FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA, SAÚDE COLETIVA E

ODONTOLOGIA LEGAL

Gabriela Reis Alves

Caracterização imunoistoquímica de células dendríticas maduras, em relação ao status do papilomavírus humano, no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo

Ribeirão Preto

2022

Gabriela Reis Alves

Caracterização imunoistoquímica de células dendríticas maduras, em relação ao status do papilomavírus humano, no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

Ribeirão Preto

2022

Dedico este trabalho à minha avó Maria (in memorian) que continua sendo minha maior força e inspiração na vida.

Ribeirão Preto

2022

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados durante todos os meus anos de estudos.

Aos meus pais Adenilson e Maria Aparecida, que nunca mediram esforços para me proporcionar tudo que tenho.

Ao meu irmão Guilherme pelo apoio em todos os momentos.

Ao meu namorado Guilherme por todo incentivo e companheirismo.

Ao professor Jorge, por ter sido meu orientador e ter desempenhado tal função com tanta dedicação.

Ao Programa Unificado de Bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Ribeirão Preto

2022

RESUMO:

ALVES, R. G. **Caracterização imunoistoquímica de células dendríticas maduras, em relação ao status do papilomavírus humano, no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2021.

O carcinoma espinocelular (CEC) representa >90% das neoplasias malignas que acometem a região de cabeça e pescoço, sendo mais prevalente em homens. Dentro deste grupo, o CEC oral (CECO) e CEC orofaríngeo (CECorof), representam os cânceres de grande relevância para o cirurgião-dentista. Interessantemente, pacientes com CECorof parecem apresentar melhor prognóstico do que pacientes com CECO, sendo a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) aparentemente relacionado com este fator prognóstico. Além disso, estudos indicam que o sistema imune possui um papel fundamental na carcinogênese, nesse sentido há indícios mostrando que as células dendríticas (CDs) exercem um papel fundamental na apresentação de antígenos tumorais ao sistema de defesa, para que dessa forma, o organismo consiga responder à agressão. No entanto, para ter ação antitumoral, é de extrema importância que essas CDs estejam em seu estado maduro. Por tanto, o objetivo desse estudo foi imunocaracterizar CDs maduras CD83+ e CD208+ presentes no CECO e CECorof, em relação ao status de infecção pelo HPV, visando entender a participação dessas células na patogênese desses tumores. Foram selecionados 40 casos de CECO e 40 casos de CECorof e submetidos às análises imunoistoquímica e de hibridização in situ. Os resultados mostraram que ambos carcinomas afetaram frequentemente homens, fumantes e/ou tabagistas, com média de idade de 60 anos. O CECorof apresentou maior prevalência de infecção pelo HPV do que o CECO, porém, sem diferença significativa. Houve um significativo maior número de células CD83+ do que CD208+, sem correlação com a frequência do HPV, em ambos carcinomas. Nossos resultados sugerem que as CDs maduras CD83+ e CD208+ participam nos mecanismos imunes no CECO e CECorof; porém, independentemente do status de infecção pelo HPV.

Palavras-Chaves: Carcinoma espinocelular, cavidade oral, orofaringe, células dendríticas maduras, HPV.

Ribeirão Preto

2022

ABSTRACT

ALVES, R. G. **Immunohistochemical characterization of mature dendritic cells in relation to human papillomavirus status in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,2021.

Squamous cell carcinoma (SCC) represents >90% of malignant neoplasms that affect the head and neck region, being more prevalent in men. Within this group, oral SCC (OSCC) and oropharyngeal SCC (OPSCC), represent the most relevant cancers for dentists. Interestingly, patients with OPSCC seem to have a better prognosis than patients with OSCC, and human papillomavirus (HPV) infection is apparently related to this prognostic factor. In addition, studies indicate that the immune system has a key role in carcinogenesis, in this sense there is evidence showing that dendritic cells (DCs) play a key role in the presentation of tumor antigens to the defense system, so that, in this way, the organism can respond to aggression. However, to have antitumor action, it is extremely important that these DCs are in their mature state. Therefore, the aim of this study was to immunocharacterize CD83+ and CD208+ mature DCs present in OSCC and OPSCC, in relation to the status of HPV infection, aiming to understand the participation of these cells in the pathogenesis of these tumors. Forty cases of OSCC and 40 cases of OPSCC were selected and submitted to immunohistochemical and in situ hybridization analysis. The results showed that both carcinomas frequently affected men, smokers and/or smokers, with a mean age of 60 years. OPSCC had a higher prevalence of HPV infection than OSCC, however, with no significant difference. There was a significantly higher number of CD83+ than CD208+ cells, without correlation with the frequency of HPV, in both carcinomas. Our results suggest that CD83+ and CD208+ mature DCs participate in immune mechanisms in OSCC and OPSCC; however, regardless of HPV infection status.

Keywords: Squamous cell carcinoma, oral cavity, oropharynx, mature dendritic cells, HPV.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO 8

2) PROPOSIÇÃO: 12

3) MATERIAIS E MÉTODO 12

3.1 Seleção da amostra 12

3.2 Técnica imunoistoquímica 13

3.3 Técnica de hibridização in situ para HPV 13

3.4 Técnica de hibridização in situ para VEB (EBER) 14

3.5 Documentação fotográfica das lâminas de imunoistoquímica e hibridização in situ 15

3.6 Análise estatística 15

4) RESULTADOS 15

4.1 CECorof 16

4.2 CECO 16

5) DISCUSSÃO 22

6) CONCLUSÕES 23

7) REFERÊNCIAS 24

ANEXOS 27

Ribeirão Preto

2022

1) INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC), seja ele oral (CECO) ou orofaríngeo (CECorof), representa mais de 95% das lesões malignas que acometem essas regiões anatômicas. Tal patologia é caracterizada pela proliferação de células epiteliais malignas infiltrando o tecido conjuntivo adjacente. O CEC acarreta uma grande preocupação, quando diagnosticada tardiamente, devido aos seus altos níveis de recorrência e metástase. As áreas da cavidade oral como língua, soalho, palato duro, gengiva, mucosa jugal e mucosa labial são locais onde o CECO pode ser detectado, no entanto ocorre mais frequentemente nas bordas laterais e ventre da língua (Neville et al., 2009; American Cancer Society, 2021). Segundo as estatísticas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2020, 15.190 casos novos de CECO foram diagnosticados, sendo 11.180 homens e 4.010 mulheres. Percebe-se, portanto, que tal malignidade tem uma predisposição maior pelo sexo masculino, ocupando a quinta posição dos canceres mais incidentes em homens. Já no caso das mulheres, esse tipo de neoplasia é a 12º mais frequente (INCA, 2020).

