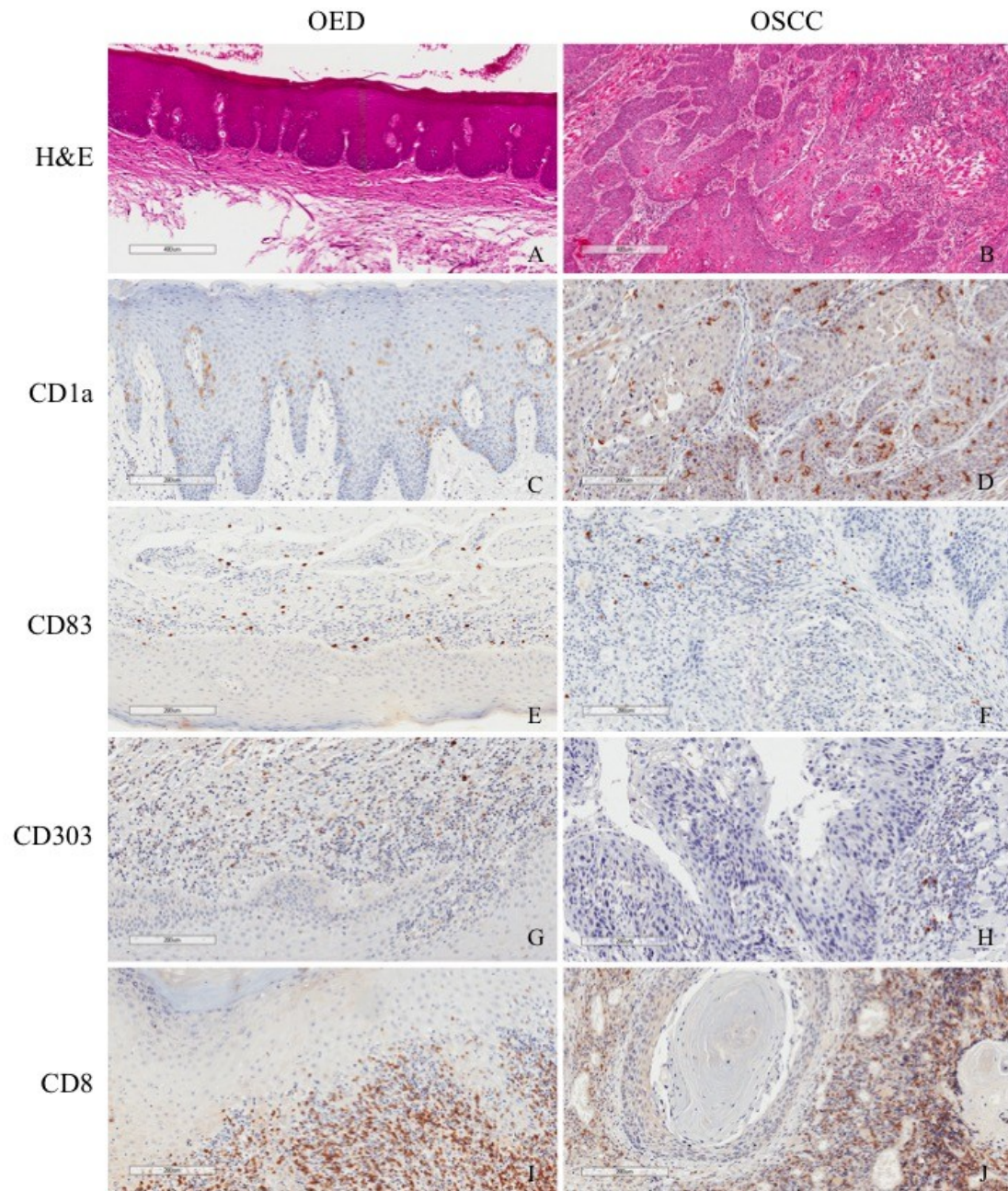


Figure 1. Histological and immunohistochemical panel showing OED and OSCC lesions stained for H&E (A and B, 100X) and immunostained for CD1a, CD83, CD303 and CD8 (C-J, 100X). A) Epithelial dysplasia showing mild/moderate alterations. B) OSCC showing neoplastic cell nests invading the subjacent connective tissue. C and D) CD1a positive cells expressed mainly in the epithelial compartment of OED and OSCC, respectively. E and F) CD83 positive cells expressed mainly in the connective tissue and stroma as round shaped cells, respectively. G and H) CD303 positive cells expressed mainly in the connective tissue

and stroma as plasmacytoid cells, respectively. I and J) CD8 positive cells expressed mainly in the connective tissue and stroma as small round shaped cells, respectively.

## 2.2 Expression of dendritic cells and T cells in oral proliferative verrucous leukoplakia

Ana Carolina Amorim Pellicioli - DDS, PhD student<sup>1</sup>

Lynne Bingle - BSc, PhD<sup>1,2</sup>

Paula Farthing - BSc, BDS, FDSRCS, PhD, FRCPath, FHEA<sup>2</sup>

Márcio Ajudarte Lopes - DDS, PhD<sup>1</sup>

Manoela Domingues Martins - DDS, PhD<sup>1,3</sup>

Pablo Agustin Vargas - DDS, PhD<sup>1</sup>, FRCPath

<sup>1</sup> Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Brazil.

<sup>2</sup> School of Clinical Dentistry, University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom.

<sup>3</sup> School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

### Corresponding Author:

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

Departamento de Diagnóstico Oral – Patologia

Av. Limeira, 901

CEP: 13414-903

Piracicaba – São Paulo – Brazil

Tel.: +55 19 21065319

E-mail: [pavargas@unicamp.br](mailto:pavargas@unicamp.br)

### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

### Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP – grant: 2013/18321-8), Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES – grant: 008317/2014-03) and National Council of Technological and Scientific Development (CNPq – grant: 305967/2014-2).

