

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Débora Cury Veloso Bosco Nery

**AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO MALIGNA E CORRELAÇÃO DE FATORES
CLÍNICO-PATOLÓGICOS COM A EXPRESSÃO DE FOXP3 EM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS DE BOCA: Estudo retrospectivo de 15 anos**

Belo Horizonte

2022

Débora Cury Veloso Bosco Nery

**AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO MALIGNA E CORRELAÇÃO DE FATORES
CLÍNICO-PATOLÓGICOS COM A EXPRESSÃO DE FOXP3 EM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS DE BOCA: Estudo retrospectivo de 15 anos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração: Clínicas Odontológicas, Área Temática: Estomatologia.
Linha de Pesquisa: Biologia Oral.

Orientadora: Prof. Dra. Giovanna Ribeiro Souto

Belo Horizonte

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

N456a Nery, Débora Cury Veloso Bosco
Avaliação da progressão maligna e correlação de fatores clínico-patológicos com a expressão de FOXP3 em lesões potencialmente malignas de boca: estudo retrospectivo de 15 anos / Débora Cury Veloso Bosco Nery. Belo Horizonte, 2022.
56 f. : il.

Orientadora: Giovanna Ribeiro Souto

Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia

1. Mucosa bucal. 2. Patologia bucal. 3. Histopatologia. 4. Boca - Tumores. 5. Leucoplasia bucal. 6. Leucoplasia bucal. 7. Diagnóstico de laboratório. 8. Epidemiologia. I. Souto, Giovanna Ribeiro. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.31-006.6

Débora Cury Veloso Bosco Nery

AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO MALIGNA E CORRELAÇÃO DE FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS COM A EXPRESSÃO DE FOXP3 EM LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS DE BOCA: Estudo retrospectivo de 15 anos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínicas Odontológicas – Área Temática: Estomatologia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca – UFMG
- 2- Profa. Dra. Vânia Eloísa de Araújo Silva – PUC Minas
- 3- Profa. Dra. Giovanna Ribeiro Souto – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 30 de março de 2022

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Profa. Dra. Giovanna Ribeiro Souto
Orientadora

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

AGRADECIMENTO

À Deus por estar presente sempre em todos os momentos em minha vida.

À minha família que sempre me incentivou, principalmente meus pais que nunca mediram esforços para acreditar em mim e pelo apoio incondicional.

Ao Pedro, meu parceiro de vida, que me apoia de forma inexplicável, me encoraja a encarar meus sonhos e compreendeu minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

À minha filha, Kissi, que me inspira a ser exemplo, e me torna diariamente uma pessoa melhor.

À Giovanna, que foi um presente do mestrado na minha vida. Admiração, exemplo, respeito e gratidão definem meu sentimento por esta profissional e pessoa maravilhosa. Obrigada por me ensinar sempre, pela paciência e confiar no meu trabalho.

À Reni e Andréa que colaboraram e contribuíram para que tudo acontecesse da forma mais correta e tranquila.

Às alunas Maria Clara, Isabela e Camila que foram fundamentais para caminharmos e evoluirmos nesta pesquisa. Juntas somos muito mais fortes.

Existem muitos colaboradores que não foram citados aqui, e que contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento deste trabalho.

A MINHA GRATIDÃO.

RESUMO

A prevalência das lesões potencialmente malignas (LPM) da mucosa oral pode sofrer influências de condições naturais da população o do estilo de vida. Além disso, os fatores que afetam a transformação maligna das lesões ainda são pouco entendidos. Estudos sugerem que o aparecimento e a progressão do câncer podem estar relacionados à supressão da resposta anti-tumoral de populações de células T regulatórias (Treg) que podem ser identificadas pelo marcador FOXP3. O objetivo do estudo é realizar um levantamento epidemiológico de lesões potencialmente malignas no serviço de patologia oral e maxilofacial da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) em um período de 15 anos. Além de avaliar as características clínicas e histopatológicas dessas lesões, as características das lesões que evoluíram para lesões malignas, realizar o acompanhamento clínico-patológico das amostras de LPM diagnosticadas e correlacionar a expressão de FOXP3 em amostras de LPM com características clínicas e histopatológicas. Um total de 740 biópsias de pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia foram realizadas no período de 2007 a 2022, representando 6,1% dos diagnósticos. A leucoplasia foi a lesão mais comum (88,6%), em ambos os sexos, com média de idade de 55,7±14,0 anos. A maioria dos pacientes eram fumantes (46,4%), apresentavam lesões únicas (65%), menor ou igual a 2 cm (72%) e localizadas em regiões de baixo risco de transformação maligna (66,2%). O principal diagnóstico histopatológico foi de displasia epitelial leve (37,7%) e 2,8% da amostra obteve-se o diagnóstico de carcinoma in situ. A transformação maligna foi observada em 1,1% da amostra, na maioria mulheres, com média de idade de 64±15,3 anos, com diagnóstico clínico de leucoplasias, localizadas principalmente na borda lateral de língua de pacientes fumantes. Observou-se uma baixa adesão às consultas de acompanhamento clínico. Na análise imuno-histoquímica, observou-se aumento significativo da expressão de células T reg FOXP3+ nas amostras de leucoplasia de indivíduos fumantes quando comparados as amostras de mucosa normal ($P<0.05$), aumento significativo nas amostras de indivíduos do sexo feminino ($P<0.05$) e nas amostras graduadas como displasia epitelial severa quando comparadas às amostras de displasia epitelial moderada ($P<0.05$). Conclui-se que a leucoplasias é a LPM mais comum, principalmente em fumantes e a maioria das lesões apresentam baixo risco de transformação maligna. Fatores clínicos, histopatológicos e moleculares parecem estar associados com maior risco de transformação maligna.

Palavras-chave: Leucoplasia oral. Lesões potencialmente malignas. FOXP3 protein. Transformação maligna.

ABSTRACT

The prevalence of potentially malignant lesions (PML) of the oral mucosa may be influenced by natural conditions of the population or lifestyle. Moreover, the factors that affect the malignant transformation of the lesions are still not understood. Studies suggest that the onset and progression of cancer may be related to the suppression of the anti-tumor response of regulatory T-cell populations (Treg) that can be identified by the FOXP3 marker. The aim of this study is to conduct an epidemiological survey of potentially malignant lesions in the oral and maxillofacial pathology service of the Pontifical Catholic University of Minas Gerais (PUC Minas) over a period of 15 years. In addition, the clinical and histopathological characteristics of these lesions, the characteristics of the lesions related with malignant lesions, performing clinical-pathological follow-up of diagnosed PML samples and correlating FOXP3 expression in PML samples with clinical and histopathological characteristics were evaluated. A total of 740 biopsies of patients with clinical and histopathological diagnosis of leukoplakia, erythroplakia and leukoerythroplakia were performed from 2007 to 2022, representing 6.1% of the diagnoses. Leukoplakia was the most common lesion (88.6%) in both sexes, with a mean age of 55.7 ± 14.0 years. Most patients were smokers (46.4%), had single lesions (65%), less than or equal to 2cm (72%) and located in regions at low risk of malignant transformation (66.2%). The main histopathological diagnosis was mild epithelial dysplasia (37.7%) and 2.8% of the sample was diagnosed with carcinoma *in situ*. Malignant transformation was observed in 1.1% of the sample, in most women, with a mean age of 64 ± 15.3 years, with clinical diagnosis of leukoplakia, located mainly on the lateral edge of the tongue of smoking patients. Low access to clinical follow-up visits was observed. In the immunohistochemical analysis, a significant increase in the FOXP3+ cell expression was observed in samples of leukoplakia of smokers when compared to samples of normal mucosa ($P < 0.05$), a significant increase in samples of female individuals ($P < 0.05$) and in samples graded as severe epithelial dysplasia when compared to samples of moderate epithelial dysplasia ($P < 0.05$). It is concluded that leukoplakia is the most common PML, especially in smokers and most lesions present a low risk of malignant transformation. Clinical, histopathological and molecular factors seem to be associated with a higher risk of malignant transformation.

Keywords: Oral leukoplakia. Potentially malignant lesions. FOXP3 protein. Malignant transformation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Prevalência de LPM da cavidade oral	13
1.2 Índice de transformação maligna de LPM da cavidade oral	14
1.3 Marcadores moleculares para diagnóstico e tratamento de LPM da cavidade oral..	15
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é o câncer de boca mais comum e geralmente se desenvolve a partir de lesões potencialmente malignas (LPM) como leucoplasias, eritroplasias e leucoeritroplasias (GALBIATTI *et al.*, 2013; McDOWELL, 2006; PULTE; BRENNER, 2010). O CCE é uma causa significativa de morbidade e mortalidade no mundo todo (PULTE; BRENNER, 2010). As taxas de sobrevida em cinco anos de câncer oral e orofaríngeo são de aproximadamente 50%. A maioria dos pacientes vive pouco tempo após o diagnóstico (EPSTEIN *et al.*, 2008). O estágio da doença no momento do diagnóstico afeta as taxas de sobrevivência. Na cavidade bucal, a sobrevida no estágio I é de 70%, enquanto para o estágio IV, essa taxa cai para 30% (TIWANA *et al.*, 2014) mostrando a importância do diagnóstico precoce dessas lesões ou o diagnóstico e tratamento de lesões com potencial de transformação maligna.

1.1 Prevalência de LPM da cavidade oral

As LPM da mucosa bucal são lesões heterogêneas e a prevalência geral mundial das lesões tem sido recentemente estimada em um estudo de revisão sistemática em cerca de 4,5% entre adultos. As lesões foram observadas principalmente em homens e a prevalência variou em diferentes regiões geográficas, com alta prevalência em populações da América Central/Sul (3,9%) e da Ásia (10,5%) (MELLO *et al.*, 2018).

Considerando a prevalência de subtipos clínicos de LPM, observa-se uma prevalência de 4,11% para leucoplasias oral (MELLO *et al.*, 2018). Os dados de prevalência observados neste estudo foram maiores do que uma revisão sistemática publicada em 2003 que encontrou prevalência de 1,43% (PETTI, 2003). Esta diferença possivelmente está relacionada com a inclusão de dados de populações de centros de referência para tratamento de leucoplasias oral no estudo de Mello *et al.* (2018), enquanto no estudo de Petti (2003) foram incluídos apenas dados de estudos que não utilizaram informações de centros especializados em leucoplasias oral. A prevalência geral observada para outras LPM foi de 4,96% para fibrose oral submucosa, 2,08% para queilite actínica e 0,17% eritroplasia (MELLO *et al.*, 2018).