No CECO, as células que sofreram modificações genéticas passam a proliferar de forma desorganizada, não respondendo mais a estímulos inibitórios proliferativos, sendo assim, são consideradas autônomas e autossuficientes (Junior et al., 2013). Em relação à aparência clínica, são encontradas lesões fundamentais como úlceras e nódulos firmemente aderidos ao tecido conjuntivo subjacente (Scully, 2011). As úlceras são o tipo de manifestação mais comum, demonstrando margens irregulares e fundo necrótico, e quando palpadas apresentam um endurecimento característico (Junior et al., 2013).

O CECorof possui algumas diferenças quando comparado com o CECO. Apresenta como agravante ser oligossintomático no início, dificultando, dessa forma, seu diagnóstico precoce. Além disso, os tumores são considerados maiores nessa região e a possibilidade de metástase é mais preocupante, devido ao fato de estarem muito próximos a linfonodos (Dedivitis et al., 1999). A região da orofaringe é composta pelas seguintes estruturas: base de língua, palato mole, área tonsilar (fossa amigdaliana, pilares anterior e posterior e amígdala) e parede faríngea posterior (Konno, 2005). As regiões mais comuns para o desenvolvimento do CECorof são as amígdalas e o palato mole (Neville et al., 2009). Uma característica importante do CECorof é a sua estreita relação com infecção pelo papilomavírus humano (HPV), principalmente com o HPV 16 e 18 (Castro & Bussoloti, 2006). Esses subtipos de HPV são comprovadamente carcinogênicos e possivelmente envolvidos na etiologia de um

subgrupo de CECorof (Tinoco et al., 2003). Assim, enquanto o CECorof está fortemente associado com a infecção pelo HPV, o CECO está relacionado principalmente ao tabagismo e etilismo. Ambos acometem principalmente indivíduos adultos, do sexo masculino, sendo os pacientes com CECorof ligeiramente mais jovens (Konno, 2005).

O sistema imune possui um importante papel na defesa contra agentes patológicos. Várias são as células que participam desse sistema de defesa, dentre elas estão às células apresentadoras de antígenos (APCs). Essas células possuem a função de apresentar antígenos ao sistema imune adaptativo, para que ocorra a ativação dos linfócitos T. As células dendríticas (CDs) fazem parte do grupo de APCs e possuem uma importante função antitumoral (Adema, 2009). Essas CDs podem ser encontradas no estágio imaturo, no qual apresenta alta capacidade de capturar antígenos, baixa expressão de moléculas co-estimulatórias e secreção limitada de citocinas. Já as CDs ativadas são caracterizadas por alta expressão de moléculas do complexo II de histocompatibilidade (classe II do MHC) e secreção de citocinas, é nesse estágio que elas desempenham um considerável componente da imunidade antitumoral (Veglia & Gabrilovich, 2017). As células-tronco hematopoiéticas pluripotentes presentes na medula óssea dão origem as CDs, que podem ser das linhagens mielóides ou plasmocitóides. Como um exemplo de CD da linhagem mielóide tem-se as células de Langerhans, presentes no tecido periférico, onde possuem a função de detectar e captar antígenos invasores. As CDs plasmocitóides morfologicamente são semelhantes a plasmócitos e possuem uma grande capacidade de apresentar receptores do tipo toll (TLR). As CDs imaturas estão presentes na periferia e são responsáveis pela captação e detecção de antígenos, após isso, migram para os linfonodos e durante esse trajeto irão sofrer um processo de maturação para que se tornem eficientes APCs, podendo dessa forma, realizar a ativação de linfócitos T virgens (*naives*) (Um et al., 2019).

As CDs maduras se caracterizam por expressar CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD208, além do MHC II; já as CDs imaturas possuem altos níveis de receptores para quimiocinas (CCR) como CCR1, CCR5 e CCR6, baixos níveis de CCR7 e das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD40 (Couti et al., 2014).

Embora o sistema imune seja eficiente, na maioria das vezes, no combate às células estranhas, este sistema parece não ser suficiente para defender o corpo das neoplasias malignas. Os tumores possuem mecanismos evasivos do sistema de defesa, conseguindo, assim, escapar de toda a maquinaria endógena defensiva. Um desses mecanismos é o fato de

se proliferarem muito rapidamente e em grande quantidade. Além disso, as células tumorais diminuem a expressão de MHC I, passando a ser imperceptíveis pelos linfócitos T CD8+ (Rodrigues, 2013).

No entanto, embora o sistema imune seja ineficiente para a destruição de células tumorais, vários são os estudos que apontam a potencialidade das CDs em induzir uma resposta imune específica antitumoral (Steinman & Banchereau, 2007). Essas células são estudadas visando conseguir sucesso na imunoterapia. As CDs são administradas em forma de vacinas e possuem como objetivo estimular células T CD4+ e CD8+ específicas para os antígenos tumorais (Silva, 2013). Por esse motivo, é de extrema importância a presença de CDs maduras nas lesões malignas, a fim de ajudar na supressão da enfermidade.

1.1) Revisão de literatura

O CEC corresponde a 95% de todos os tumores malignos da boca, o qual representa cerca de 40% dos tumores malignos situados na região de cabeça e pescoço (Scully & Bagan, 2009). O CECO é um tumor maligno que atinge estruturas da cavidade oral, como mucosa bucal, língua, lábio inferior, palato, vestíbulo, rebordo, soalho e gengiva (D'souza et al., 2018). É mais comum em homens acima dos 40 anos, sendo o quinto tumor mais frequente no sexo masculino, com 11.200 casos novos no ano de 2020 (INCA, 2020). O CECorof tem um comportamento diferente do câncer da cavidade oral, e acomete base da língua, palato mole, amígdalas, e parte lateral e posterior da garganta (American Cancer Society, 2021). Três em cada quatro CECorofs originam-se da área amigdaliana e palato mole, seguido pela base da língua (1/3 posterior da língua). Os sintomas iniciais são geralmente dor e dificuldade de deglutição (Neville et al., 2009).

Vários são os fatores de risco para o CECO, no entanto, os principais são tabagismo e consumo de álcool. O risco que o álcool oferece para induzir CECO depende da duração, da frequência, da concentração e da associação com outros agentes carcinogênicos. A literatura relata que os alcoólatras fumantes têm 100 vezes mais probabilidade de desenvolver a doença. A ingestão de álcool tem sido associada ao câncer bucal como um fator de risco e pode estar envolvida numa ação de sinergia com o uso de produtos do tabaco. O álcool possivelmente atua como um solvente, permitindo que os agentes carcinogênicos do tabaco penetrem nos tecidos (Neville et al., 2009; American Cancer Society, 2021).