## Abstract

Proliferative verrucous leukoplakia (PVL) comprises a distinct form of leukoplakia with a distinct clinical course. Dendritic cells and cytotoxic lymphocytes play an important role in identifying altered cells, however, these cells developed mechanisms to escape from the immune surveillance. The objective of this study was to analyse the expression of dendritic and T cells in 15 patients diagnosed with oral PVL by immunohistochemical analysis using CD1a, CD83, CD303 and CD8 primary antibodies. Results revealed increased expression of CD1a and CD8 and decreased expression of CD83 from hyperkeratosis to severe epithelial dysplasia. The presence of CD8 T cells might indicate that the immune system is active, however the expression of mature DC suggests that to some extent it is impaired. We suggest that this singular entity may interact differently with the immune cells maybe not following the same pattern of malignant transformation as conventional oral leukoplakias.

**Key words:** immune system, dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, proliferative verrucous leukoplakia.

## Letter to the Editor

PVL comprises a distinct form of leukoplakia described by Hansen et al (1985)<sup>1</sup> as multiple white lesions in the oral mucosa with a high tendency to recurrence and malignant transformation<sup>2,3</sup>. Although the early stage is characterized by indolent lesions, such as hyperkeratosis, the malignant transformation rate ranges from 33% to 86%<sup>4</sup>.

The immune system is responsible for detecting and neutralizing antigens<sup>5</sup>, such as viruses, bacteria and malignant cells. In order to effectively activate the immune system against malignant cells, antigen presenting cells must take up the antigen, process it via the major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and recruit CD8 positive T cells<sup>6</sup>. Dendritic cells (DC) are antigen presenting cells responsible for initiating the immune response<sup>7</sup> and those localized in the epithelium are referred to as dendritic Langerhans cells (DLC)<sup>8</sup>. DLC present as being either immature or mature with the former stage comprising cells with an increased capacity of antigen uptake and the later antigen presentation to T lymphocytes<sup>9</sup>. Plasmacytoid DC are quite rare and produce large amounts of type I interferon, a tumor suppressor cytokine<sup>10</sup>.

To our knowledge this is the first attempt to evaluate the immune response in PVL lesions through the immunohistochemical analysis of dendritic cells and cytotoxic lymphocytes. Fifteen samples of patients of PVL were immunostained for CD1a, CD83, CD303 and CD8 followed by the quantification of positive DC and T cells using a light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with a 40x eyepiece in five sequential fields<sup>11</sup>.

All PVL individuals were female, 9 (60%) cases were from patients aged 60 or over, the other 6 (40%) aged between 51 and 59 and the most affected site was the tongue (26.7%) followed by the alveolar ridge (20%), buccal mucosa (13.4%) and floor of the mouth (6.6%). Four (27%) cases were diagnosed as hyperkeratosis, 8 (53%) presented with mild or moderate dysplasia and 3 (20%) presented with severe dysplasia. The mean number of CD1a positive cells was 2.50 for hyperkeratosis, 5.12 for mild or moderate dysplasia and 9.00 for severe dysplasia. The mean number of CD83 positive cells was 42.00 for hyperkeratosis, 16.75 for mild or moderate dysplasia and 12.50 for severe dysplasia. The mean number of CD303 positive cells was 0.00 for hyperkeratosis, 0.25 for mild or moderate dysplasia and 0.00 for severe dysplasia. The mean number of CD8 positive cells was 6.75 for hyperkeratosis, 8.42 for mild or moderate dysplasia and 12.00 for severe dysplasia. No

statistically significant differences were found when correlating histological grading with DC and T cell immunohistochemical expression.

PVL comprises a distinct type of leukoplakia characterized by increased malignant transformation<sup>2,12</sup>. Abadie et al (2016)<sup>4</sup> reviewed 26 papers, comprising 329 patients diagnosed with PVL, and described a malignant transformation average rate of 63.9%. Our results showed that the pattern of expression of immature and mature DC is quite interesting. The expression of CD1a increased from hyperkeratosis to severe epithelial dysplasia indicating that immature cells may be taking up antigens. However, the expression of CD83 mature cells, responsible for presenting the antigen to cytotoxic lymphocytes, decreased from hyperkeratosis to severe epithelial dysplasia. These results may suggest that the immature DC cells are present and functional in the tissue, however after taking up the antigen, altered cells may somehow lack functionality and evade the immune surveillance.

Plasmacytoid (pDC) comprise a rare subtype of DC residing in lymphoid and non-lymphoid organs and are responsible for the synthesis of large amounts of type I interferon (IFN)<sup>13</sup>. Previous studies have shown that although pDC colonize tumors their effectiveness in producing IFN may be severely impaired<sup>14,15</sup>. The role these cells play in PVL lesions is not clear but we could not demonstrate their presence in our samples. This result may suggest that since the tumor is not yet established, the organism do not require pDC. Another explanation could be the small number of the current sample.

According to Savina and Amigorena (2007)<sup>6</sup> cytotoxic activation is crucial for the development of an effective immune response against tumor antigens. Öhman et al (2012)<sup>5</sup> evaluated the role of CD8 and CD4 positive cells in oral leukoplakias with and without dysplasia and oral squamous cell carcinomas (OSCC). Results showed significantly increased numbers of CD8 positive cells in leukoplakias with dysplasia when compared to lesions without dysplasia. Our results, demonstrating an increase in the number of cytotoxic T cells in PVL dysplastic epithelial lesions, corroborate previous published studies and suggesting that the immune response may be active.

This study evaluates for the first time, the role of the immune system in PVL development, but requires further investigation to better understand how the immune response may be involved in the development of the lesion. The expression of CD8 T cells indicates that the immune system is active, however the expression of mature DC suggests that to some

extent it is impaired. We propose that this singular entity may interact differently with the immune cells, perhaps not following the same pattern of malignant transformation as conventional oral leukoplakias.