As LPM são diagnosticadas em pacientes na maioria das vezes acima de 50 anos e os homens foram mais afetados do que as mulheres (MELLO *et al.*, 2018). Os homens são considerados mais expostos aos fatores de risco do câncer bucal, como tabagismo, bebida e luz solar (para câncer labial) (SABA *et al.*, 2011). No entanto, diferenças no consumo de tabaco e

álcool entre homens e mulheres tem diminuído principalmente em países desenvolvidos. Dessa forma, a prevalência de lesões pode ser afetada por diferenças culturais no consumo de fatores de risco pela população estudada (WARNAKULASURIYVA, 2009). No Brasil, a prevalência de hábitos de risco pode variar dependendo da região do país. Populações que vivem no interior dos estados são esperados apresentarem maiores índices de consumo de tabaco e álcool do que aquelas que vivem em metrópoles (BARROS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2011).

Estudos de base populacional para avaliar a prevalência de LPM no Brasil são escassos. Um estudo que avaliou a prevalência e os fatores de risco para LPM em indivíduos acima de 40 anos foi realizado em uma população de uma cidade de médio porte do semi-árido nordestino, em Pernambuco. Após cálculo amostral, considerando uma prevalência de 10,5% de LPM, uma amostra de 314 indivíduos foi avaliada. A população era composta de 69,4% de mulheres, 62,2% cor parda, 58% eram fumantes ou ex-fumantes e 62% consumiam ou já consumiram bebidas alcoólicas. Após exame da cavidade oral, observou-se uma prevalência de 7,6% de LPM entre os indivíduos avaliados, a maioria leucoplasias (74%) e as demais eritroplasia. A prevalência foi significativamente maior em pacientes negros, que consumiam bebidas alcoólicas ou consumiam ambos álcool e cigarro (MARTINS-DE-BARROS *et al.*, 2021).

Em países da América Latina e Caribe, estudos de prevalência de lesões são limitados, incluindo geralmente apenas leucoplasias e eritroplasias. Adicionalmente, estudos de base populacional que confirmam o diagnóstico histologicamente também são limitados (MELLO *et al.*, 2018). O conhecimento da prevalência e do perfil de distribuição das LPM na população de risco é fundamental para estabelecer políticas públicas de controle e prevenção (MARTINS-DE-BARROS *et al.*, 2021).

1.2 Índice de transformação maligna de LPM da cavidade oral

As LPM mais comuns encontradas clinicamente são leucoplasia, líquen plano, reação liquenoide oral, fibrose submucosa oral, leucoplasia verrucosa proliferativa e eritroplasia (GANESH *et al.*, 2018). O índice de transformação maligna é variável de acordo com o subtipo clínico. Em uma revisão sistemática observou-se um índice de transformação maligna geral de 7,9%. Variando de 1,4% para o líquen plano a 49,5% para leucoplasia verrucosa proliferativa. A leucoplasia oral, considerada a LPM mais comum da cavidade oral, apresentou um índice de 8,6%. Enquanto a eritroplasia, este índice chegou a 33%. Estes dados corroboram com outros

estudos da literatura e mostra que a progressão maligna é sempre uma possibilidade que deve ser considerada no seguimento clínico desses pacientes (IOCCA *et al.*, 2020).

Um estudo multicêntrico, retrospectivo, realizado no Brasil em um período de 10 anos, em três centros de diagnóstico avaliou 148 amostras de leucoplasia oral com diagnóstico de transformação maligna. Observou-se um índice de transformação maligna de 8,8% com uma média de acompanhamento de 44 meses. A maioria dos pacientes eram mulheres (56%), com média de idade de 60 anos, com a maioria das lesões entre 50 e 60 anos. Os principais sítios afetados foram língua (34%), seguido de áreas multifocais (19,6%), palato (14,2%), mucosa jugal (14,2%), rebordo alveolar (6,8%), gengiva (6%), e assoalho bucal (4,7%). A maioria dos pacientes eram não fumantes (53,4%) e apresentavam lesões com apresentação clínica não-homogênea (39,9%). Embora alguns estudos mostraram maior risco de transformação maligna para lesões com mais de 2cm², não se observou relação da transformação maligna com o tamanho das lesões (CERQUEIRA *et al.*, 2021).

Estudos utilizando o sistema de graduação histopatológica proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que altos graus de displasia estão associados com maior risco de transformação maligna (GANDARA-VILA *et al.*, 2018; IOCCA *et al.*, 2020; SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018). Cerqueira *et al.* (2021) utilizando um novo método de graduação histológica denominado sistema binário, também encontrou maior risco de transformação maligna entre amostras de alto risco, comparadas às amostras de baixo risco.

As LPM são relativamente comuns na prática clínica de profissionais generalistas e especialistas em lesões de cabeça e pescoço. Dessa forma, é importante aumentar a sensibilização acerca do conhecimento em saúde pública dos índices de transformação malignas dessas lesões. Uma eficaz comunicação, com medidas de acompanhamento e estratégias de tratamento eficientes podem ajudar a reduzir os índices de transformação dessas lesões em carcinoma invasivo (IOCCA *et al.*, 2020).

1.3 Marcadores moleculares para diagnóstico e tratamento de LPM da cavidade oral

Atualmente, não há um fator clínico-patológico ou molecular preditor de transformação maligna para LPM (VAN DER WAAL, 2014). No entanto, parâmetros e fatores são usados para predizer o risco de transformação maligna, são considerados fatores significativamente associados à transformação maligna: diagnóstico prévio de câncer na região de cabeça e pescoço, a idade, o gênero feminino, o tamanho da lesão, localização, etiologia (idiopático ou associado ao fumo), presença e severidade da displasia epitelial (HOLMSTRUP *et al.*, 2006;

VAN DER WAAL, 2014; WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016). Embora tenha sido determinado que a suspensão do hábito de fumar após o tratamento cirúrgico da LO reduz o risco de transformação maligna (VLADIMIROV; SCHIODT, 2009), outros estudos têm demonstrado que o hábito de fumar não é capaz de influenciar o risco de transformação maligna (HOLMSTRUP *et al.*, 2006, HOLMSTRUP *et al.*, 2007).

A transformação maligna de uma LPM é um processo complexo denominado carcinogênese ou oncogênese, que culmina no surgimento de um fenótipo maligno com a multiplicação de uma célula displásica ou mutada (VINCENT; GATENBY, 2008). O sistema imune pode prevenir este processo através da migração de células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas (CDs), linfócitos citotóxicos e células NK para o sítio da lesão (AFONINA; CULLEN; MARTIN, 2010; DUNN *et al.*, 2002; MITTAL *et al.*, 2014; YAGYUU *et al.*, 2017). O escape de células mutadas desse sistema de imunovigilância é um importante fator no desenvolvimento de uma neoplasia (DUNN *et al.*, 2002; MITTAL *et al.*, 2014). Evidências suportam que o surgimento e a progressão do câncer podem estar relacionados à supressão da resposta anti-tumoral de populações de células T regulatórias (Treg) (DIPAULO *et al.*, 2005). As células Treg compreendem uma subpopulação de linfócitos envolvidos na manutenção da homeostase do organismo, modulação da resposta imunológica a antígenos, na prevenção de doenças autoimunes e inibição de infecções crônicas (RATAJCZAK *et al.*, 2018) e as células Treg consistem em subtipos de células imunossupressoras T com diversidade funcional que tem um papel crucial na modulação da resposta imune e na redução da ativação imune deletéria. (FACCIABENE; MOTZ; COUKOS, 2012). São caracterizados vários subtipos de células Treg, tais como células Treg CD8+, Treg CD4+ e $\gamma\delta$ -TCR (WANG, 2008). No entanto, FOXP3 (forkhead box P3) tem sido considerado o mais específico marcador para distinguir células Treg de outras células T, por ser um fator de transcrição altamente envolvido no desenvolvimento e função das células Treg (SAKAGUCHI *et al.*, 2010). A ausência de células Treg devido à perda da função de FOXP3 leva a uma doença autoimune, enquanto a alta prevalência de Treg no sangue periférico devido a uma superexpressão de FOXP3 causa imunodeficiência pela supressão de células Treg CD4+ e células Treg CD8+, células dendríticas, células B e células natural killer (NK), o que suprime a atividade anti-tumoral (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; VON BOEHMER, 2005). As células Treg além de estar associada à função suprimida na imunidade anti-tumoral do hospedeiro, está diretamente ligada a um mau prognóstico (WOLF *et al.*, 2005). Além disso, evidências sugerem que a reação imunocelular pode variar de acordo com o grau de displasia da LO (SOUTO *et al.*, 2018).

Eventos imunológicos como aumento da densidade de CD maduras, células mononucleares do infiltrado inflamatório (SOUTO *et al.*, 2018), diminuição da relação CD4+/CD8+, aumento da densidade de células NK e a expressão de HLA-DR por queratinócitos (BONDAD-PALMARIO, 1995) ocorrem simultaneamente em displasias acentuadas e são sugeridos como indicativos de transformação maligna. Além disso, amostras de displasia epitelial discreta e acentuadas apresentaram significativo aumento de CDs CD1a+ em comparação com amostras de hiperplasia epitelial (BONDAD-PALMARIO, 1995). Em lesões potencialmente cancerizáveis, a expressão de mediadores immunossupressores tais como HLA (*human leukocyte antigen*) G and E, IL (*interleukin*)-10, TGF (*tumor growth factor*)- β (GONÇALVES *et al.*, 2017) e PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand 1*) (GONÇALVES *et al.*, 2017; YAGYUU *et al.*, 2017) mostraram um potencial de evasão imune dessas lesões independente do grau de displasia.