Vários estudos demonstram que a infecção pelo HPV está relacionada com uma porcentagem considerável de casos de CECorof (INCA, 2020). De acordo com as estatísticas mais recentes relatadas por um estudo multicêntrico, analisando mais de 3.600 amostras de 29 países usando vários marcadores confiáveis da infecção pelo HPV, as estimativas dos CEC de cabeça e pescoço atribuíveis ao HPV são de 18,5 a 22,4% na orofaringe, 3,0 a 4,4% na cavidade oral e 1,5 a 3,5% na laringe. No geral, a incidência de CECorof com positividade ao HPV exibiu tendência crescente nas últimas décadas. Estudos mostraram que a associação do HPV no CECorof é independente do sexo do paciente e do uso de tabaco. A transmissão do HPV tem sido associada a comportamentos sexuais desprotegidos com o portador do vírus. Apesar da maior probabilidade de metástases regionais precoces nos linfonodos cervicais, os tumores orofaríngeos positivos para HPV têm prognóstico significativamente melhor e menor morbidade relacionada ao tratamento quando comparados aos tumores orofaríngeos negativos para HPV (Devajara et al., 2020).

As células dendríticas (CDs) são células importantes do sistema imune que realizam a apresentação de antígenos às células T para promover imunidade a corpos estranhos e tolerância a auto-antígenos. Estão localizadas na pele, mucosa e tecidos linfoides (Anne & Smitha, 2019) e possuem uma importante função antitumoral. As CDs imaturas estão localizadas no local primário do tumor e exercem a função de reconhecer e capturar antígenos tumorais. Após esse processo, essas células começam a sofrer uma etapa de maturação, que depende de várias citocinas, quimiocinas e moléculas de superfície. Posteriormente, migram para os linfonodos, onde terminam a maturação e se tornam verdadeiras células apresentadoras de antígenos (APCs), apenas nesse estágio que conseguem ativar células T, que são células efetoras para a eliminação de células neoplásicas (Costa et al., 2016).

As CDs imaturas manifestam características de células primitivas e definidas pela expressão dos marcadores clássicos de superfície CD11c, CD11b, CD1a e CD207. A maturação fenotípica é realizada quando as CDs regulam positivamente os marcadores de maturação da superfície, como CD80, CD83, CD208 e CD86 (Anne & Smitha, 2019).

A capacidade das CDs de iniciar e direcionar respostas imunes é explorada na imunoterapia contra o câncer. Com a vacinação, CDs maduras carregadas com antígeno tumoral *ex-vivo* são injetados em pacientes com câncer para induzir células T efetoras específicas de um tumor que visa reconhecer e eliminar células cancerígenas e induzir memória imunológica para controlar o crescimento do tumor (Anne & Smitha, 2019).

No entanto, embora a imunoterapia venha sendo estudada por vários centros de pesquisa do mundo e vários são os pesquisadores que possuem a esperança de que essa seria a terapia de sucesso contra o câncer, as lesões malignas possuem a capacidade de evadir do sistema de defesa, apresentando defeitos no processamento, transporte e apresentação de antígenos, defeitos na expressão do MHC I e MHC II e baixa expressão de antígenos tumor-específicos. Esses defeitos não apenas promovem crescimento tumoral descontrolado, mas também representam um obstáculo para o sucesso da imunoterapia (Gabrilovich et al., 1996; Anne & Smitha, 2019).

2) PROPOSIÇÃO:

O objetivo desse estudo foi avaliar comparativamente os imunomarcadores CD83 e CD208, em relação às taxas de infecção pelo HPV, no CECO e CECorof, e correlacionar as mesmas com informações clinicopatológicas, visando um melhor entendimento da participação do sistema imune inato maduro na oncogênese viral em boca e orofaringe.

3) MATERIAIS E MÉTODO

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Histopatologia, Microscopia e Imunopatologgia e Análise Genética, DESCOL, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP). O estudo foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 478ª reunião ordinária realizada em 08/10/2018 e enquadrada na categoria aprovado, de acordo com o processo HCRP Nº 11582/2018.

3.1 Seleção da amostra

Neste estudo foram selecionados 80 casos de CEC (correspondendo a 40 casos de CECO e 40 CECorof), blocos de parafina, pertencentes aos Arquivos do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Foi realizado um estudo retrospectivo, cujos dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos formulários clínicos de encaminhamento e pertencentes ao HCFMRP-USP.

3.2 Técnica imunoistoquímica

Foram realizados cortes de 3 µm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas devidamente revestidas com organo-silano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os cortes obtidos foram submetidos à técnica imunoistoquímica pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase (Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rb/Mo/Goat, K0690, Dako) para avaliar anticorpos individuais (**Tabela 01**).

Marcador	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação	Marcação	Controle
CD83	Leica Biosystems Newcastle, UK	1H4b	1:100	Ácido cítrico pH6	Células dendríticas maduras	Tonsila palatina
CD208	Dendritics, Lyon, France	1010E.101	1:500	Ácido cítrico pH6	Células dendríticas maduras	Tonsila palatina

Tabela 1. Padronização dos anticorpos primários utilizados no presente estudo.

3.3 Técnica de hibridização in situ para HPV

Nessa técnica foi realizado os cortes histológicos de 3 µm de espessura. Para a desparafinização dos cortes, o tecido passou por duas trocas de xilol de 10 minutos cada. Em seguida foram hidratados em álcoois 90°, 70°, 50° e lavados em água destilada por dois minutos. Para o pré-tratamento das amostras foi realizado um tampão citrato de pH6 e colocado em uma cuba de plástico por 40 minutos em banho maria entre 95°-99°C, após esse tempo, deixou esfriando essa solução por 20 minutos em temperatura ambiente. Lavar em água destilada por duas vezes e logo após isso realizou a inativação da peroxidase endógena pela adição de peróxido de hidrogênio a 20 volumes por 10 minutos e novamente lavou duas vezes em água destilada, passando em TBST por 5 minutos e delimitando a amostra com caneta. No momento da desnaturação e hibridização, foram pingadas 2 gotas (40 µL) da sonda de HPV (Amplo espectro [Dako, código Y1404] incluindo os tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51 e 52), (Baixo risco [Dako, código Y1411] HPV tipo 6 e 11) e (Sonda biotiniladas direcionada para genótipos de HPV de alto risco [Dako, código Y1443], incluindo HPV do tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68), cobrindo com uma