## References

1. Hansen LS, Olson JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1985;60(3):285-298. doi:10.1016/0030-4220(85)90313-5.
2. Morton TH, Cabay RJ, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: report of three cases. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(5):315-318. doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00499.x.
3. Gouvêa AF, Santos Silva AR, Speight PM, et al. High incidence of DNA ploidy abnormalities and increased Mcm2 expression may predict malignant change in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Histopathology.* 2013;62(4):551-562. doi:10.1111/his.12036.
4. Abadie WM, Partington EJ, Fowler CB, Schmalbach CE. Optimal Management of Proliferative Verrucous Leukoplakia: A Systematic Review of the Literature. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;153(4):504-511. doi:10.1177/0194599815586779.
5. 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. doi:10.1111/j.1365-3083.2012.02701.x.
6. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev.* 2007;219(1):143-156. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x.
7. Esteban F, Ruiz-Cabello F, Gonzalez-Moles MA, Lopez-Gonzalez MA, Funez R, Redondo M. Clinical significance of langerhans cells in squamous cell carcinoma of the larynx. *J Oncol.* 2012. doi:10.1155/2012/753296.
8. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
9. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001;106(3):255-258. doi:10.1016/S0092-8674(01)00449-4.
10. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and



- regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183(1):89-103.  
doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05152.x.
11. Maloth AK, Dorankula SPR, Pasupula AP, Thokala MR, Muddana K, Ramavath R. A Comparative Immunohistochemical Analysis of Langerhans Cells in Oral Mucosa, Oral Lichen Planus and Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(7):ZC76-ZC79. doi:10.7860/JCDR/2015/14170.6235.
  12. Carrard VC, Brouns EREA, van der Waal I. Proliferative verrucous leukoplakia; A critical appraisal of the diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(3). doi:10.4317/medoral.18912.
  13. Kushwah R, Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology.* 2011;133(4):409-419. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03457.x.
  14. Moschos S, Varanasi S, Kirkwood JM. Interferons in the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Res.* 2005;126:207-241. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16209068>.
  15. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2003;63(19):6478-6487.

**FIGURES**

Figure 1. Clinical image showing multiple white lesions in the buccal mucosa, alveolar ridge, floor of the mouth and border of the tongue.

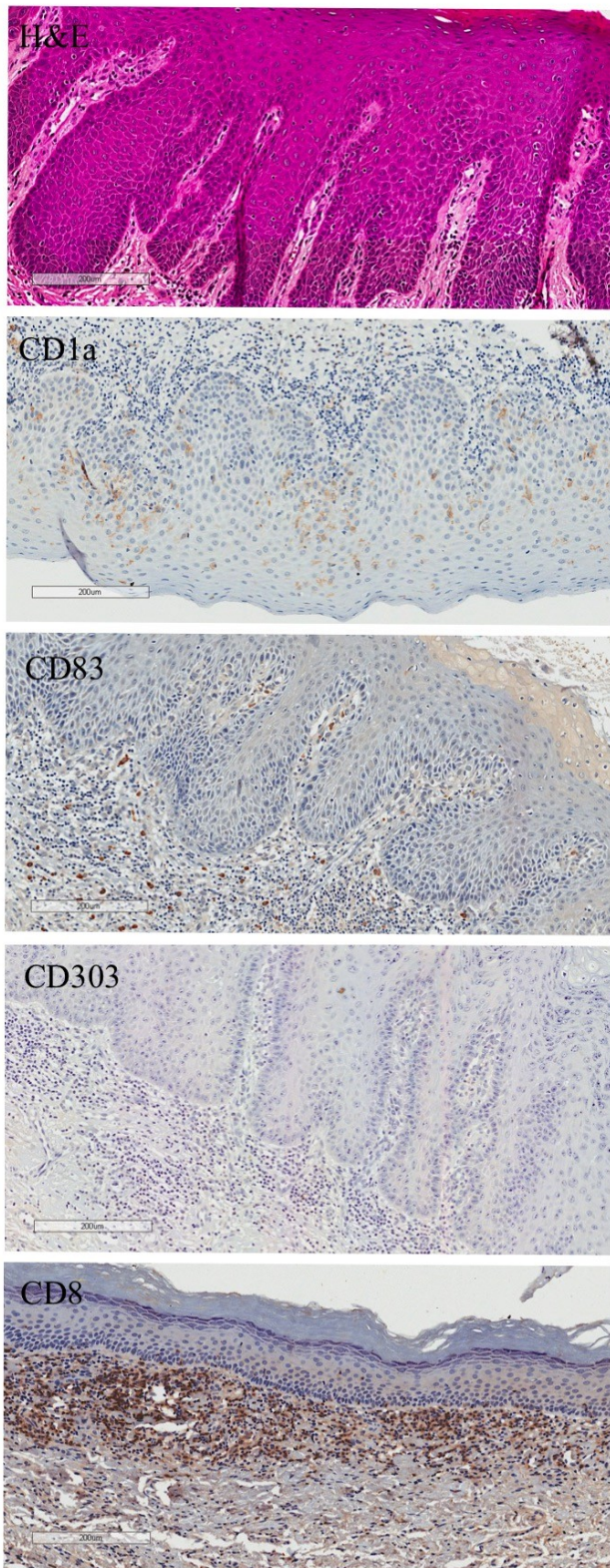


Figure 2. Histological and immunohistochemical panel showing PVL lesion stained for H&E (moderate dysplasia), CD1a (moderate dysplasia), CD83 (severe dysplasia), CD303 (severe dysplasia) and CD8 (mild dysplasia) (100X).