Atividade immunossupressora associada à presença de altos níveis de células FOXP3 tem sido avaliada em pacientes com CCE (DRENNAN *et al.*, 2013; SCHOTT; PRIES; WOLLENBERG, 2010; STASIKOWSKA-KANICKA; WĄGROWSKA-DANILEWICZ; DANILEWICZ, 2018) e queilite actínica (ROJAS *et al.*, 2017). Em lesões de LO, a expressão de vários mediadores immunossupressores também mostraram um potencial de evasão imune dessas lesões independente do grau de displasia (GONÇALVES *et al.*, 2017; YAGYUU *et al.*, 2017) e a avaliação da expressão de FOXP3 mostrou associação com a progressão da displasia epitelial, onde observou-se um aumento com a progressão da displasia epitelial e diminuição da expressão em comparação com amostras de CCE (SUN *et al.*, 2016), mostrando que o aumento de células FOXP3 pode contribuir para a transição de um estágio pré-neoplásico em carcinoma (ROJAS *et al.*, 2017).

O infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral pode refletir a biologia do tumor e ser preditor de prognóstico. Ainda não é claro se a infiltração de linfócitos no sítio tumoral primário representa um benefício anti-tumoral ou se a infiltração destes linfócitos está associada com prognóstico, promovendo a progressão do tumor através da liberação de mediadores inflamatórios (WHITESIDE, 2008). O desenvolvimento e a função de células Treg depende da expressão de FOXP3, que tem sido relatado como principal regulador (HALAMA *et al.*, 2011). A população de células Treg FOXP3 tem sido relacionada com fator de prognóstico para o câncer de cólon (HALAMA *et al.*, 2011) e no CCE (ZHANG *et al.*, 2019). Isto tem sido associado à capacidade das células tumorais de recrutar Treg para o microambiente tumoral e, assim, inibir a imunidade anti-tumoral em pacientes com câncer (ZHANG *et al.*, 2019).

A oncogênese está associada à combinação de características genéticas e ambientais (WILLIAMS, 2000). Uma forte correlação existe entre a exposição à potenciais carcinógenos e o aumento do risco de desenvolver câncer oral. Muitos estudos mostram que fatores como idade, gênero, raça, uso de tabaco e álcool levam ao aumento na incidência relativa do câncer oral (McDOWELL, 2006). Pacientes portadores de CCE da região de cabeça e pescoço apresentaram altos níveis de células Treg com grande atividade supressora comparados a controles saudáveis (DRENNAN *et al.*, 2013; SCHOTT; PRIES; WOLLENBERG, 2010). Observou-se que indivíduos com CCE de boca (STASIKOWSKA-KANICKA; WĄGROWSKA-DANILEWICZ; DANILEWICZ, 2018) e queilite actínica (ROJAS *et al.*, 2017) apresentaram números significativamente maiores de células FOXP3 nas lesões em relação a amostras de mucosa normal. Estas células também eram numericamente maiores em indivíduos com metástases detectável, sugerindo um papel das células FOXP3 na progressão do CCE (STASIKOWSKA-KANICKA; WĄGROWSKA-DANILEWICZ; DANILEWICZ, 2018).

Estudos sugerem que a prevalência de LPM baixa que o aparecimento e a progressão do câncer podem estar relacionados à supressão da resposta anti-tumoral de populações de células Treg. O fator FOXP3 é considerado o melhor marcador capaz de distinguir células Treg de outras células T. Altos níveis de expressão de FOXP3 têm sido observados em lesões malignas e potencialmente malignas de boca. Diferentes níveis têm sido observados em diferentes estágios do carcinoma, interferindo na sobrevida dos pacientes portadores de CCE. Por outro lado, evidências sugerem que o sistema de defesa imune anti-tumoral pode ser afetado por fatores clínico-patológicos associados à transformação maligna e carcinogênese do CCE. No entanto, a associação entre a expressão de células Treg FOXP3 e fatores clínicopatológicos relacionados com a transformação maligna de lesões potencialmente cancerizáveis e carcinogênese do CCE ainda não foram avaliadas. O estudo da transformação maligna de LPM e de moléculas associadas com imunossupressão tem se tornado importante por serem alvos diretos ou indiretos no prognóstico do câncer de boca e na imunoterapia contra o câncer, o que justifica o melhor entendimento destes mecanismos e consequentemente capacitará melhor o profissional, contribuindo com a conscientização ou sensibilização da população.

Neste contexto, estudos têm mostrado a importância do sistema imunológico no prognóstico do câncer de boca (DENARDO *et al.*, 2011; NORDFORS *et al.*, 2013). Em uma fase inicial de displasia epitelial ou durante a formação de células tumorais o sistema imune tem a capacidade de eliminar células com danos no DNA que podem resultar em câncer. (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006). Um estudo publicado pelo nosso grupo de

pesquisa mostrou que o hábito de fumar, o tamanho das lesões e a presença de displasia epitelial estavam relacionados com a densidade de células dendríticas e células mononucleares inflamatórias em amostras de LO, sugerindo que o sistema de defesa imune anti-tumoral pode ser afetado por fatores clínico-patológicos associados à transformação maligna (SOUTO *et al.*, 2018).

Dessa forma, o desenvolvimento futuro de ferramentas que auxiliam o diagnóstico patológico, baseado em marcadores moleculares ou de perfil genético, além de estudos clínicos que permitem uma abordagem mais personalizada de pacientes com LPM e displasias na cavidade bucal podem ajudar no manejo de LPM e diminuir os índices de transformação maligna dessas lesões (IOCCA *et al.*, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características clínicas, histopatológicas, a progressão maligna e imunoeexpressão de FOXP3 em amostras de lesões potencialmente malignas.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar as características clínicas e histopatológicas de amostras diagnosticadas como LPM em um período de 15 anos no serviço de patologia oral e maxilofacial da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas);
- b) avaliar as características clínicas e histopatológicas de amostras com diagnóstico de LPM que evoluíram para lesões malignas diagnosticadas em um período de 15 anos no Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas);
- c) realizar o acompanhamento clínico-patológico das amostras de LPM diagnosticadas no serviço de Estomatologia do Departamento de Odontologia da PUC Minas;
- d) correlacionar a expressão de FOXP3 em amostras de LPM com características clínicas e histopatológicas associadas com maior risco de transformação maligna.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado **“Avaliação da progressão maligna e correlação de fatores clínico-patológicos com a expressão de FOXP3 em lesões potencialmente malignas de boca: estudo retrospectivo de 15 anos,”** será submetido ao periódico **Oral Disease (Qualis A1)**.

Endereço eletrônico para acesso às normas do periódico:
<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/16010825>

Avaliação da progressão maligna e correlação de fatores clínico-patológicos com a expressão de FOXP3 em lesões potencialmente malignas de boca: estudo retrospectivo de 15 anos

Débora Cury, Maria Clara Moreira Oliveira, Isabela Reis Ribeiro Mendes, Camila Vitória de Barros Silva, Martinho Campolina Rebelo Horta, Giovanna Ribeiro Souto

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Autor correspondente:

Giovanna Ribeiro Souto. Departamento de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Avenida Dom José Gaspar, 500, Prédio 46, Sala 101, Coração Eucarístico. Belo Horizonte - Minas Gerais, Brasil. CEP: 30535-901.

Número de telefone: +55 31 3319-4414

Número de FAX: +55 31 3319-4415

E-mail: grsouto@pucminas.br

RESUMO

O objetivo do estudo foi realizar um levantamento epidemiológico de lesões potencialmente malignas no serviço de patologia oral e maxilofacial da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) em um período de 15 anos. Além de avaliar as características clínicas e histopatológicas dessas lesões, as características das lesões que evoluíram para lesões malignas, realizar o acompanhamento clínico-patológico das amostras de LPM diagnosticadas e correlacionar a expressão de FOXP3 em amostras de LPM com características clínicas e histopatológicas. Um total de 740 biópsias de pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia foram realizadas no período de 2007 a 2022, representando 6,1% dos diagnósticos. A leucoplasia foi a lesão mais comum (88,6%), em ambos os sexos, com média de idade de $55,7 \pm 14,0$ anos. A maioria dos pacientes eram fumantes (46,4%), apresentavam lesões únicas (65%), menor ou igual a 2 cm (72%) e localizadas em regiões de baixo risco de transformação maligna (66,2%). O principal diagnóstico histopatológico foi de displasia epitelial leve (37,7%) e 2,8% da amostra obteve-se o diagnóstico de carcinoma in situ. A transformação maligna foi observada em 1,1% da amostra, na maioria mulheres, com média de idade de $64 \pm 15,3$ anos, com diagnóstico clínico de leucoplasias, localizadas principalmente na borda lateral de língua de pacientes fumantes. Observou-se uma baixa adesão às consultas de acompanhamento clínico. Na análise imuno-histoquímica, observou-se aumento significativo da expressão de células T reg FOXP3+ nas amostras de leucoplasia de indivíduos fumantes quando comparados as amostras de mucosa normal ($P < 0.05$), aumento significativo nas amostras de indivíduos do sexo feminino ($P < 0.05$) e nas amostras graduadas como displasia epitelial severa quando comparadas às amostras de displasia epitelial moderada ($P < 0.05$). Conclui-se que a leucoplasias é a LPM mais comum, principalmente em fumantes e a maioria das lesões apresentam baixo risco de transformação maligna. Fatores clínicos, histopatológicos e moleculares parecem estar associados com maior risco de transformação maligna.

Palavras-chave: Leucoplasia oral. Lesões potencialmente malignas. FOXP3 protein. Transformação maligna.

INTRODUÇÃO

As lesões potencialmente malignas (LPM) da mucosa bucal apresentam uma prevalência geral mundial de cerca de 4,5% entre adultos, sendo esta prevalência estimada de 3,9% em populações da América Central/Sul e 10,5% na Ásia (MELLO *et al.*, 2018). A prevalência destas lesões pode variar de acordo com os subtipos clínicos incluídos nos estudos, perfil epidemiológico, hábitos de risco da população estudada e se a base populacional utilizada na análise foi obtida de um centro de referência ou não (MELLO *et al.*, 2018; WARNAKULASURIYVA, 2009). No Brasil, a prevalência de hábitos de risco pode variar dependendo da região do país. São esperados maiores índices de consumo de tabaco e álcool em populações que vivem no interior dos estados em comparação com metrópoles (BARROS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2011). Estudos de base populacional para avaliar a prevalência de LPM em países da América Latina e Caribe são escassos (MARTINS-DE-BARROS *et al.*, 2021; MELLO *et al.*, 2018). Portanto, o conhecimento da prevalência e do perfil de distribuição das LPM na população de risco é fundamental para estabelecer políticas públicas de controle e prevenção (MARTINS-DE-BARROS *et al.*, 2021).