lamínula limpa 18x18, as lâminas foram colocadas no hibridizador (Hybridizer – Dako Colorado, Inc.) já na programação com a função DNA HPV, a temperatura de desnaturação foi de 92°C por 5 minutos e de hibridização é de 37°C over night por 16 horas. Depois disso foram tiradas as lâminas e colocadas em tampão TBST por 5 minutos em temperatura ambiente. Tirou-se as lamínulas e transferiu para outro tampão TBST limpo. A solução estringente foi levada a banho maria a 48°C, onde as lâminas foram colocadas e aguardadas por 20 minutos, logo após esse tempo foram lavadas em água destilada e depois colocadas em TBST por 5 minutos. A estreptavidina primária devidamente diluída em 1:100, 30 minutos antes do uso foi aplicada sobre a lâmina e encubadas em câmara úmida na temperatura ambiente 15 minutos, logo após foram lavadas em 3 banhos de TBST por 5 minutos. Foi aplicado nesse momento 3-4 gotas de biotinil tiramida e encubados por 15 minutos, e lavados 3 vezes em TBST por 5 minutos cada lavagem. A estreptavidina secundária foi aplicada de 3-4 gotas sobre as amostras e também encubadas por 15 minutos, e novamente foram lavadas 3 vezes em TBST. Foi realizada a diluição do cromógeno com o substrato em um eppendorf, e pingado 50 µL em cada lâmina e encubadas por 5 minutos, todas lâminas foram lavadas em água corrente por 1 minuto. Para a coloração das lâminas, foi colocado hematoxilina de Carazzi por 1 minuto e novamente lavadas em água corrente por 5 minutos. As amostras foram desidratas em três trocas de álcoois absolutos, passadas em xilol de diafanização e xilol de montagem. A montagem das lâminas foi feita com Entellan Merck e lamínulas.

3.4 Técnica de Hibridização in situ para VEB (EBER)

Foram realizados cortes histológicos de 3 µm e depois desparafinizados em xilol duas vezes por 5 minutos. Para a hidratação do tecido, as lâminas foram passadas em álcool 99° e 95° por duas vezes de 3 minutos, e lavados em água pura (Mille Q) por três minutos. As amostras foram circuladas com caneta DAKO PEN e aplicado a Proteinase K sobre o tecido, foram colocados em câmara úmida por 30 minutos, depois foram lavadas em água pura (Milli Q) duas vezes por 3 minutos e colocadas em álcool 95° por 10 segundos e deixadas secar ao ar na câmara úmida por 5 minutos. Para a hibridização foram adicionadas 3-4 gotas de sonda PNA conjugada a fluoresceína (Dako, código Y5200) e cobertas com lamínulas 18x18. As lâminas foram levadas para o hibridizador (Hybridizer, Dako Colorado, inc.) o tempo de hibridização foi 1h e 30 minutos a 55°C, em seguida as lâminas foram colocadas em TBS por 5 minutos para descolar as lamínulas. Em uma cuba já em banho maria com solução

estringente pré-aquecida a 55°C, foram colocadas as lâminas por 25 minutos, e depois desse tempo foram novamente colocadas em TBS para ficar em temperatura ambiente. As amostras foram colocadas em câmara úmida e adicionou 3-4 gotas de anti-FIT/AP e encubadas por 30 minutos, em seguida lavou duas vezes em TBS por 3 minutos cada e em água pura (Milli Q) duas vezes de 1 minuto. Foi adicionada 3-4 gotas de substrato (cloreto de 4-nitroazul tetrazólio / substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato combinado com levamisole (DAKO, código K 5201) e encubadas por 45 minutos em câmara úmida, e novamente lavadas, nesse momento foram lavadas rapidamente em água destilada. A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Carazzi por 1 minuto e a montagem em meio aquoso foi realizada com Glycergel (Dako, código C0563).

3.5 Documentação fotográfica das lâminas de imunoistoquímica e hibridização in situ

Logo após a confecção das lâminas de imunoistoquímica e hibridização in situ, foi realizada a documentação fotográfica de cada uma delas com a utilização do microscópio óptico. Para cada um dos casos fotografados, os marcadores CD83 e CD208 foram avaliados individualmente. Foi realizada a análise imunoistoquímica e contagem parcial tanto na área de tumor quando na área de estroma, presentes nas seguintes imagens. Em relação ao HPV, marcação puntiforme (integrada) intranuclear foi considerado positivo, já para EBER marcação nuclear azul intensa e homogênea foi considerado positivo.

3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados com Prism versão 5.0 (Graphpad, San Diego, CA, EUA). A distribuição normal foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilks. Nas amostras com distribuição normal, foram aplicados o teste t de Student e a Correlação de Pearson. Nas amostras que apresentaram distribuições não normais, o teste U de Mann-Whitney e a correlação de Spearman, foram aplicados. Um valor de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4) RESULTADOS

Foi realizada a seleção de 40 casos de CECO e 40 casos de CECorof. Após avaliação dos resultados, obtemos o perfil dos casos com distribuição por sexo, faixa etária, tabagistas, etilistas e por localizações mais frequentes.

4.1 CECorof

De acordo com os resultados, dos 40 casos de CECorof, 35 (87,5%) eram do sexo masculino e 05 (12,5%) do sexo feminino. A idade variou de 41 a 86 anos, com uma média de 58 anos de idade. Além disso, 24 (60%) eram tabagistas e 15 (37,5%) etilistas (**Tabela 02**).

As localizações mais comumente encontradas foram (em ordem decrescente): base de língua (11 casos), orofaringe sem outra especificação (SOE) (10 casos), amígdala palatina (9 casos), pilar amigdaliano (5 casos), palato mole (4 casos) e úvula (1 caso). Os tipos histológicos são mostrados na **Figura 01**.

Em relação à infecção pelo HPV, através de hibridização in situ, 11 casos (27,5%) foram positivos para HPV de amplo espectro, 8 (20%) para HPV de alto risco e 4 (10%) para HPV de baixo risco (**Figura 02**). Todos os casos foram EBV (EBER1/2) negativos.

4.2 CECO

Dos 40 casos de CECO, 30 (75%) eram do sexo masculino e 10 (25%) do sexo feminino. A idade variou de 32 a 76 anos, com uma média de 61 anos de idade. Além disso, 21 (52,5%) eram tabagistas e 14 (35%) etilistas (**Tabela 02**).

As localizações mais comuns encontradas foram (em ordem decrescente): borda lateral da língua (12 casos), soalho (12 casos), mucosa oral SOE (6 casos); gengiva, língua SOE, trígono retromolar, palato duro e mucosa jugal (com 2 casos cada). Os tipos histológicos são mostrados na **Figura 01**.

Em relação à infecção pelo HPV, através de hibridização in situ, 7 casos (17,5%) foram positivos para HPV de amplo espectro, 6 (15%) para HPV de alto risco e 2 (5%) para HPV de baixo risco. Todos os casos foram EBV (EBER1/2) negativos.