## DISCUSSÃO

O sistema imune desempenha papel importante no microambiente tumoral (Ma et al, 2013). As CD são células apresentadoras de antígeno responsáveis por detectar antígenos tumorais e apresentá-los aos linfócitos dando início a resposta imunológica (Tran Janco et al, 2015). Diversos estudos tem mostrado que pacientes imunocomprometidos estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças malignas devido a alterações no sistema imune (Collett et al, 2010; Grulich et al, 2007). Uma resposta efetiva das células imunes presentes no epitélio é crucial para proteger pele e mucosas de células neoplásicas (Upadhyay et al, 2011). A presença e o papel das CD infiltrando tumores sólidos permanece controverso. Alguns autores mostram correlação negativa com o prognóstico, enquanto outros sugerem correlação positiva (Liao et al, 2015; Ni et al, 2014; Upadhyay et al, 2012; Ishigami et al, 2010; Iwamoto et al, 2003). Liao et al (2015) avaliou a expressão de CD maduras em CEC de esôfago mostrando maior expressão nos tumores e associação com pior prognóstico. Ladányi (2015) analisou o papel das CD em melanomas. Os resultados mostraram que o aumento no número de linfócitos B e T está associado a bom prognóstico. No entanto, a presença de CD plasmocitoides correlacionou-se com pior prognóstico. Rani et al (2015) avaliaram a presença de CDL em 27 casos de displasias epiteliais e 28 casos CEC através da imunomarcagem para o anticorpo S100 concluindo que CDL não funcionantes se acumulam nos tecidos tumorais. O'Donnell et al (2007) sugeriu que falhas na resposta imune, mesmo em casos com alta expressão de CD, pode estar relacionado a baixa efetividade das CD em iniciar uma resposta imune efetiva. Na presente tese avaliamos a presença de CDL imaturas e maduras, CD plasmocitoides e células T em casos de DE, LVP e CEC e correlacionamos esses achados com os dados clínicos. Nossos resultados mostraram uma redução na expressão de CDL maduras no grupo CEC sugerindo que essas células possam ter migrado até os linfonodos para apresentar os antígenos tumorais aos linfócitos e dar início a resposta imune. Além disso, não foram observadas correlações entre a expressão das CD e os dados clínicos.

Diversos sistemas classificatórios foram desenvolvidos para graduar lesões neoplásicas. De acordo com a classificação de Bryne o front de invasão é crucial para determinar o prognóstico da lesão (bryne et al, 1989). Bhargava et al (2010) avaliou as classificações de Broder, Anneroth e Bryne concluindo que as características das áreas invasivas dos tumores estão correlacionadas com o prognóstico da lesão e deveriam nortear o tratamento. Akhter et al (2011) analisou as classificações de Broder e Anneroth concluindo que a classificação de Anneroth pode servir como preditor para comprometimento linfonodal

e metástase. Sawazaki-Calone et al (2015) avaliaram quatro sistemas de classificação: OMS, modelo de risco histológico, sistema de graduação baseado no front de invasão e modelo baseado em ninhos tumorais e front de invasão. Os resultados mostraram que as características do front de invasão estão associadas a um melhor prognóstico. No presente estudo o sistema de classificação de Broder foi utilizado para graduar os casos de CEC. Nossos resultados mostraram maior expressão de CDL maduras em tumores pobremente diferenciados. Apesar do número de CDL imaturas não apresentar significância estatística, o número de células positivas foi discretamente maior nos casos pobremente diferenciados. Dessa forma, sugerimos que o sistema imune parece estar vigilante. No entanto, o principal problema parece estar associado a efetividade da resposta e a capacidade de recrutar e ativar linfócitos T, uma vez que o número de células T CD8 diminui progressivamente das lesões bem diferenciadas para as pobremente diferenciadas.

De acordo com a classificação da OMS os casos de displasia epitelial foram categorizados em lesões com displasia leve, moderada ou severa (Barnes et al, 2005). Classificar essas lesões permanece um desafio devido a variabilidade inter e intra examinador (Speight et al, 2015; Manchanda et al, 2012). Usualmente, é mais fácil diagnosticar lesões leves e severas, enquanto que a classificação de displasias moderadas permanece desafiadora. Diversos sistemas de classificação foram propostos tentando reduzir essas variações (Kujan et al, 2006). Kujan et al (2006) propuseram um sistema de classificação binário, no qual as lesões seriam categorizadas em lesões de baixo e alto risco de malignização baseado em critérios arquiteturais e citológicos. Speight et al (2015) avaliaram o sistema binário mostrando um aumento na concordância diagnóstica na classificação de lesões displásicas. No presente estudo o sistema classificatório utilizado foi o da OMS. Interessantemente, nossos resultados mostram uma diminuição na expressão de CDL e CD plasmocitoides nos casos de displasia severa no grupo DE. Esses achados sugerem a existência de alterações na resposta imunológica conforme o grau de malignização aumenta.

A LVP é uma forma distinta de leucoplasia caracterizada por aumento no risco de transformação maligna (Carrard et al, 2013; Morton et al, 2007). Abadie et al (2016) revisaram 26 artigos científicos compostos por 329 casos de LVP. Os autores encontraram uma taxa de malignização de 63.9%. Owosho et al (2015) descreveram 7 casos de LVP mostrando uma taxa de malignização de 28%. Nossos resultados mostraram padrão de expressão inverso para os anticorpos CD1a e CD83 de acordo com a graduação histológica das lesões. A expressão das CDL imaturas aumenta nos casos de hiperqueratose, seguido de

displasia epitelial leve/moderada e displasia epitelial severa. Já a expressão de CDL maduras, responsáveis por apresentar antígenos aos linfócitos T citotóxicos, diminui nos casos de hiperqueratose, seguido de displasia epitelial leve/moderada e displasia epitelial severa. Esses resultados sugerem que as células imaturas vigilantes estão presentes e parecem funcionais, no entanto após o reconhecimento do antígeno, CDL maduras parecem estar com função diminuída e as células alteradas parecem estar evadindo o sistema de imuno vigilância.

CD303 ou BDCA2 compreendem uma lectina tipo II usada para identificar CD plasmocitoides (Dzionic et al, 2001). CD plasmocitoides residem em órgãos linfoides e não linfoides e sintetizam grandes quantidades de interferon (IFN) tipo I (Kushwah et al, 2011). O IFN tipo I, especialmente o IFN alfa, tem sido usado no tratamento de tumores sólidos devido a sua propriedade antitumoral (Zitvogel et al, 2015; Hartman et al, 2003). Moschos et al (2005) e Hartman et al (2003) sugeriram que apesar de CD plasmocitoides colonizarem os tumores a produção de IFN pode estar severamente afetada. Perez et al (2005) sugeriram que a redução na expressão de CD plasmocitoides está associada a pior prognóstico. O'Donnell et al (2007) mostraram que o aumento na expressão de CD plasmocitoides está associada a pior prognóstico. Nossos resultados mostraram que a expressão de CD plasmocitoides foi significativamente maior no grupo CEC sugerindo que essas células parecem desempenhar papel importante na defesa do organismo contra os tumores. Nos casos de LVP o papel das CD plasmocitoides não está claro e de acordo com nossos achados essas células parecem estar ausentes nessas lesões sugerindo que quando não há tumor estabelecido o organismo ainda não necessita desse tipo celular. Outra explicação poderia ser o reduzido número amostral em nosso trabalho.