As LPM mais comuns encontradas clinicamente são leucoplasia, líquen plano, reação liquenoide oral, fibrose submucosa oral, leucoplasia verrucosa proliferativa e eritroplasia (GANESH *et al.*, 2018). Em uma revisão sistemática observou-se um índice de transformação maligna geral de 7,9% (IOCCA *et al.*, 2020) enquanto um estudo multicêntrico no Brasil mostrou um índice de 8,8% (CERQUEIRA *et al.*, 2021). No entanto, estes índices podem variar de acordo com o subtipo clínico de 1,4% para o líquen plano a 49,5% para leucoplasia verrucosa proliferativa. A leucoplasia oral, que é considerado o subtipo clínico mais comum, apresentou um índice de 8,6%. Enquanto a eritroplasia, este índice chegou a 33%. Os índices de transformação maligna podem ser maiores se forem considerados fatores como idade, sexo, localização das lesões, diagnóstico prévio de câncer na região de cabeça e pescoço, hábito de

fumar, tamanho das lesões, graduação histopatológica (CERQUEIRA, *et al.*, 2021; HOLMSTRUP *et al.*, 2006; IOCCA *et al.*, 2020; SPEIGHT; KKHURRAM; KUJAN, 2018; GANDARA-VILA *et al.*, 2018; VAN DER WAAL, 2014; WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016). Estes dados mostram que a progressão maligna é sempre uma possibilidade que deve ser considerada no seguimento clínico desses pacientes (IOCCA *et al.*, 2020).

A transformação maligna de uma LPM é um processo complexo denominado carcinogênese ou oncogênese, que culmina no surgimento de um fenótipo maligno com a multiplicação de uma célula displásica ou mutada (VINCENT; GATENBY, 2008). O escape de células mutadas do sistema de imunovigilância é um importante fator no desenvolvimento de uma neoplasia (DUNN *et al.*, 2002; MITTAL *et al.*, 2014). Estudos sugerem que o aparecimento e a progressão do câncer podem estar relacionados à supressão da resposta anti-tumoral de populações de células T regulatórias (Treg). O fator FOXP3 (forkhead box P3) é considerado o melhor marcador capaz de distinguir células Treg de outras células T. Altos níveis de expressão de FOXP3 têm sido observados em lesões malignas, potencialmente malignas de boca e associados a diferentes estágios do carcinoma, interferindo na sobrevivência dos pacientes. Por outro lado, evidências sugerem que o sistema de defesa imune anti-tumoral pode ser afetado por fatores clínico-patológicos associados à transformação maligna e carcinogênese (DRENNAN *et al.*, 2013; SCHOTT; PRIES; WOLLENBERG, 2010; STASIKOWSKA-KANICKA; WĄGROWSKA-DANILEWICZ; DANILEWICZ, 2018) e queilite actínica (ROJAS *et al.*, 2017). No entanto, a associação entre a expressão de células Treg FOXP3 e fatores clinicopatológicos relacionados com a transformação maligna de LPM ainda não foram avaliadas.

Dessa forma, o desenvolvimento futuro de ferramentas que auxiliam o diagnóstico patológico, baseado em marcadores moleculares ou de perfil genético, além de estudos clínicos

que permitem uma abordagem mais personalizada de pacientes com LPM e displasias na cavidade bucal podem ajudar no manejo de LPM e diminuir os índices de transformação maligna dessas lesões (IOCCA *et al.*, 2020). Dessa forma, o objetivo deste estudo é avaliar as características clínicas, histopatológicas, a progressão maligna e imunoexpressão de FOXP3 em amostras de lesões potencialmente malignas.

MATERIAL E MÉTODOS

População de estudo e critérios de inclusão e exclusão

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas). Trata-se de um estudo observacional, transversal, epidemiológico e laboratorial-imunohistoquímico em que foram incluídas amostras de biópsias com hipótese diagnóstica clínica de leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia e confirmação histopatológica de hiperqueratose, displasia leve, moderada, acentuada ou carcinoma *in situ* diagnosticadas no período de 2007 a 2022, no serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da PUC Minas. Foram coletados dados de gênero, idade, tamanho clínico das lesões, localização, hábito de fumo e graduação histopatológica das lesões. Fumantes foram definidos como aqueles pacientes que fumam mais de 10 cigarros por dia por um período de 10 anos. E não fumantes, definidos como aqueles que nunca fumaram (CANÇADO; YURGEL; FILHO, 2001). As lesões localizadas em regiões de língua, assoalho bucal e palato mole foram consideradas de alto risco de transformação maligna e demais sítios classificados como baixo risco (WALDRON; SHAFER, 1975). As informações de contato telefônico de pacientes encaminhados pelo serviço público de saúde foram coletadas das fichas de biópsias e os pacientes foram convidados a retornar ao serviço de Estomatologia para avaliar a evolução clínica das lesões. Pacientes em tratamento no serviço privado não foram incluídos nesta etapa do estudo. Dados coletados dos arquivos do serviço também foram utilizados para verificar se ocorreu transformação maligna

das lesões previamente diagnosticadas. Em seguida, foram coletadas informações clínicas e data da primeira e última biópsia.

Vinte e cinco amostras que apresentavam dados clínicos completos e material de biópsia suficiente foram selecionadas para avaliação da expressão da proteína FOXP3. Lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) e blocos de pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de LPM foram coletados. As lâminas coradas em HE foram revisadas para confirmação do diagnóstico histopatológico e graduação histopatológica das lesões de acordo com os critérios da OMS de 2017 (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Amostras de mucosa normal recobrimo terceiros molares totalmente inclusos e com indicação para exodontia foram utilizadas como controle da reação. Foram incluídas amostras de indivíduos não fumantes e que não apresentavam alterações sistêmicas que afete a resposta imunológica, tais como diabetes, infecção por HIV, tratamento medicamentoso com imunossuppressores e doenças autoimunes. Foram excluídos do estudo casos com diagnóstico histopatológico que não era compatível com diagnóstico clínico de leucoplasia, leucoeritroplasia ou eritroplasia.

Análise do infiltrado inflamatório

A avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório foi realizada por um único observador. As células inflamatórias do infiltrado foram contadas nos cortes coradas em HE. Para isso, os campos foram fotografados através do sistema de captura de imagens da Zeiss, utilizando o microscópio de luz acoplado a uma câmera fotográfica, em um aumento de 400x. As imagens digitalizadas foram então utilizadas para contagem das células inflamatórias através do programa ImageJ, versão 3.0 (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX). A média do infiltrado inflamatório foi determinada pela contagem do número de células inflamatórias em dez campos consecutivos do corte. Então foram obtidas as médias de

densidade de células por mm^2 para cada amostra. Em seguida, os dados foram agrupados em percentis e as amostras dicotomizadas pela mediana e classificadas de acordo com o grau de inflamação: baixo infiltrado inflamatório e intenso infiltrado inflamatório (SOUTO *et al.*, 2014).

Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram feitas usando o método indireto. Para análise das células Treg foi utilizado o anticorpo FOXP3. Foram obtidos, a partir de blocos de parafina, cortes histológicos de $3\mu\text{m}$ de espessura, sendo estes estendidos sobre lâminas sinalizadas (Starfrost, Lowestoft, UK). Os cortes foram desparafinizados, desidratados e a recuperação antigênica feita em panela de pressão com solução de recuperação antigênica Trilogy (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) por 30 min. Após a recuperação, essas lâminas foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente para resfriar, sendo lavadas em cinco banhos de água destilada. A fim de inibir a peroxidase endógena, os cortes foram incubados em dois banhos de peróxido de hidrogênio a 10 volumes em metanol por 15 minutos cada e lavados em cinco banhos de água destilada. Em seguida, feita a incubação em três banhos em solução tampão com 2,42g de TRIS hidroximetil amino metano PA (Nuclear, São Paulo, Brasil, código 318768) e 8,5 g de cloreto de sódio PA (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil, código 106) em 1000 mL de água destilada (TRIS-HCL), pH 7,4 por cinco minutos. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário monoclonal FOXP3 (Abcam, clone:236A/E7, dilution 1:50) por uma hora em temperatura ambiente. Após a incubação, os cortes serão submetidos a três banhos de solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4. Em seguida, será feita a incubação com o anticorpo secundário e complexo terciário do sistema Reveal (Spring bioscience, Pleasanton, CA, USA) à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos e lavagem em três banhos em solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4. A revelação da reação será executada com sistema de

substrato cromógeno constituído de uma gota de DAB-cromógena (3,3' diaminobenzidina em solução) em 1ml de substrato tamponado (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 2 minutos. Após a lavagem com 5 banhos de água destilada, a contra-coloração será com solução de hematoxilina de Mayer por 40 segundos. Os cortes serão então desidratados em soluções de etanol em concentrações crescentes: 70%, 90% e 100% por cinco minutos e mais duas vezes a 100% por dez minutos, diafanizadas em um banho de cinco e outro de dez minutos em xilol. As lâminas serão montadas com lamínulas de vidro e Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA).

Análise da imuno-expressão e contagem das células

A análise da imuno-expressão das células de FOXP3+ foi feita em dez campos de cada caso (aumento de 400x) (ZHANG *et al.*, 2019), que foram selecionados para captura de imagem e obtidas as densidades/mm². Para obter a densidade de células positivas/mm² as amostras foram fotografadas utilizando o sistema de captura de imagens e um microscópio de luz acoplado a uma câmera fotográfica, em um aumento de 400x. As imagens digitalizadas foram então utilizadas para contagem e medida da área obtida através do ImageJ, versão 3.0 (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX). A avaliação quantitativa da imunomarcação foi realizada por um único observador. De cada imagem foi obtido o número de células positivas em relação à área em mm².

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). As avaliações de normalidade usando o teste Shapiro-Wilks serão realizadas. Em amostras com distribuição normal foram aplicados os testes teste-t de Student e correlações de Pearson. Em amostras com distribuição não-normal serão aplicados os testes

Mann-Whitney U e correlações de Spearman. O teste qui-quadrado foi usado para comparar a distribuição de gênero. Significância estatística foi alcançada quando os valores de P foram $<0,05$.