Dados	**CECO**	**CECorof**
Sexo	75% masculino 25% feminino	87,5% masculino 12,5% feminino
Idade (média)	60,25 anos	58,55 anos
Tabagismo	52,5% tabagistas 27,5% ex-tabagistas	57,5% tabagistas 37,5% ex-tabagistas

	5% não relatou 15% não tabagistas	2,5% não relatou 2,5% não tabagistas
Etilismo	32,5% etilistas 32,5% ex-etilistas 7,5% não relatou 27,5% não etilistas	40% etilistas 42,5% ex-etilistas 2,5% não relatou 15% não etilistas
Radioterapia	70% realizaram 5% não relatou 25% não realizaram	75% realizaram 12,5% não relatou 12,5% não realizaram
Quimioterapia	50% realizaram 5% não relatou 45% não realizaram	57,5% realizaram 12,5% não relatou 30% não realizaram
Metástase	17,5% ocorreram 10% não relatou 72,5% não ocorreram	17,5% ocorreram 17,5% não relatou 65% não ocorreram
Recidiva	32,5% ocorreram 12,5% não relatou 55% não ocorreram	30% ocorreram 22,5% não relatou 47,5% não ocorreram
HPV amplo espectro	17,5% positivo 67,5% negativo 15% ausência de tecido	27,5% positivo 65% negativo 7,5% ausência de tecido
HPV alto risco	15% positivo 62,5% negativo 22,5% ausência de tecido	20% positivo 72,5% negativo 7,5% ausência de tecido
HPV baixo risco	5% positivo 77,5% negativo 17,5% ausência de tecido	10% positivo 80% negativo 10% ausência de tecido

Tabela 2: Características clinicopatológicas dos casos de CECO e CECorof.

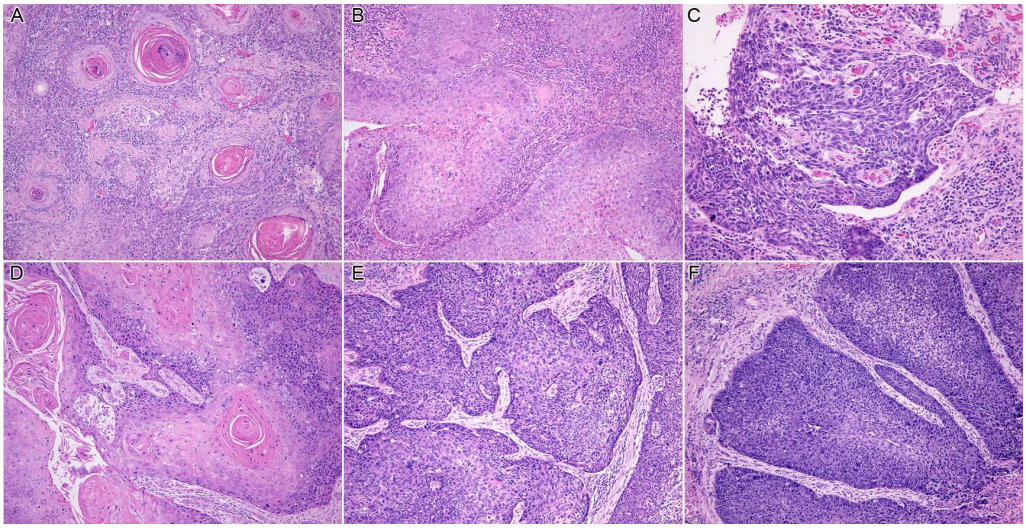


Figura 01. Classificação histopatológica de CECO e CECOrof (coloração de hematoxilina e eosina). (A) CECO bem diferenciado; (B) CECO moderadamente diferenciado; (C) CECO pouco diferenciado; (D) CECorof queratinizante; (E) CECorof híbrido; (F) CECorof não-queratinizante (aumento, x400).

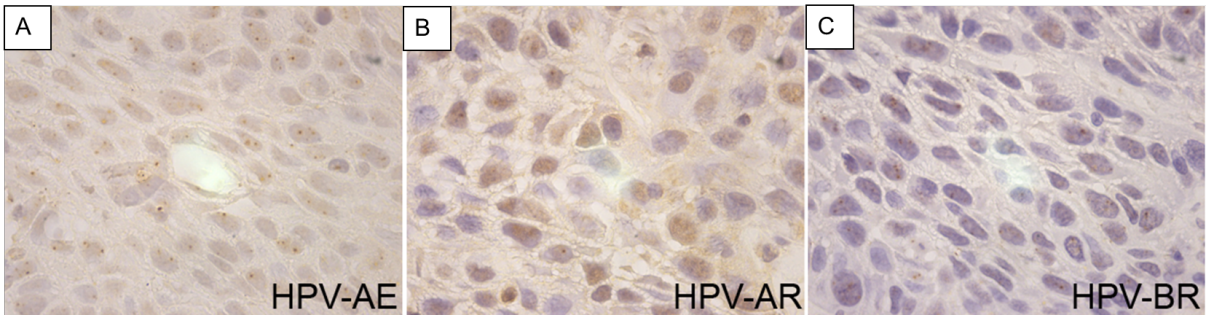


Figura 02. Análise de hibridização in situ mostrando CECorofs positivos para HPV de amplo espectro (A), alto risco (B) e baixo risco (C). Todos estes casos exibiram padrão integrado (x400).

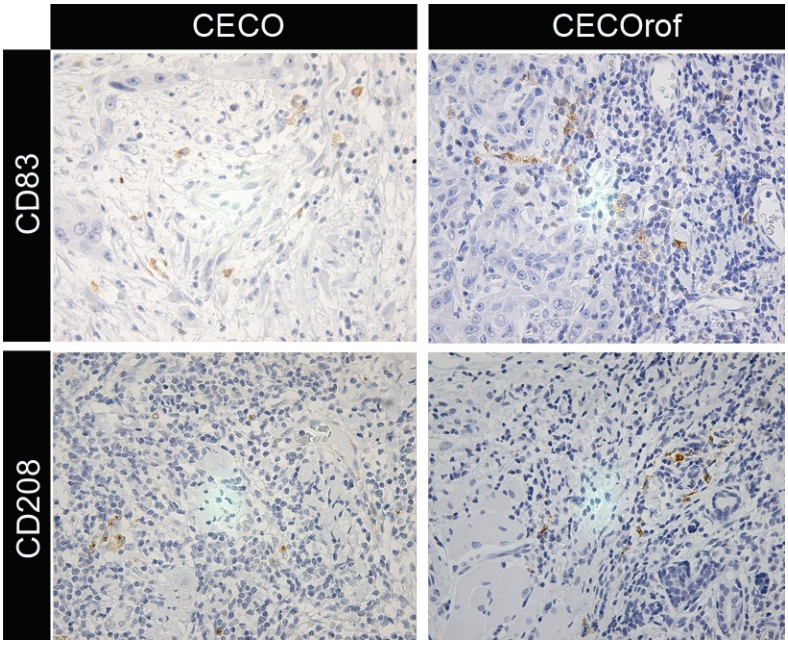


Figura 03. Análise imunoistoquímica dos marcadores CD83 e CD208 mostrando células imunocoradas (marrom) no estroma tumoral do CECO e CECorof (x400).