Savina & Amigorena (2007) descreveram que uma resposta efetiva contra as células tumorais requer o adequado recrutamento e ativação dos linfócitos T CD8. Portanto, as CD precisam capturar os antígenos, processá-los via CMH tipo I e iniciar a resposta imune citotóxica. Öhman et al (2012) foram um dos primeiros autores a avaliar o papel dos linfócitos T CD8 em leucoplasias orais com e sem displasia, e CEC. Os resultados mostraram aumento significativo no número de linfócitos T CD8 no compartimento epitelial de CEC, seguido de leucoplasias displásicas e leucoplasias não displásicas. No presente estudo a expressão de linfócitos T CD8 não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos DE e CEC. Nossos resultados diferem dos de Öhman et al (2012), uma possível explicação seria o modo de comparação empregado em ambos os trabalhos. Nos casos de LVP a maior

expressão de CD8 ocorreu nos casos de displasia epitelial severa, sugerindo que o sistema imune está ativo.

Conclui-se que o sistema imune desempenha papel importante no desenvolvimento e progressão de LPM para CEC oral. Baseado em nossos achados, as células apresentadoras de antígeno e linfócitos T estiveram presentes em todos os grupos estudados. O aumento da expressão das CD plasmocitoides em CECs sugere que essas células parecem desempenhar papel importante na defesa do organismo contra os tumores. Esse é um dos primeiros estudos a investigar o papel do sistema imunológico em casos de LVP. A expressão de linfócitos T CD8 sugere que o sistema imune está ativo, porém com falhas devido a expressão de CDL maduras. O papel da resposta imune em LVP requer novas investigações para melhor compreensão do tópico. Finalmente, além das CDs estudadas seria interessante elucidar por completo as funções e formas de ativação dos demais subtipos caracterizados de CD nos casos de CEC, DE e LVP.

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que:

- O grupo DE oral apresentou maior expressão de CDL maduras em relação ao grupo CEC.
- A expressão de CD plasmocitoides foi menor no grupo CEC quando comparado ao grupo DE sugerindo que essas células desempenhem papel importante na defesa do organismo contra os tumores.
- No grupo LVP a expressão de CDL imaturas e maduras apresentou comportamento inverso para os anticorpos CD1a e CD83. CDL imaturas estão em maior número nas lesões de displasia epitelial severa e CDL maduras estão em maior número nas lesões de hiperqueratose. Sugerindo que existe a possibilidade de perda parcial de efetividade do sistema imune, uma vez que as células responsáveis por apresentar os antígenos aos linfócitos T apresentam menor expressão nas lesões displásicas severas.
- Em todos os grupos analisados foi possível detectar a expressão de linfócitos T CD8. No grupo LVP a alta expressão de CD8 está associada a forma mais severa da lesão sugerindo que o sistema imune está recrutando linfócitos. Nos grupos DE e CEC não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.
- A expressão positiva de CD e células T no grupo CEC não representa necessariamente uma resposta imunológica efetiva, sendo necessária a realização de mais estudos para a elucidação do status dessa resposta.
- Na amostra analisada não foi possível encontrar associação estatística significativa entre a expressão dos anticorpos e os dados clínicos.



## REFERENCIAS<sup>1</sup>

- Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuybaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol.* 2007 Mar;37(3):686-95.
- Abadie WM, Partington EJ, Fowler CB, Schmalbach CE. Optimal Management of Proliferative Verrucous Leukoplakia: A Systematic Review of the Literature. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015 Oct;153(4):504-11. doi: 10.1177/0194599815586779.
- Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011;15(2):168-176. doi:10.4103/0973-029X.84485.
- Almangush A, Coletta RD, Bello IO, Bitu C, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Feb;44(2):143-50. doi: 10.1016/j.ijom.2014.10.004.
- Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987 Jun;95(3):229-49.
- Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol.* 2010 Jun; 46(6):414-7.
- Bagan J, Scully C, Jimenez Y, Martorell M. Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. *Oral Dis.* 2010; 16(4):328-32.
- Bagan L, Sáez GT, Tormos MC, Labaig-Rueda C, Murillo-Cortes J, Bagan JV. Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. *Clin Oral Investig.* 2016 May;20(4):737-43. doi: 10.1007/s00784-015-1551-z.

---

<sup>1</sup>\*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors – Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:767-811.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392:245-52.
- Banoczy J, Csiba A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1976 Dec;42(6):766-74.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky E. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
- Bhargava A, Saigal S, Chalishazar M. Histopathological Grading Systems In Oral Squamous Cell Carcinoma : A Review. *J Int Oral Heal*. 2010;2(4):1-10.
- Bingle L, Wilson K, Musa M, Araujo B, Rassl D, Wallace WA, et al. BPIFB1 (LPLUNC1) is upregulated in cystic fibrosis lung disease. *Histochem Cell Biol*. 2012 Nov;138(5):749-58. doi: 10.1007/s00418-012-0990-8.
- Boiocchi L, Lonardi S, Vermi W, Fisogni S, Facchetti F. BDCA-2 (CD303): a highly specific marker for normal and neoplastic plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2013 Jul;122(2):296-7. doi: 10.1182/blood-2013-05-500413.
- Bouquot JE. Oral verrucous carcinoma. Incidence in two US populations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Sep; 86:318-324.
- Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*. 2005 Feb;29(2):167-78.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de Incidência de Câncer de Boca. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 15 março 2013.