RESULTADOS

De janeiro de 2007 a janeiro de 2022, um total 740 biópsias com diagnóstico clínico de leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia e com confirmação histopatológica de hiperqueratose, displasia leve, moderada, acentuada ou carcinoma *in situ* foram diagnosticadas no laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da PUC Minas, representando 6,4% do total de lesões diagnosticadas neste período. O subtipo clínico mais comum foi leucoplasia (88,6%), as lesões afetaram igualmente ambos os sexos e, no geral, apresentavam uma média de idade de $55,7 \pm 14,0$ anos. A maioria dos pacientes eram fumantes (46,4%), 27,1% eram não fumantes, 15,1% eram ex-fumantes e 11,2% não informaram. A maioria das lesões apresentavam-se como lesões únicas (65%), menor ou igual a 2 cm (72%) e estavam localizadas em regiões classificadas como de baixo risco de transformação maligna (66,2%). O principal diagnóstico histopatológico foi de displasia epitelial leve (37,7%). Em 2,8% da amostra obteve-se o diagnóstico de carcinoma *in situ*. Os dados demográficos, clínicos e histopatológicos dos subtipos clínicos estão descritos na Tabela 1.

Os dados de contato dos pacientes atendidos nas clínicas de Estomatologia da PUC Minas e encaminhados pelo serviço único de saúde (N=460) foram buscados nas fichas de biópsias. 175 pacientes foram contactados, no entanto, apenas 16 pacientes confirmaram o comparecimento à consulta. Apenas 11 pacientes compareceram. Os pacientes avaliados não apresentaram agravamento dos aspectos clínicos e histopatológicos das lesões. Os dados demográficos, clínicos e histopatológicos e do acompanhamento desses pacientes estão descritos na Tabela 2.

A taxa de transformação maligna dos pacientes da amostra com hipótese diagnóstica de LPM foi investigada. De um total de 740 biópsias realizadas no serviço, oito pacientes apresentaram transformação maligna confirmada para o carcinoma de células escamosas, representando 1,1% da amostra. A maioria dos pacientes eram mulheres (75%), com média de idade de $64 \pm 15,3$ anos, 62,5% tiveram diagnóstico clínico de leucoplasias e apresentavam lesões únicas. 75% dos pacientes tinham lesões menor ou igual a 2 cm e 50% das lesões foram localizadas na borda lateral de língua. 50% dos pacientes eram não-fumantes e o primeiro diagnóstico histopatológico foi de displasia epitelial moderada (4 casos) ou severa (4 casos). O tempo médio de evolução maligna das lesões foi de $19,5 \pm 17,0$ meses. Os dados demográficos, clínicos, histopatológicos e o tempo de transformação maligna em meses dos pacientes estão descritos na Tabela 3.

Foram selecionadas aleatoriamente 25 amostras com diagnóstico de leucoplasia para avaliação da expressão de FOXP3 e oito amostras de mucosa oral normalmente usadas como controle. As variáveis demográficas, clínicas e histopatológicas da amostra estão agrupadas na Tabela 4. As lâminas coradas em HE foram utilizadas para confirmar o diagnóstico histopatológico de LO (Figura 1A e B). A avaliação imunohistoquímica foi feita e as células Treg FOXP3+ foram claramente identificadas pelo anticorpo FOXP3 pela marcação nuclear coradas de marrom (Figura 1C e 1D).

Observou-se aumento significativo da expressão de células T reg FOXP3+ nas amostras de LO de indivíduos fumantes quando comparados as amostras de MON ($P < 0.05$) (Figura 2A). Observou-se aumento significativo da expressão de células T reg FOXP3+ nas amostras de LO de indivíduos do gênero feminino quando comparadas às amostras de indivíduos do gênero masculino ($P < 0.05$) (Figura 2B). Também se observou aumento significativo da expressão de células T reg FOXP3+ nas amostras de LO graduadas como displasia epitelial severa quando comparadas às amostras de displasia epitelial moderada ($P < 0.05$) (Figura 2F).

DISCUSSÃO

A prevalência geral mundial das LPM tem sido recentemente estimada em um estudo de revisão sistemática em cerca de 4,5% entre adultos (MELLO *et al.*, 2018). Na amostra utilizada no presente estudo, observou-se uma prevalência de 6,4%. Estudos de prevalência de LPM com confirmação histopatológica são limitados e diferenças podem ser observadas de acordo com as características da população estudada. O perfil etário, genético, a prevalência de hábitos de risco da população alvo do estudo podem afetar a prevalência das lesões (MELLO *et al.*, 2018; WARNAKULASURIYVA, 2009). Além disso, uma maior prevalência é observada quando a fonte de dados utilizada for obtida de centros de referência para tratamento ou diagnóstico dessas lesões (MELLO *et al.*, 2018). O subtipo clínico mais comum foi a leucoplasia, afetando principalmente homens, com média de idade de 55 anos e fumantes. Estes dados corroboram com outros estudos da literatura (MARTINS-DE-BARROS *et al.*, 2021; MELLO *et al.*, 2018; PETTI, 2003). Estudos de base populacional para avaliar a prevalência de LPM no Brasil são escassos e diferentes prevalências podem ser encontradas de acordo com a região do país (FERREIRA *et al.*, 2011; MARTINS-DE-BARROS *et al.*, 2021). Populações que vivem no interior dos estados são esperados apresentarem maiores índices de consumo de tabaco e álcool do que aquelas que vivem em metrópoles. Desta forma, o conhecimento da prevalência e do perfil de distribuição das LPM na população de risco é fundamental para estabelecer políticas públicas de controle e prevenção (MARTINS-DE-BARROS *et al.*, 2021).

No presente estudo, observou-se que a maioria das lesões estavam localizadas em regiões da cavidade bucal classificadas como regiões de baixo risco de transformação maligna (WALDRON; SHAFER, 1975) e apresentavam diagnóstico histopatológico de displasia epitelial leve. No entanto, cerca de 7% dos diagnósticos são de lesões graves (displasia epitelial acentuada ou carcinoma *in situ*). Dessa forma, a gravidade das lesões não deve ser subestimada

diante de uma suspeita clínica de LPM. Adicionalmente, a progressão maligna é sempre uma possibilidade que deve ser considerada no seguimento clínico desses pacientes.

O índice de transformação maligna das LPM é variável de acordo com o subtipo clínico. Em uma revisão sistemática, observou-se um índice de transformação maligna geral de 7,9%. Variando de 1,4% para o líquen plano a 49,5% para leucoplasia verrucosa proliferativa. A leucoplasia, subtipo clínico mais comum, apresentou um índice de 8,6%. Enquanto na eritroplasia, este índice chegou a 33% (IOCCA *et al.*, 2020). Um estudo multicêntrico também observou um índice de transformação maligna de 8,8% com uma média de acompanhamento de 44 meses. (CERQUEIRA *et al.*, 2021). Na amostra avaliada, neste estudo, observou-se uma taxa de transformação maligna de 1,1% e um tempo médio de evolução de 19,5 meses. No entanto, estes dados possivelmente estão subestimados devido à baixa adesão dos pacientes ao acompanhamento clínico ou a perda do seguimento desses pacientes com a realização do diagnóstico maligno em outro serviço de saúde.

Considerando as características clínicas e histopatológica dos casos com diagnóstico de transformação maligna, observou-se que a maioria das lesões tiveram o diagnóstico clínico de leucoplasia, eram mulheres, não-fumantes, com média de idade de 64 anos, com lesões localizadas em borda lateral de língua e apresentando diagnóstico histopatológico de displasia epitelial moderada ou severa. Estes dados corroboram com os resultados de um estudo multicêntrico, retrospectivo, realizado no Brasil em um período de 10 anos que avaliou 148 amostras de leucoplasia oral com diagnóstico de transformação maligna (CERQUEIRA *et al.*, 2021). No presente estudo, observou-se ainda que as lesões eram na maioria únicas e menores do que 2 cm, contrariando outros achados da literatura. Embora alguns estudos mostraram maior risco de transformação maligna para lesões com mais de 2 cm², não se observou relação da transformação maligna com o tamanho das lesões (CERQUEIRA *et al.*, 2021).

Atualmente, não há um fator clínico-patológico ou molecular preditor de transformação maligna para LPM (VAN DER WAAL, 2014). No entanto, parâmetros e fatores são usados para prever o risco de transformação maligna, são considerados fatores significativamente associados à transformação maligna: diagnóstico prévio de câncer na região de cabeça e pescoço, a idade, o gênero feminino, o tamanho da lesão, localização, etiologia (idiopático ou associado ao fumo), presença e severidade da displasia epitelial (HOLMSTRUP *et al.*, 2006; VAN DER WAAL, 2014; WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016). Embora tenha sido determinado que a suspensão do hábito de fumar após o tratamento cirúrgico da LO reduz o risco de transformação maligna (VLADIMIROV; SCHIODT, 2009), outros estudos têm demonstrado que o hábito de fumar não é capaz de influenciar o risco de transformação maligna (HOLMSTRUP *et al.*, 2006, HOLMSTRUP *et al.*, 2007).

A transformação maligna de uma LPM é um processo complexo denominado carcinogênese ou oncogênese, que culmina no surgimento de um fenótipo maligno com a multiplicação de uma célula displásica ou mutada (VINCENT; GATENBY, 2008). O sistema imune pode prevenir este processo através da migração de células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas (CDs), linfócitos citotóxicos e células NK para o sítio da lesão (AFONINA; CULLEN; MARTIN, 2010; DUNN *et al.*, 2002; MITTAL *et al.*, 2014; YAGYUU *et al.*, 2017). O escape de células mutadas desse sistema de imunovigilância é um importante fator no desenvolvimento de uma neoplasia (DUNN *et al.*, 2002; MITTAL *et al.*, 2014). Evidências suportam que o surgimento e a progressão do câncer podem estar relacionados à supressão da resposta anti-tumoral de populações de células T regulatórias (Treg) (DIPAULO *et al.*, 2005). As células Treg compreendem uma subpopulação de linfócitos envolvidos na manutenção da homeostase do organismo, modulação da resposta imunológica a antígenos, na prevenção de doenças autoimunes e inibição de infecções crônicas (RATAJCZAK *et al.*, 2018) e as células Treg consistem em subtipos de células imunossupressoras T com diversidade

funcional que tem um papel crucial na modulação da resposta imune e na redução da ativação imune deletéria (FACCIABENE; MOTZ; COUKOS, 2012). A ausência de células Treg devido à perda da função de FOXP3 leva a uma doença autoimune, enquanto a alta prevalência de Treg no sangue periférico devido a uma superexpressão de FOXP3 causa imunodeficiência pela supressão de células Treg CD4+ e células Treg CD8+, células dendríticas, células B e células natural killer (NK), o que suprime a atividade anti-tumoral (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; VON BOEHMER, 2005). As células Treg além de estar associada à função suprimida na imunidade anti-tumoral do hospedeiro, está diretamente ligada a um mau prognóstico (WOLF *et al.*, 2005). Além disso, evidências sugerem que a reação imunocelular pode variar de acordo com o grau de displasia da LO (SOUTO *et al.*, 2018).