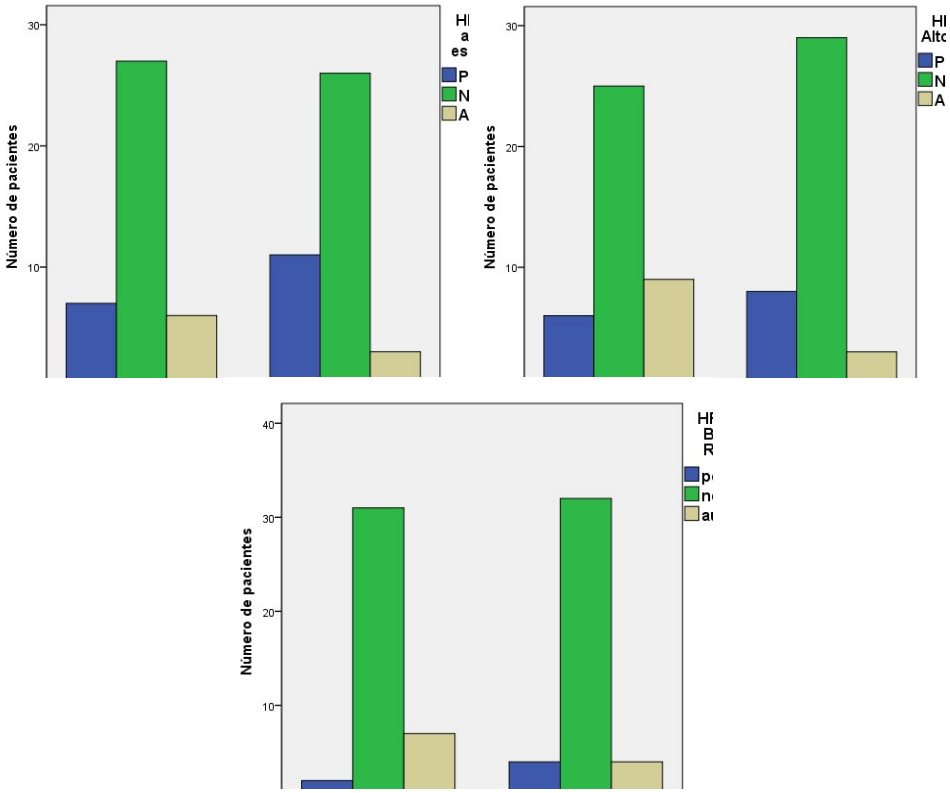


Figura 04. Gráficos mostrando a frequência de casos HPV+ e HPV- no CECO e CECorof, para sondas de amplo espectro, alto risco e baixo risco. Note que o CECorof apresentou um ligeiro maior número de casos HPV+ para as três sondas de HPV.

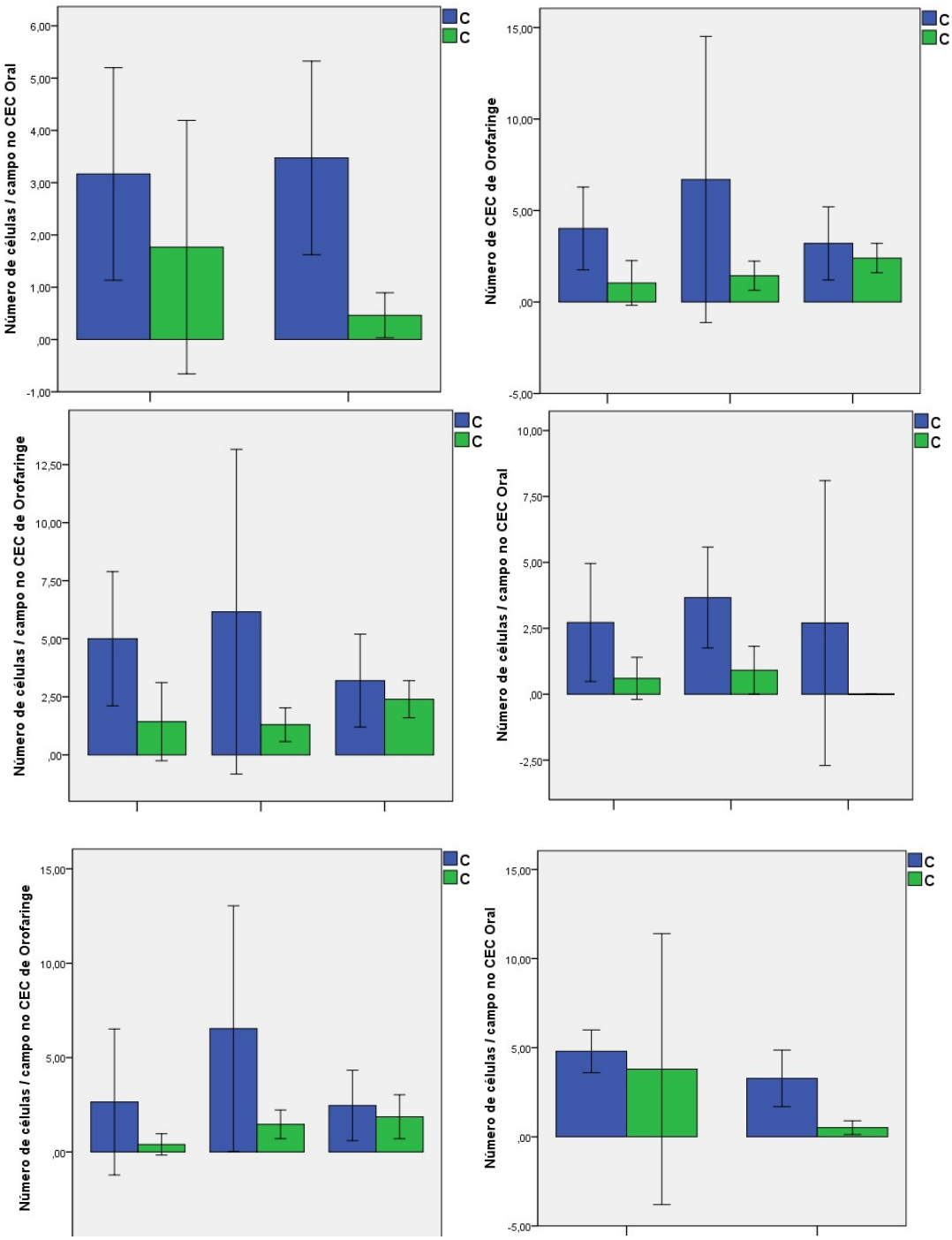


Figura 05. Os gráficos mostram a correlação entre a frequência de células CD83+ e CD208+ em relação ao status de infecção pelo HPV no CECO e CECorof.