Brigl M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:817-90.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 1989;18(8):432-437. doi:10.1111/j.1600-0714.1989.tb01339.x.

Cabay RJ, Morton TH Jr, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2007 May;36(5):255-61.

Carrard VC, Brouns EREA, van der Waal I. Proliferative verrucous leukoplakia; A critical appraisal of the diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(3). doi:10.4317/medoral.18912.

Carrard VC, Pires AS, Mendez M, Mattos F, Moreira JC, Sant'Ana Filho M. Effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment on oxidative stress parameters in rats tongue. *Food Chem Toxicol*. 2009 Jun;47(6):1058-63. doi:10.1016/j.fct.2009.01.033.

Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck*. 2004 Jan;26(1):31-8.

Cerero-Lapiedra R, Baladé-Martínez D, Moreno-López LA, Esparza-Gómez G, Bagán JV. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010 Nov 1;15(6):e839-45.

Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin*. 2015 Sep-Oct;65(5):401-21. doi: 10.3322/caac.21293.

Collett D, Mumford L, Banner NR, Neuberger J, Watson C. Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: A UK registry audit. *Am J Transplant*. 2010;10(8):1889-1896. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03181.x.

Costa NL, Gonçalves AS, Martins AF, Arantes DA, Silva TA, Batista AC. Characterization of dendritic cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2015 Oct. doi: 10.1111/jop.12380.

Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PV, Liyanage RL, Dias KD, Tilakaratne WM. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Apr; 113(4):518-25. doi: 10.1016/j.oooo.2011.11.001.

Doshi NP, Shah SA , Patel KB , Jhabuawala MF. Histological grading of oral cancer: a comparison of different systems and their relation to lymph node metastasis. *Nat J Community Med*. 2011; 2(1):136-142.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991-8.

Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol*. 2010; 2010:701657. doi: 10.1155/2010/701657.

Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*. 2001;194(12):1823-1834.

Esteban F, Ruiz-Cabello F, Gonzalez-Moles MA, Lopez-Gonzalez MA, Funez R, Redondo M. Clinical significance of langerhans cells in squamous cell carcinoma of the larynx. *J Oncol*. 2012; 2012:753296. doi: 10.1155/2012/753296.

Fleskens SA, Bergshoeff VE, Voogd AC, van Velthuysen ML, Bot FJ, Speel EJ, et al. Interobserver variability of laryngeal mucosal premalignant lesions: a histopathological evaluation. *Mod Pathol*. 2011 Jul;24(7):892-8. doi: 10.1038/modpathol.2011.50.

Fujita H, Suárez-Fariñas M, Mitsui H, Gonzalez J, Bluth MJ, Zhang S, et al. Langerhans cells from human cutaneous squamous cell carcinoma induce strong type 1 immunity. *J Invest Dermatol*. 2012 Jun;132 (6):1645-55. doi: 10.1038/jid.2012.34.

Gallo O, Libonati GA, Gallina E, Fini-Storchi O, Giannini A, Urso C, et al. Langerhans cells related to prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1991 Sep;117(9):1007-10.

Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008 Jan 1;122(1):155-64.

Goldman SA, Baker E, Weyant RJ, Clarke MR, Myers JN, Lotze MT. Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Jun;124(6):641-6.

Gomes JO, de Vasconcelos Carvalho M, Fonseca FP, Gondak RO, Lopes MA, Vargas PA. CD1a+ and CD83+ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2015 Dec 12. doi: 10.1111/jop.12389.

Gonçalves AS, Costa NL, Arantes DA, de Cássia Gonçalves Alencar R, Silva TA, Batista AC. Immune response in cervical lymph nodes from patients with primary oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2013 Aug;42(7):535-40. doi: 10.1111/jop.12039.

Gondak RO, Alves DB, Silva LF, Mauad T, Vargas PA. Depletion of Langerhans cells in the tongue from patients with advanced-stage acquired immunodeficiency syndrome: relation to opportunistic infections. *Histopathology*. 2012 Feb;60(3):497-503. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04068.x.

Gondak RO, Mauad T, Almeida OP, Vargas PA. Reduced number of CD1a+ and CD83+ interstitial dendritic cells in herpetic lesions (HSV-1+) of the tongue in patients with advanced-stage AIDS. *Histopathology*. 2013 Oct;63(4):595-8. doi: 10.1111/his.12196.

Gooi Z, Chan JY, Fakhry C. The epidemiology of the human papillomavirus related to oropharyngeal head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2016 Feb 4. doi: 10.1002/lary.25767.

Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Tumor-induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Feb;19(1):65-77.

Gouvêa 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 Sep 1;15(5):e704-8.

Gouvêa AF, Santos Silva AR, Speight PM, Hunter K, Carlos R, Vargas PA, et al. High incidence of DNA ploidy abnormalities and increased Mcm2 expression may predict malignant change in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Histopathology*. 2013 Mar;62(4):551-62. doi: 10.1111/his.12036.

Gouvêa AF, Vargas PA, Coletta RD, Jorge J, Lopes MA. Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2010 Jul;39(6):447-52. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00889.x.

Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*. 2007;370(9581):59-67. doi:10.1016/S0140-6736(07)61050-2.

Gueiros LA, Gondak R, Jorge Júnior J, Coletta RD, Carvalho Ade A, Leão JC, et al. Increased number of Langerhans cells in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 May;113(5):661-6. doi:10.1016/j.oooo.2011.12.008.

Hansen LS, Olson JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1985;60(3):285-298. doi:10.1016/0030-4220(85)90313-5.

Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2003;63(19):6478-6487. doi:10.1007/s00262-009-0758-8.

Ishigami S, Ueno S, Matsumoto M, et al. Prognostic value of CD208-positive cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(3):389-395. doi:10.1007/s00262-009-0758-8.

Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2003;104(1):92-97. doi:10.1002/ijc.10915.

Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Mårtensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol*. 1973 Feb;12(1):1-8.

Karakök M, Bayazit YA, Ucak R, Ozer E, Kanlikama M, Mumbuc S, et al. Langerhans cell related inflammatory reaction in laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2003 Feb;30(1):81-4.