No presente trabalho observou-se um aumento significativo da expressão das células T reg FOXP3+ nas amostras de indivíduos fumantes, do gênero feminino e graduadas como displasia epitelial acentuada. Estes achados são inéditos na literatura e suportam a hipótese de que fatores como hábito de fumar, gênero e grau de displasia possam afetar o sistema imuno anti-tumoral através da superexpressão de células T reg. Esses achados corroboram com resultados de outro estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa que observou que o hábito de fumar e a presença de displasia epitelial estavam relacionados com a densidade de células dendríticas e células mononucleares inflamatórias em amostras de LO, sugerindo que o sistema de defesa imune anti-tumoral pode ser afetado por fatores clinicopatológicos associados com transformação maligna (SOUTO *et al.*, 2018). Estudos relacionados à expressão desse marcador com outros marcadores imunológicos são importantes para entender melhor como a resposta imunológica afeta a transformação maligna de lesões leucoplásicas.

As LPM são relativamente comuns na prática clínica e é importante aumentar a conscientização em saúde pública dos índices de transformação malignas dessas lesões. A leucoplasia é o subtipo clínico mais comum, principalmente em fumantes e a maioria das lesões

apresentam baixo risco de transformação maligna. No entanto, fatores clínicos, histopatológicos e moleculares parecem aumentar o risco de progressão das lesões. O desenvolvimento futuro de ferramentas que auxiliam o diagnóstico patológico e prognóstico das lesões, baseado em marcadores moleculares ou de perfil genético, além de estudos clínicos que permitem uma abordagem mais personalizada de pacientes com LPM, podem diminuir os índices de transformação maligna, aumentar o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, a sobrevida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. AFONINA, I. S.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. **Immunological Reviews**, v.235, n.1, p. 105-116, May 2010.
2. BARROS, A.D.J. *et al.* Tobacco smoking in Brazil: regional inequalities and prevalence according to occupational characteristics. **Ciências & Saúde Coletiva**, v.16, n.9, p. 3707-3716, Sept. 2011.
3. BRESSENOT, A. *et al.* Comparing histological activity indexes in UC. **Gut**, v.64, n.9, p. 1412-1418, Sept. 2015.
4. CANÇADO, R.P.; YURGEL, L.S.; FILHO, M.S. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. **Oral Oncology**, v.37, n.5, p. 446-454, July 2001.
5. CERQUEIRA, J.M. *et al.* Malignant transformation of oral leukoplakia: a multicentric retrospective study in Brazilian population. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v.26, n.3, p. 292-298, May 2021.
6. DENARDO, D.G. *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. **Cancer Discovery**, v.1, n.1, p. 54-67, June 2011.
7. DIPAOLO, R.J. *et al.* CD4+CD25+ T cells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells. **Journal of Immunology**, v.175, n.11, p. 7135–7142, Dec. 2005.
8. DRENNAN, S. *et al.* Increased frequency and suppressive activity of CD127(low/-) regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck squamous cell carcinoma are associated with advanced stage and nodal involvement. **Immunology**, v.140, n.3, p. 335-343, Nov. 2013.
9. DUNN, G.P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v.3, n.11, p. 991-998, Nov. 2002.
10. EL-NAGGAR, A.K. *et al.* **World health organization classification of head and neck tumours**. 4th ed. Lyon: IARC, v.9, 2017.
11. FACCIABENE, A.; MOTZ, G.T.; COUKOS G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. **Cancer Research**, v.72, n.9, p. 2162-2171, May 2012.

12. FAUL, F. *et al.* G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v.39, n.2, p. 175-191, May 2007.
13. FERREIRA, L.N. *et al.* Alcohol consumption and associated factors in a city in Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.27, n.8, p. 1473-1486, Aug. 2011.
14. GANDARA-VILA, P. *et al.* Survival study of leukoplakia malignant transformation in a region of northern Spain. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.23, n.4, p. e413-420, July 2018.
15. GANESH, D. *et al.* Potentially malignant Oral disorders and cancer transformation. **Anticancer Research**, v.38, n.6, p. 3223-3229, June 2018.
16. HOLMSTRUP, P. *et al.* Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncology**, v.42, n.5, p. 461-474, May 2006.
17. HOLMSTRUP, P. *et al.* Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable?. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 36, n. 5, p. 262-266, May 2007.
18. HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v.299, n.5609, p. 1057-1061, Feb. 2003.
19. IOCCA, O. *et al.* Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. **Head & Neck**, v.42, n.3, p. 539-555, Mar. 2020.
20. MARTINS-DE-BARROS, A.V. *et al.* High prevalence of oral potentially malignant disorders and risk factors in a semi-urban brazilian city: a population-based cross-sectional study. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.26, n.6, p. e778-e785, Nov. 2021.
21. MELLO, F.W. *et al.* Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.47, n.7, p. 633-640, Aug. 2018.
22. MITTAL, D. *et al.* New insights into cancer immunoeediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. **Current Opinion in Immunology**, v.27, p. 16-25, Feb. 2014.
23. NAPIER, S.S.; SPEIGHT, P.M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.37, n.1, p. 1-10, Jan. 2008.

24. NORDFORS, C. *et al.* CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, v.49, n.11, p. 2522-2530, July 2013.
25. PETTI, S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. **Oral Oncology**, v. 39, n. 8, p. 770-780, Dec. 2003.
26. RATAJCZAK, W. *et al.* Immunological memory cells. **Central European Journal of Immunology**, v. 43, n. 2, p. 194-203, June 2018.
27. ROJAS, I.G. *et al.* CD8+ and FoxP3+ T-cell infiltration in actinic cheilitis. **International Journal of Dermatology**, v.56, n.1, p. 54-62, Jan. 2017.
28. SAKAGUCHI, S. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.10, n.7, p. 490-500, July 2010.
29. SCHOTT, A.K.; PRIES, R.; WOLLENBERG, B. Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.26, n.1, p. 67-75, July 2010.
30. SOUTO, G.R. *et al.* Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 cytokines and dendritic cells: a cross-sectional study in chronic periodontitis. **PLoS One**, v.9, n.3, p. e91636, Mar. 2014.
31. SOUTO, G.R. *et al.* Mature dendritic cell density is affected by smoking habit, lesion size, and epithelial dysplasia in oral leukoplakia samples. **Archives of Oral Biology**, v.95, p. 51-57, July 2018.
32. SPEIGHT, P.M.; KHURRAM, S.A.; KUJAN, O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v.125, n.6, p. 612-627, June 2018.
33. STASIKOWSKA-KANICKA, O.; WĄGROWSKA-DANILEWICZ, M.; DANILEWICZ, M. Immunohistochemical Analysis of Foxp3(+), CD4(+), CD8(+) Cell Infiltrates and PD-L1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Pathology Oncology Research**, v.24, n.3, p. 497-505, July 2018.
34. VAN DER WAAL, I. Oral potentially malignant disorders: is malignant transformation predictable and preventable?. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v.19, n.4, p. e386-390, July 2014.
35. VINCENT, T.L.; GATENBY, R.A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, v.32, n.4, p. 729-737, Apr. 2008.
36. VLADIMIROV, B. S.; SCHIODT, M. The effect of quitting smoking on the risk of unfavorable events after surgical treatment of oral potentially malignant lesions.

- International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 38, n. 11, p. 1188-1193, Nov. 2009.
37. VON BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nature Immunology**, v.6, n.4, p. 338–344, Apr. 2005.
 38. WALDRON, C.A.; SHAFER, W.G. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. **Cancer**, v.36, n.4, p. 1386-1392, Oct. 1975.
 39. WANG, R.F. CD8+ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. **Human Immunology**, v.69, n.11, p. 811–814, Nov. 2008.
 40. WARNAKULASURIYA, S. Epidemiologia global do câncer oral e orofaríngeo. **Oral Oncology**, v.45, n.4-5, p. 309-316, May 2009.
 41. WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: A systematic review of observational studies. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.45, n.3, p. 155–166, Mar. 2016.
 42. YAGYUU, T. *et al.* Programmed death ligand 1 (PD-L1) expression and tumor microenvironment: Implications for patients with oral precancerous lesions. **Oral Oncology**, v. 68, p. 36-43, May 2017.
 43. ZHANG, B. *et al.* CXCL12 is associated with FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes and affects the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v.18, n.2, p. 1099-1106, Aug. 2019.

Tabela 1 – Dados demográficos, clínicos e histopatológicos das amostras de indivíduos diagnosticados com Leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia

Variáveis categóricas		Leucoplasia (n=656)	Eritroplasia (n=24)	Leucoeritroplasia (n=60)
Demográficas				
Gênero (mulher/homem)		327/329	13/11	26/34
Idade mínima e máxima		9-93	39-78	29-87
Idade (média em anos ± desvio padrão)		55,7±14	54,9±11,0	55,0±10,8
Clínicas				
Número de lesões	Únicas	424	20	37
	Múltiplas	183	4	20
	NI	49	-	3
Tamanho	>2cm	101	6	12
	≤2cm	476	14	43
	NI	79	4	5
Localização	Baixo risco	457	9	24
	Alto risco	197	15	36
	NI	2	-	-
Hábito de fumar	Fumante	301	12	31
	Não fumante	183	5	13
	Ex fumante	99	2	11
	NI	73	5	5
Histopatológicas				
Hiperceratose		237	1	6
Displasia epitelial leve		258	5	16
Displasia epitelial moderada		137	8	21
Displasia epitelial acentuada		17	7	6
Carcinoma <i>in situ</i>		7	3	11

Tabela 2 – Dados demográficos, clínicos e histopatológicos dos indivíduos diagnosticados com leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia que compareceram às consultas de acompanhamento.