Neste estudo avaliamos comparativamente 40 casos de CECO e 40 casos de CECorof, em relação à expressão de CD83 e CD208, considerados marcadores de CD maduras. No CECO, 3,4±3,7 e 0,8±1,7; já no CECorof, 3,1±2,6 e 1,4±1,9, corresponderam às médias±DP de células CD83+ e CD208+, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparando células CD83+ e CD208+ nos compartimentos tumorais do CECO (p=0,0007) e CECorof (p=0,0003). No entanto quando comparando ambos os CECO e CECorof, a frequência de células CD83+ (p=0,7767) e CD208+ (p=0,0929) mostrou níveis similares (**Figuras 03-05**). Além disso, não houve correlação estatisticamente significativa quando comparando células CD83+ e CD208+ em relação ao status de infecção pelo HPV, para os três tipos de sondas usadas (amplo espectro, alto risco e baixo risco) (**Figura 04**).

Não houve diferença estatisticamente significante quando comparando a idade e gênero com a frequência de CD maduras e status de infecção pelo HPV em ambos os carcinomas.

Com base nesses gráficos (**Figura 05**), é possível verificar que não houve correlação entre as variáveis analisadas.

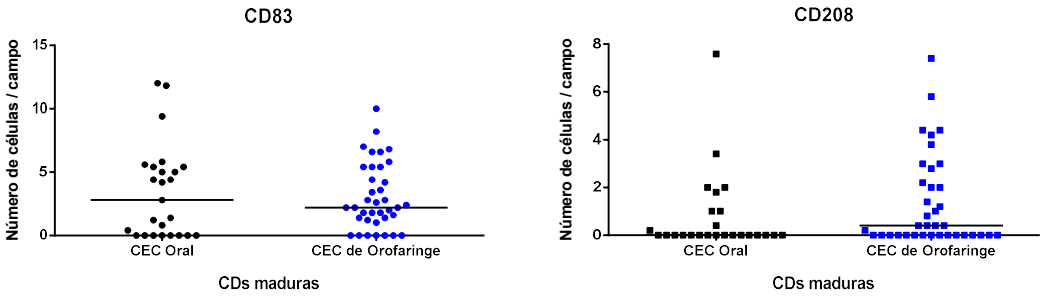


Figura 06. Gráficos mostrando a distribuição de células CD83+ e CD208+ no CECO e CECorof.

Observe que a distribuição destas células dentro de cada tipo de carcinoma mostra predomínio de células CD83+ do que células CD208+. No entanto, há níveis similares destas células quando comparando o CECO e CECorof (**Figura 06**).

5) DISCUSSÃO

Como já relatado na literatura, o CEC afeta frequentemente pacientes do sexo masculino (Rivera, 2015). Tal condição não foi diferente do encontrado nessa pesquisa, já que cerca de 80% dos pacientes analisados eram homens, com uma média de 65 anos.

Outro aspecto importante a ser considerado é sobre os fatores de risco do CECO, sendo o tabagismo e consumo de álcool os principais fatores associados com o desenvolvimento do CEC (Rivera, 2015). Neste estudo, mais de 50% dos pacientes diagnosticados com CECO eram fumantes e mais de 30% etilistas. Para o CECorof as porcentagens eram de 57,50% e 40% de pacientes fumantes e etilistas, respectivamente. Esses dados confirmam que pacientes com CECO e CECorof apresentam também dados similares em relação aos fatores de risco do fumo e álcool, uma tendência que não era observada no CECorof, inicialmente considerada frequente em pacientes jovens sem hábitos de risco (American cancer Society, 2021).

Como informação aos profissionais da saúde, principalmente aos cirurgiões-dentistas, as regiões mais acometidas pelo CECorof foi a base de língua e tonsila palatina; enquanto no CECO a borda lateral dos 2/3 anteriores da língua e soalho são principalmente afetados. Por isso vale ressaltar a importância de sempre avaliar criteriosamente esses locais anatômicos, os quais, na maioria das vezes, são negligenciados durante a avaliação clínica intraoral.

Dados da literatura mostram que infecção pelo HPV são mais frequentes no CECorof do que no CECO, devido, entre outros fatores, ao comportamento sexual sem proteção (Jiang & Dong, 2017). Neste estudo também verificamos um maior número de casos HPV+ no CECorof do que no CECO. Embora a diferença não foi estatisticamente significante, nossos achados suportam dados em outras populações sobre o papel etiopatogenético do HPV no CECorof, sugerindo que protocolos imunoterapeuticos podem ser indicados nestes pacientes.

O fato de a presente pesquisa ter comparado a presença e quantidade de CDs maduras (CD83 e CD208) no CECO e CECorof em relação aos status da infecção pelo HPV foi visando avaliar o status de maturação do sistema imune inato, através de CDs, influenciado pela presença do HPV em dois tipos de carcinoma prevalentes na região de cabeça e pescoço. Além disso, fornecer dados adicionais para poder explicar o porquê o CECorof tem um melhor prognóstico quando comparado ao CECO. As células CD83+ e CD208+ possuem uma importante função antitumoral, já que conseguem ativar células T, as quais podem eliminar

células neoplásicas (Anne & Smitha, 2019). Portanto, se fosse verificado um maior número dessas células no CECorof HPV+, essas células poderiam ajudar explicar as diferenças relatadas no CECO e CECorof em relação à infecção pelo HPV. No entanto, após a análise estatística, não houve uma correlação estatisticamente significativa entre a frequência de CDs maduras no CECorof e CECO, associados ou não com HPV. Nesse sentido, outros estudos devem ser feitos para corroborar nossos achados e/ou incluir outros tipos de CDs visando uma análise mais abrangente para o melhor entendimento da participação do sistema imune inato maduro na oncogênese viral em boca e orofaringe.

Sobre a análise quantitativa de CDs que expressam CD83 e CD208 no CECO e CECorof, houve um significante maior número de células CD83+ do que CD208+ em ambos tipos de CEC. Esses achados fornecem base para desenhos de protocolos imunoterapêuticos os quais podem ter impacto no prognóstico de pacientes com CECO e CECorof, focando no marcador CD83. É necessário mencionar que CD83 é um marcador menos específico das CDs maduras, ou seja, outras células, como os linfócitos, podem expressar esse marcador (Grosche et al., 2020); no entanto, em nosso estudo somente células com morfologia dendrítica foram consideradas, excluindo a possibilidade de contagem de células linfoides.

6) CONCLUSÕES

1. O CECO e CECorof afetaram frequentemente pacientes do sexo masculino, fumantes e/ou tabagistas, com média de idade de 60 anos;
2. O CECorof apresentou maior prevalência de infecção pelo HPV do que o CECO, porém, a diferença não foi estatisticamente significativa.
3. Houve um significativo maior número de CDs maduras CD83+ do que CD208+ em ambos os tipos de CEC.
4. Não houve correlação estatística significante entre a frequência de CDs maduras com o status de infecção pelo HPV no CECorof e CECO.
5. Nossos resultados sugerem que as CDs maduras CD83+ e CD208+ participam nos mecanismos imunes no CECO e CECorof, independente do status de infecção pelo HPV.