Klatka J, Grywalska E, Tabarkiewicz J, Polak A, Rolinski J. Dendritic cell subsets in neoplastic tissue and peripheral blood of laryngeal cancer patients: relation with grade and stage of the disease. *Oncol Rep.* 2012 Jul;28(1):207-17. doi: 10.3892/or.2012.1754.

Kramer IR, Lucas RB, Pindborg, JJ, Sobin LH. WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral pre-cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978 Oct;46(4):518-39.

Kuffer J, Lombardi S. Reconsideration oral risk lesions. *Oral Dis* 2002;38:302-7.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006;42(10):987-993. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.12.014.

Kurihara K, Hashimoto N. The pathological significance of Langerhans cells in oral cancer. *J Oral Pathol.* 1985 Apr;14(4):289-29.

Kushwah R, Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology.* 2011;133(4):409-419. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03457.x.

Ladányi A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(5):490-500. doi:10.1111/pcmr.12371.

Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jan;1183:89-103. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05152.x.

Lasisi TJ, Oluwasola AO, Lasisi OA, Akang EE. Association between langerhans cells population and histological grade of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2013 Sep;17(3):329-33. doi: 10.4103/0973-029X.125177.



Liao X, Chen Y, Liu D, Li F, Li X, Jia W. High Expression of LAMP3 Is a Novel Biomarker of Poor Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):17655-17667. doi:10.3390/ijms160817655.

Liu W, Shi LJ, Wu L, Feng JK, Yang X, Li J, et al. Oral Cancer Development in Patients with Leukoplakia – Clinicopathological Factors Affecting Outcome. *PLoS One*. 2012;7(4):e34773. doi: 10.1371/journal.pone.0034773.

Lopes MA, Feio P, Santos-Silva AR, Vargas PA. Proliferative verrucous leukoplakia may initially mimic lichenoid reactions. *World J Clin Cases*. 2015 Oct 16;3(10):861-3. doi: 10.12998/wjcc.v3.i10.861.

Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Mar;79(3):321-9.

Ma Y, Shurin G V., Peiyuan Z, Shurin MR. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *J Cancer*. 2013;4(1):36-44. doi:10.7150/jca.5046.

Maloth AK, Dorankula SP, Pasupula AP, Thokala MR, Muddana K, Ramavath R. A Comparative Immunohistochemical Analysis of Langerhans Cells in Oral Mucosa, Oral Lichen Planus and Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res*. 2015 Jul;9(7):ZC76-9. doi: 10.7860/JCDR/2015/14170.6235.

Manchanda A, Shetty DC. Reproducibility of grading systems in oral epithelial dysplasia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(6). doi:10.4317/medoral.17749.

Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Apr;15(4):774–81.

Mellman I, Steinman RM.

Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):255-8.

Morton TH, Cabay RJ, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: report of three cases. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(5):315-318. doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00499.x.

Moschos S, Varanasi S, Kirkwood JM. Interferons in the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Res*. 2005;126:207-241. Perez L, Shurin MR, Collins B, Kogan D, Tourkova IL SG. Comparative analysis of CD1a, S-100, CD83, and CD11c human dendritic cells in normal, premalignant, and malignant tissues. *Histol Histopathol*. 2005;20(4):1165-1172.

Nair DR, Pruthy R, Pawar U, Chaturvedi P. Oral cancer: Premalignant conditions and screening - an update. *J Cancer Res Ther*. 2012 Jan;8(1):S57-66. doi: 10.4103/0973-1482.92217.

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002 Jul-Aug;52(4):195-215.

Ni Y-H, Huang X-F, Ding L, Wang Z-Y, Hu Q-G, Hou Y-Y. Accumulation of CD208+ Mature Dendritic Cells Does Not Correlate With Survival Time in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(11):2178-2185. doi:10.1016/j.joms.2014.04.038.

Noone RB, Bonner H Jr, Raymond S, Brown AS, Graham WP, Lehr HB. Lymph node metastases in oral carcinoma. A correlation of histopathology with survival. *Plast Reconstr Surg*. 1974; 53:158-66.

O'Donnell RK, Mick R, Feldman M, Hino S, Wang Y, Brose MS MR.

Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. *Cancer Lett.* 2007;255(1):145-152.

Ohad H, Jacob S, Aviram M, Ciuraru NB, Lea RW. The Role of Dendritic Cells in Primary and Metastatic Head and Neck Tumors. *Medical Connections.* 2012; 1:55-8.

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. doi:10.1111/j.1365-3083.2012.02701.x.

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 Jan;35(1):311-7.

Owosho AA, Bilodeau EA SK. 7 Cases of Proliferative Verrucous Leukoplakia: The Need for a High Clinical Suspicion Among Dental Practitioners. *Pa Dent J (Harrisb).* 2015;82(1):26-31.

Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin.* 2005 Jul-Aug; 55(4):242-58; quiz 261-2, 264.

Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003 Dec;39(8):770-80.

Rani SV, Aravindha B, Leena S, Balachander N, Malathi LK, Masthan MK. Role of abnormal Langerhans cells in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A pilot study. *J Nat Sci Biol Med.* 2015 Aug;6(Suppl 1):S128-33. doi: 10.4103/0976-9668.166120.

Reidy J, McHugh E, Stassen LF. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon.* 2011 Oct; 9(5):278-83.

Rinker MH, Fenske NA, Scalf LA, Glass LF. Histologic variants of squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Control*. 2001 Jul-Aug;8(4):354-63.

Rock J, Schneider E, Grun JR, Grutzkau A, Kuppers R, Schmitz J, et al. CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLC  $\gamma$ 2. *Eur. J. Immunol*. 2007. 37: 3564–3575.

Sakakura K, Chikamatsu K, Takahashi K, Whiteside TL, Furuya N. Maturation of circulating dendritic cells and imbalance of T-cell subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother*. 2006 Feb;55(2):151-9.

Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev*. 2007;219(1):143-156. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x.