Variáveis categóricas	Leucoplasia	Eritroplasia	Leucoeritroplasia	
Indivíduos contactados	153	4	18	
Indivíduos agendados	14	0	2	
Compareceram	10	0	1	
Demográficas				
Gênero (mulher /homem)	7/3	-	1 (mulher)	
Idade mínima e máxima	46-69		50	
Idade (média em anos ± desvio padrão)	55,67±8,4	-	50	
Clínicas				
Número de lesões	Únicas	7	-	1
	Múltiplas	3	-	0
Tamanho	>20mm	2	-	0
	<20mm	7	-	1
	NI	1	-	0
Localização	Baixo grau	6	-	0
	Alto grau	4	-	1
Hábito de fumar	Fumante	5	-	0
	Não fumante	3	-	1
	Ex	2	-	0
Histopatológicas				
	Hiperceratose	4	-	0
	Displasia epitelial leve	4	-	0
	Displasia epitelial moderada	2	-	1

Tabela 3 – Dados demográficos, clínicos, histopatológicos e de tempo de transformação maligna dos indivíduos com diagnosticados de lesões potencialmente malignas

Paciente	sexo	Idade	Diagnóstico clínico	Número de lesões	Tamanho	Localização	Hábito de fumar	Diagnósticos histopatológicos para uma ou mais biópsias	Tempo de evolução maligna (meses)
1	F	55	Leucoplasia	Únicas	>2cm	Borda lateral de língua	Não fumante	1º Displasia epitelial Severa 2º Displasia epitelial Leve 3º CCE	55
2	M	60	Eritroplasia	Únicas	≤2cm	Borda lateral de língua	EX-fumante	1º Displasia epitelial Severa 2º CCE	13
3	F	78	Leucoplasia	Únicas	>2cm	Língua e assoalho bucal	Não fumante	1º Displasia epitelial Severa 2º Displasia epitelial Moderada 3º CCE	26
4	M	49	Leucoeritroplasia	Únicas	≤2cm	Palato mole	Fumante	1º Displasia epitelial Moderada 2º Carcinoma <i>In Situ</i>	6
5	F	68	Leucoeritroplasia	Múltiplas	>2cm	Borda lateral de língua	EX-fumante	1º Displasia epitelial Moderada 2º CCE	7
6	F	41	Leucoplasia	Múltiplas	≤2cm	Borda lateral de língua	NI	1º Displasia epitelial Moderada 2º Displasia epitelial Severa 3º CCE	12
7	F	81	Leucoplasia	Únicas	>2cm	Rebordo alveolar	Não fumante	1ª Displasia epitelial Severa 2º CCE	NI
8	F	81	Leucoplasia	NI	>2cm	Rebordo alveolar	Não fumante	1ª Displasia epitelial Moderada 2º CCE	18

Tabela 4 – Dados demográficos, clínicos e histopatológicos das amostras de indivíduos diagnosticados com Leucoplasia Oral (LO) fumantes e não fumantes e amostras de mucosa oral normal (MON).

Variáveis categóricas		LO Fumante (n=25)	Mucosa oral normal (n=8)
Demográficas			
Gênero (mulher/homem)		13/12	4/4
Idade (média em anos \pm desvio padrão)		54.5 \pm 11.5	50
Cor da pele	Leucoderma	18	NI
	Feoderma	3	NI
	Melanoderma	4	NI
Clínicas			
Número de lesões	Únicas	23	-
	Múltiplas	2	-
Sintomatologia	Com	4	-
	Sem	21	-
Hábito de fumar	Fumante	15	
	Não fumante	10	
Histopatológicas			
Displasia epitelial leve		7	-
Displasia epitelial moderada		13	-
Displasia epitelial acentuada		5	-

FIGURAS

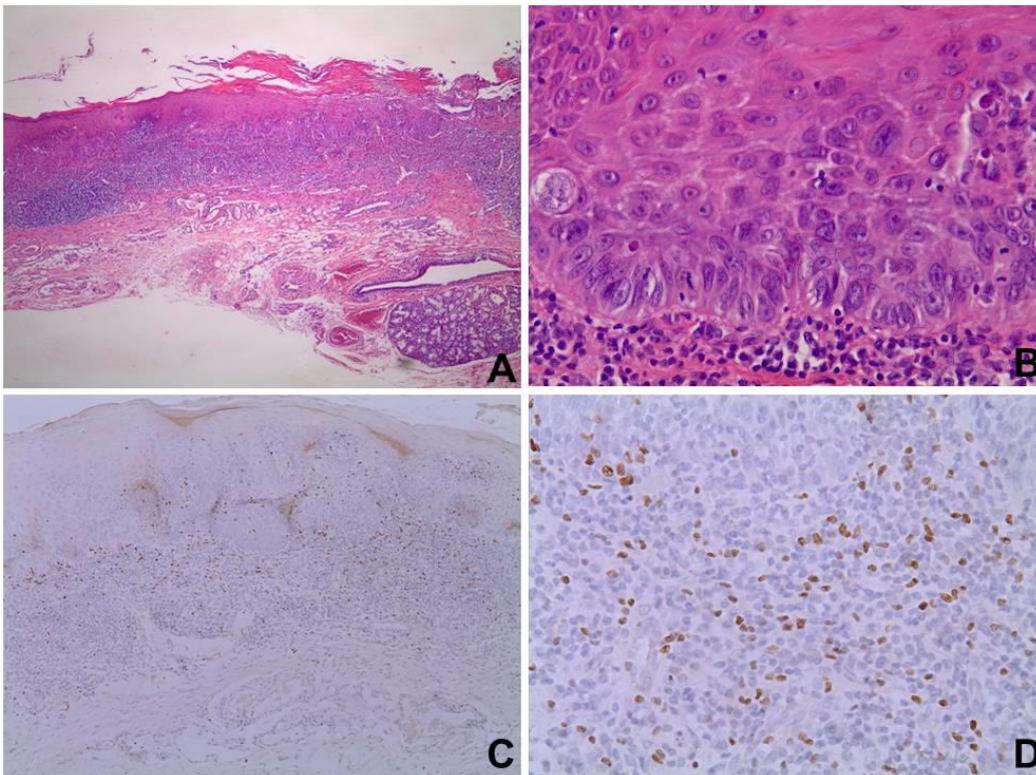


Figura 1 – A) Amostra histopatologicamente diagnosticada como displasia epitelial moderada e compatível com o diagnóstico clínico de Leucoplasia Oral (LO) (hematoxilina-eosina, aumento de 50x). B) Observa-se em maior aumento a presença de queratinócitos displásicos nas camadas basal e escamosa, perda da estratificação epitelial, figuras de mitose e hiperchromatismo nuclear (hematoxilina-eosina, aumento de 400x). Marcação imunohistoquímica, nuclear, de células FOXP3+ na lâmina própria (streptavidina-biotina, aumento de 50x em C) e 400x em D).

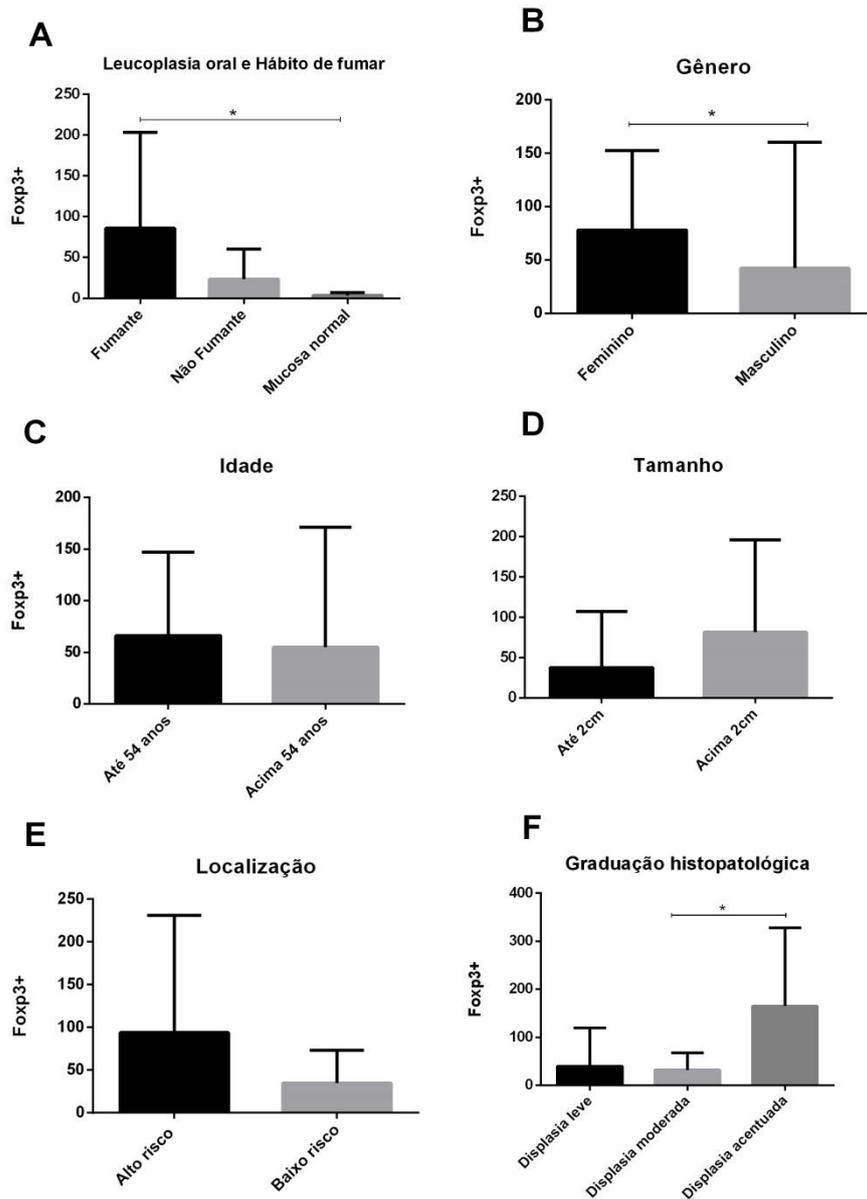


Figura 2 – A) O gráfico mostra as comparações entre as densidades de células T reg FOXP3+ no grupo de Leucoplasia Oral (LO) fumante, LO não fumante e mucosa normal. B) Comparação entre as amostras de LO do gênero feminino e masculino. C) Comparação entre amostras de indivíduos com até 54 anos e acima de 54 anos. D) Comparação entre amostras de indivíduos com lesões de até 2 cm e acima de 2 cm. E) Comparação entre amostras localizadas em sítios de alto risco e baixo risco. F) Comparação entre amostras de LO graduadas em displasia leve, moderada e acentuada. *Teste Mann-Whitney U mostra diferença estatisticamente significativa para $P < 0.05$.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho mostram que no levantamento realizado no período de 15 anos, dentre 11499 amostras, as LPM tiveram 6,4% de prevalência aproximando da média encontrada no Brasil de 7,6%, em um estudo realizado por Martins-De-Barros *et al.* (2021) e aproxima-se também da prevalência geral mundial de 4,5% entre adultos encontrada no estudo realizado por Mello *et al.* (2018), porém encontra-se quase o dobro do estudo que cita que a prevalência em populações sul-americanas e caribenha é de 3,93%.