7) REFERÊNCIAS

ADEMA GJ. Dendritic cells from bench to bedside and back. **Immunol Lett**, v.122, n.2, p. 128-130, Fev. 2009

ANNE GOWDA VM, SMITHA T. The dendritic cell tool for oral câncer treatment. **J Oral Maxillofac Pathol**, v.23, n.3, p.326-329, Sep-Dec.2019

American cancer Society (2021). https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/about/what-is-oral-cavity-cancer.html

CASTRO TP, BUSSOLOTI FILHO I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.72, n.2, p. 272-282, Mar-Apr. 2006

CONTI BJ, SANTIAGO KB, SFORCIN JM. Dendritic cells: a short review. **Biosaúde**, v.16, n.1, p. 28-33, 2014

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**, v.45, n.6, p. 418-424, Jul. 2016.

DEDIVITIS RA, FRANÇA CM, MAFRA AB, GUIMARÃES FT, GUIMARÃES AV. Clinic and epidemiologic characteristics in the with squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.70, n.1, p. 35-40, Jan-Fev. 2004.

DEVARAJA K, AGGARWAL S, VERMA SS, GUPTA SC. Clinico-pathological peculiarities of human papilloma virus driven head and neck squamous cell carcinoma: A comprehensive update. **Life Sci**, v.245, Mar. 2020: 117383.

D'SOUZA S, Addepalli V. Preventive measures in oral cancer: An overview. **Biomed Pharmacother,** v.107, p. 72-80, Ago. 2018

GABRILOVICH DI, CHEN HL, GIRGIS KR, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic. **Nat Med, v.** 2, n.10, p. 1096-1103, Out. 1996

GROSCHE L, KNIPPERTZ I, KÖNIG C, ROYZMAN D, WILD AB, ZINSER E, STICHT H, MULLER YA, STEINKASSERER A, LECHMANN M. The CD83 Molecule - An Important Immune Checkpoint. **Front Immunol**, v. 11 721, Abr. 2020

Instituto Nacional de Cancer. Estimativas de novos casos de câncer de boca no Brasil no ano de 2020. Disponível em https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca/profissional-de-saude.

JIANG S, DONG Y. Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. **Curr Probl Cancer, v.** 41, n.5, p. 323-327, Mar. 2017.

JUNIOR CAJ, ALVES FA, PEREIRA CCT, BIAZEVIC MGH, JUNIOR DCP, NUNES FD. Oral cancer based on scientific evidences. **Rev**. **Assoc. Paulo. Cir. Dente**, v. 67, n.3, p. 178-186, 2013.

NEVILLE BRAD W., DOUGLAS D. DAMM, CARL M. ALLEN, e JERRY E. Bouquot. **Patologia Oral e Maxilofacial**. Editora Guanabara Koogan. 4º Edição, p. 343-354. 2016

RIVERA C. Fundamentos do câncer bucal. **Revista internacional de patologia clínica e experimental,** v.8, n.9, p.11884-11894, 2013.

SCULLY C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal,** v.16, n.3, p. 306-311, Maio. 2011

SCULLY C, BAGAN J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis**, v. 15, n.6, p. 388-399, 2009.

SILVA PQL. Imunoterapia Tumoral com Células Dendríticas. Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas. Porto, 2013.

SIMONATO LE, GARCIA JF, SUNDEFELD ML, MATTAR NJ, VERONESE LA, MIYAHARA GI. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. **J Oral Pathol Med, v.**37, n.10, p. 593-598, Nov. 2008.

STEINMAN RM, BANCHEREAU J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449 7161, p. 419-426, Set. 2007.

TINOCO JA, SILVA AF, OLIVEIRA CA, RAPOPORT A, FAVA AS, SOUZA RP. Human papillomavirus (HPV) infection and its relation with squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n.3, p. 252-256, Jul-Sep. 2004.

UM E, OH JM, PARK J, SONG T, KIM TE, CHOI Y, SHIN C, KOLYGINA D, JEON JH, GRZYBOWSKI BA, CHO YK. Immature dendritic cells navigate microscopic mazes to find tumor cells. **Lab Chip**, v. 19, n.9, p. 1665-1675, Apr. 2019.

VEGLIA F, GABRILOVICH DI. Dendritic cells in cancer: the role revisited. **Curr Opin Immunol**, v.45, p. 43-51, Apr. 2017

ANEXOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

OFÍCIO Nº 2854/2018
CEP/MGV

RIBEIRÃO PRETO, 11 DE OUTUBRO DE 2018

PREZADOS SENHORES,

O TRABALHO INTITULADO **"CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA COMPARATIVA DE SUBGRUPOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E ONCOGÊNESE VIRAL NO CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL E OROFARÍNGEO"**, FOI ANALISADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA, EM SUA 478ª REUNIÃO ORDINÁRIA REALIZADA EM 08/10/2018 E ENQUADRADO NA CATEGORIA: APROVADO, BEM COMO A SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, DE ACORDO COM O PROCESSO HCRP Nº 11582/2018.

ESTE COMITÊ SEGUE INTEGRALMENTE A RESOLUÇÃO Nº 466/12 CNS/MS.

LEMBRAMOS QUE DEVEM SER APRESENTADOS A ESTE CEP, O RELATÓRIO PARCIAL E O RELATÓRIO FINAL DA PESQUISA.

ATENCIOSAMENTE.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
JORGE ESQUICHE LEÓN
PROF.DR.ALFREDO RIBEIRO DA SILVA(ORIENTADOR)
Depto. de Patologia e Medicina Legal

Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEx-CoG n° 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **aprovou,** fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Michel Reis Messora
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

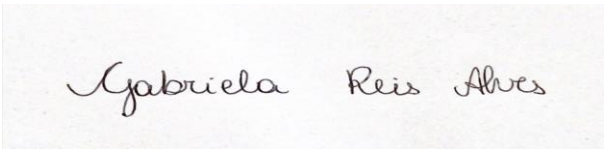
Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

DADOS PESSOAIS
Nome: Gabriela Reis Alves
N° USP: 10294686 Período: 9° período
Telefone de contato: (35) 99868-4297 E-mail USP: gabi_alves99@usp.br
INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
Nome do Orientador(a): Jorge Esquiche León
Departamento: DESCOL
Área de conhecimento: Diagnóstico
Subárea: Carcinoma Espinocelular
MODALIDADE
Modalidade:
Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional
ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)

Eu, Prof(a). Dr(a). Jorge Esquiche León , aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.



Gabriela Reis Alves

Jorge Esquiche León