Sawazaki-Calone I, Rangel A, Bueno A, et al. The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis*. 2015;21(6):755-761. doi:10.1111/odi.12343.

Scully C, Felix DH. Oral medicine update for the dental practitioner. Oral cancer. *Br Dent J*. 2006 Jan 14;200(1):13-7.

Sharma N, Hosmani JV, Tiwari V. Epithelial dysplasia: Different grading system and its applications. *J Int Oral Health* 2010;2(1):1-16.

Shevchuk Z, Filip A, Shevchuk V, Kashuba E. Number of Langerhans cells is decreased in premalignant keratosis and skin cancers. *Exp Oncol*. 2014 Mar;36(1):34-7.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015 Jan-Feb;65(1):5-29. doi: 10.3322/caac.21254.

Smith CJ, Pindborg JJ. Histological grading of oral epithelial atypia by the use of photographic standards. Copenhagen: C. Hamburgers Bogtrykkeri; 1969.

Speight PM, Abram TJ, Floriano PN, et al. Interobserver agreement in dysplasia grading: toward an enhanced gold standard for clinical pathology trials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120(4):474-482.e2. doi:10.1016/j.oooo.2015.05.023.

Speight PM. Update on Oral Epithelial Dysplasia and Progression to Cancer. *Head Neck Pathol*. 2007 Sep;1(1):61-6. doi: 10.1007/s12105-007-0014-5.

Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007 Sep 27;449(7161):419-26.

Steinman RM, Cohn ZA. Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med*. 1973. 137: 1142-1162. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):5-25.

Stoeckli SJ, Broglie MA. Recent innovations in head and neck oncology: a report from the ICHNO. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013 May;13(5):535-9. doi: 10.1586/era.13.36.

Tilakaratne WM, Sherriff M, Morgan PR, Odell EW. Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features. *J Oral Pathol Med*. 2011 Aug;40(7):533-40. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01033.x.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar;65(2):87-108. doi: 10.3322/caac.21262.

Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells in Cancer Pathogenesis. *J Immunol*. 2015;194(7):2985-2991. doi:10.4049/jimmunol.1403134.

Upadhyay J, Rao NN, Upadhyay RB. A comparative analysis of langerhans cell in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma using antibody CD-1a. *J Cancer Res Ther*. 2012;8(4):591-597. doi:10.4103/0973-1482.106565.

Upadhyay RB, Upadhyay J, Rao NN, Agrawal P. The role of Langerhans cells in oral squamous cell carcinoma. *Chinese-German J Clin Oncol*. 2011;10(10):606-611.

doi:10.1007/s10330-011-0846-z.

van der Waal I, Reichart PA. Oral proliferative verrucous leukoplakia revisited. *Oral Oncol*. 2008 Aug;44(8):719-21.

van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):317-23. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.016.

Vermi W, Lonardi S, Morassi M, Rossini C, Tardanico R, Venturini M, et al. Cutaneous distribution of plasmacytoid dendritic cells in lupus erythematosus. Selective tropism at the site of epithelial apoptotic damage. *Immunobiology*. 2009;214(9-10):877-86. doi: 10.1016/j.imbio.2009.06.013.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007 Nov;36(10):575-80.

Younes MS, Robertson EM, Bencosme SA. Electron microscope observations on Langerhans cells in the cervix. *Am J Obstet Gynecol*. 1968 Oct 1;102(3):397-403.

Young MR. Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault. *Head Neck*. 2006 May;28(5):462-70.

Zerdoner D. The Ljubljana classification - its application to grading oral epithelial hyperplasia. *J Craniomaxillofac Surg*. 2003 Apr;31(2):75-9.

Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(7):405-414. doi:10.1038/nri3845.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):715-27.

Zygianni AG, Kyrgias G, Karakitsos P, Psyrri A, Kouvaris J, Kelekis N, et al.  
Oral squamous cell cancer: Early detection and the role of alcohol and smoking. *Head Neck Oncol.* 2011 Jan 6;3:2. doi: 10.1186/1758-3284-3-2.

## ANEXOS

### Anexo 1

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise da expressão de células dendríticas, células de langerhans e células t em lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular de boca**", protocolo nº 086/2013, dos pesquisadores Ana Carolina Amorim Pellicoli, Jacks Jorge Junior, Marcondes Sena Filho e Pablo Agustin Vargas, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 09/10/2013.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "**Analysis of the expression of dendritic, langerhans and t cells in potentially malignant lesions and oral squamous cell carcinoma**", register number 086/2013, of Ana Carolina Amorim Pellicoli, Jacks Jorge Junior, Marcondes Sena Filho and Pablo Agustin Vargas, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Oct 09, 2013.

**Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado**  
 Secretário  
 CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta**  
 Coordenadora  
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.



## Anexo 2

Confirmação de submissão do artigo científico realizada em 16 de Setembro de 2016.

**De:** "OOOO (Triple O) journal" <[ees.tripleo.0.3c08af.58b8fb2a@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.tripleo.0.3c08af.58b8fb2a@eesmail.elsevier.com)>

**Assunto:** A manuscript number has been assigned: TRIPLEO-D-16-01091

**Data:** 16 de setembro de 2016 14:48:12 BRT

**Para:** [pavargas@fop.unicamp.br](mailto:pavargas@fop.unicamp.br), [pabloagustinvargasbr@yahoo.com](mailto:pabloagustinvargasbr@yahoo.com)

Ms. Ref. No.: TRIPLEO-D-16-01091

Title: Expression of dendritic cells and T cells in oral proliferative verrucous leukoplakia  
Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology

Dear Dr. Vargas,

Your submission entitled "Expression of dendritic cells and T cells in oral proliferative verrucous leukoplakia" has been assigned the following manuscript number: TRIPLEO-D-16-01091.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/tripleo/>.

Your username is: [pavargas@fop.unicamp.br](mailto:pavargas@fop.unicamp.br)

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/tripleo/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/tripleo/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Mark W. Lingen, DDS, PhD, FRCPath  
Editor-in-Chief  
Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology  
<http://www.oooojournal.net/>