Embora o presente estudo ainda esteja com o número de amostras limitadas, os resultados são significativos diante dos dados expostos pelo INCA a respeito da representatividade do CCE diante dos tumores malignos mais prevalente no mundo. Portanto enfatiza-se a importância deste estudo para utilidade pública que é útil para estimular o desenvolvimento de políticas públicas para realização de campanhas de prevenção e diagnóstico precoce de lesões cancerizáveis no sentido de aumentar a sensibilização populacional a respeito da severidade de uma lesão potencialmente maligna e a possibilidade de transformação maligna. Mais estudos são necessários (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2010).

Em relação ao acompanhamento clínico, observou-se um grande interesse dos pacientes em comparecer às consultas de retorno. No entanto, observamos grande absenteísmo dos pacientes que possivelmente está associado às dificuldades relacionadas ao momento de pandemia. Análises futuras são necessárias para maior entendimento. Quanto ao potencial de transformação maligna, observou-se um índice de 1,1% da amostra. Estes achados podem estar relacionados aos fatores clínicos, patológicos e regionais da amostra avaliada.

Em relação a FOXP3 observou-se aumento da expressão das células em amostras de LPM comparadas a amostras controle. Observou-se ainda aumento da expressão das células FOXP3 em amostras de pacientes fumantes em relação a não fumantes e aumento da expressão de FOXP3 no gênero feminino e nas displasias com maior gravidade. Desta forma, sugere-se que FOXP3 possa ser um marcador importante na avaliação da relação entre fatores imunológicos com a transformação maligna. Estudos avaliando a associação de FOXP3 com a transformação maligna de LPM são necessários.

REFERÊNCIAS

- AFONINA, I. S.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. **Immunological Reviews**, v. 235, n. 1, p. 105-116, May 2010.
- BARROS, A. D. J. *et al.* Tobacco smoking in Brazil: regional inequalities and prevalence according to occupational characteristics. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 9, p. 3707-3716, Sept. 2011.
- BONDAD-PALMARIO, G. G. Histological and immunochemical studies of oral leukoplakia: phenotype and distribution of immunocompetent cells. **The Journal of the Philippine Dental Association**, v. 47, n. 1, p. 3-18, Aug. 1995.
- CERQUEIRA, J. M. *et al.* Malignant transformation of oral leukoplakia: a multicentric retrospective study in Brazilian population. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 26, n. 3, p. 292-298, May 2021.
- DENARDO, D. G. *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. **Cancer Discovery**, v. 1, n. 1, p. 54-67, June 2011.
- DIPAULO, R. J. *et al.* CD4+CD25+ T cells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 11, p. 7135-7142, Dec. 2005.
- DRENNAN, S. *et al.* Increased frequency and suppressive activity of CD127(low/-) regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck squamous cell carcinoma are associated with advanced stage and nodal involvement. **Immunology**, v. 140, n. 3, p. 335-343, Nov. 2013.
- DUNN, G. P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 991-998, Nov. 2002.
- EPSTEIN, J. B. *et al.* Screening for and diagnosis of oral premalignant lesions and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Role of primary care physicians. **Canadian Family Physician**, v. 54, n. 6, p. 870-875, June 2008.
- FACCIABENE, A.; MOTZ, G. T.; COUKOS, G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 72, n. 9, p. 2162-2171, May 2012.
- FERREIRA, L. N. *et al.* Alcohol consumption and associated factors in a city in Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 8, p. 1473-1486, Aug. 2011.
- GALBIATTI, A. L. S. *et al.* Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239-247, Apr. 2013.
- GANDARA-VILA, P. *et al.* Survival study of leukoplakia malignant transformation in a region of northern Spain. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 23, n. 4, p. e413-420, July 2018.

GANESH, D. *et al.* Potentially malignant oral disorders and cancer transformation. **Anticancer Research**, v. 38, n. 6, p. 3223-3229, June 2018.

GONÇALVES, A.S. *et al.* Overexpression of immunomodulatory mediators in oral precancerous lesions. **Human Immunology**, v. 78, n. 11-12, p. 752-757, Nov. 2017.

HALAMA, N. *et al.* Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. **Cancer Research**, v. 71, n. 17, p. 5670-5677, Sept. 2011.

HOLMSTRUP, P. *et al.* Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncology**, v. 42, n. 5, p. 461-474, May 2006.

HOLMSTRUP, P. *et al.* Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable?. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 36, n. 5, p. 262-266, May 2007.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, Feb. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Tipos de câncer**. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2010. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>. Acesso em: 20 mar. 2022.

IOCCA, O. *et al.* Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. **Head & Neck**, v. 42, n. 3, p. 539-555, Mar. 2020.

MARTINS-DE-BARROS, A. V. *et al.* High prevalence of oral potentially malignant disorders and risk factors in a semi-urban brazilian city: a population-based cross-sectional study. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 26, n. 6, p. e778-e785, Nov. 2021.

MELLO, F. W. *et al.* Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 7, p. 633-640, Aug. 2018.

McDOWELL, J. D. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 39, n. 2, p. 277-294, Apr. 2006.

MITTAL, D. *et al.* New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. **Current Opinion in Immunology**, v. 27, p. 16-25, Feb. 2014.

NORDFORS, C. *et al.* CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 11, p. 2522-2530, July 2013.

PETTI, S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. **Oral Oncology**, v. 39, n. 8, p. 770-780, Dec. 2003.

PULTE, D.; BRENNER, H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. **Oncologist**, v. 15, n. 9, p. 994-1001, Aug. 2010.

RATAJCZAK, W. *et al.* Immunological memory cells. **Central European Journal of Immunology**, v. 43, n. 2, p. 194-203, June 2018.

ROJAS, I. G. *et al.* CD8+ and FoxP3+ T-cell infiltration in actinic cheilitis. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 54-62, Jan. 2017.

SABA, N. F. *et al.* Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the oral tongue, base of tongue, and tonsils: a surveillance, epidemiology and end results program-based analysis. **Oncology**, v. 81, n. 1, p. 12-20, Sept. 2011.

SAKAGUCHI, S. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 7, p. 490-500, July 2010.

SCHOTT, A. K.; PRIES, R.; WOLLENBERG, B. Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 26, n. 1, p. 67-75, July 2010.

SOUTO, G. R. *et al.* Mature dendritic cell density is affected by smoking habit, lesion size, and epithelial dysplasia in oral leukoplakia samples. **Archives of Oral Biology**, v. 95, p. 51-57, July 2018.

SPEIGHT, P. M.; KHURRAM, S. A.; KUJAN, O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v. 125, n. 6, p. 612-627, June 2018.

STASIKOWSKA-KANICKA, O.; WĄGROWSKA-DANILEWICZ, M.; DANILEWICZ, M. Immunohistochemical Analysis of Foxp3(+), CD4(+), CD8(+) Cell Infiltrates and PD-L1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Pathology Oncology Research**, v. 24, n. 3, p. 497-505, July 2018.

SUN, Y. *et al.* Immunosuppression induced by chronic inflammation and the progression to oral squamous cell carcinoma. **Mediators of Inflammation**, v.2012, p. 5715719, Dec. 2016.

TIWANA, M. S. *et al.* 25 Year survival outcomes for squamous cell carcinomas of the head and neck: Population-based outcomes from a Canadian province. **Oral Oncology**, v. 50, n. 7, p. 651-656, July 2014.

VAN DER WAAL, I. Oral potentially malignant disorders: is malignant transformation predictable and preventable?. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 19, n. 4, p. e386-390, July 2014.

VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, v. 32, n. 4, p. 729-737, Apr. 2008.

VLADIMIROV, B. S.; SCHIODT, M. The effect of quitting smoking on the risk of unfavorable events after surgical treatment of oral potentially malignant lesions. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 38, n. 11, p. 1188-1193, Nov. 2009.

VON BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nature Immunology**, v. 6, n. 4, p. 338-344, Apr. 2005.

WANG, R. F. CD8+ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. **Human Immunology**, v. 69, n. 11, p. 811-814, Nov. 2008.

WARNAKULASURIYA, S. Epidemiologia global do câncer oral e orofaríngeo. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, May 2009.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: A systematic review of observational studies. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 3, p. 155-166, Mar. 2016.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904-5912, Oct. 2008.

WILLIAMS, H. K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. **Molecular Pathology**, v. 53, n. 4, p. 165-172, Aug. 2000.

WOLF, D. *et al.* The expression of the regulatory T cell-specific fork head box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 23, p. 8326-8331, Dec. 2005.

YAGYUU, T. *et al.* Programmed death ligand 1 (PD-L1) expression and tumor microenvironment: Implications for patients with oral precancerous lesions. **Oral Oncology**, v. 68, p. 36-43, May 2017.

ZHANG, B. *et al.* CXCL12 is associated with FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes and affects the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 18, n. 2, p. 1099-1106, Aug. 2019.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. **Nature Immunology**, v. 6, n. 10, p. 715-727, Oct. 2006.