RENATA HELENA FERREIRA CAMEZ PIERRONI DIAS

Análise do fenômeno da imunotolerância na fotocarcinogênese em lábio

São Paulo

2011

RENATA HELENA FERREIRA CAMEZ PIERRONI DIAS

Análise do fenômeno da imunotolerância na fotocarcinogênese em lábio
Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Marília Trierweiler Martins

São Paulo

2011

Dias RHFCP. Análise do fenômeno da imunotolerância na fotocarcinogênese em lábio. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

***Ao meu marido José Alexandre**, por compreender e suportar minha ausência, durante esses anos em que me dediquei a este trabalho. Obrigada pelo incentivo em todos os momentos difíceis e por nunca reclamar de nada, ainda que tivesse razão. Não sei se um dia conseguirei retribuir todo seu amor por mim. Te amo muito!*

***À minha mãe Susi**, por me ensinar o valor de uma boa educação e por seu imenso esforço em me conduzir à tão sonhada Universidade de São Paulo. Obrigada pelo apoio em todos os momentos de angústia e por seu amor incondicional.*

***Ao meu pai Pedro**, por me ensinar os valores que tenho hoje como a honestidade, a bondade e, acima de tudo, a alegria de viver, que é sua principal característica.*

***À minha irmã Taynã**, por seu apoio total aos meus sonhos, por seu jeito alegre de encarar as dificuldades e, ainda que seja mais nova que eu, por seus sábios conselhos. Amo muito você!*

AGRADECIMENTOS

À **Professora Doutora Marília Trierveiler Martins** que me aceitou como orientanda de iniciação científica, quatro anos atrás, e me apresentou ao mundo da fotocarcinogênese em lábio. Obrigada pela oportunidade de aprender tanto com você nesses anos todos e por me orientar em todos os aspectos da minha vida. Sua determinação em prol de uma conquista maior é digna de muita admiração e é um grande ensinamento que vou levar comigo. Agradeço também pelo imenso carinho com que sempre me tratou e pela compreensão nos momentos de crise. Para mim, você é um exemplo de caráter e de competência profissional.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, Profa Marina Helena C. Gallottini, Profa. Suzana C. Orsini Machado de Souza, Prof. Décio dos Santos Pinto Jr., Profa Karen Lopez Ortega, Prof. Fábio Daumas Nunes e Profa Andrea Mantesso, pois cada um de vocês contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao **Professor Doutor José Leopoldo Ferreira Antunes** com quem fiz monitoria em odonto social durante o ano de 2006 e que me indicou o caminho a seguir, quando manifestei minha vontade de fazer iniciação científica para estudar o câncer. Sou muito grata ao senhor pela sensibilidade em perceber que não poderia ser sua aluna de iniciação, uma vez que minha vocação era a patologia. Obrigada por me levar até a Marília. Hoje percebo o quanto sua atitude estava certa.

À minha amiga e colega de graduação e pós-graduação **Gabriela Nagata**, que com sua alegria contagiante sempre me incentivou nos momentos mais críticos, ficando sempre ao meu lado, tenho certeza de que nossa amizade será para sempre.

Ao **Bruno Matuck**, aluno de iniciação, pela colaboração neste trabalho e por tornar um dia de trabalho intenso no laboratório mais agradável, e até divertido.

À **Cláudia**, pela torcida e convivência diária sempre muito agradável.

À **Alexandra Fontes e Patrícia Adachi**, pela paciência e pelos ensinamentos durante minha iniciação científica.

Ao **Paulo Braz**, pelas ideias desse trabalho e pelos momentos divertidos durante a pós-graduação.

A todos os meus **colegas de pós-graduação**, pelo convívio harmonioso e pelos eventos comemorativos sempre divertidíssimos. Em especial:

À **Carla**, que tornou minha moradia em São Paulo mais feliz.

À **Michella**, por me ensinar a ter mais calma, sem perder a perseverança e a autoconfiança.

À **Rita**, pelo carinho e espontaneidade, que me inspiram.

À **Karin**, pela amizade e força que sempre me impulsionaram em busca dos meus objetivos.

Agradeço a **Elisa**, que me recebeu tão bem desde o primeiro dia que entrei no laboratório de Patologia Cirúrgica. Obrigada por me ensinar a encarar a vida com mais otimismo e alegria.

À **Adriana** por aceitar fazer parte deste trabalho e por me ajudar sempre que precisei.

Ao **Juvani**, pelo apoio e amizade.

Às secretárias **Zilda, Néia e Nair** que nunca mediram esforços em me ajudar sempre que fosse preciso.

Aos meus avós **Alcides e Irene** pelo amor e pelas orações que me conduzem ao sucesso.

Ao **Programa de pós-graduação** que, muito bem delineado, possibilitou tanto a atividade de pesquisa, quanto de ensino, por meio do plano PAE, contribuindo não só para a experiência de bancada, mas também para a habilidade didática do aluno de pós-graduação em patologia bucal.

À agência **CAPES**, pelo apoio financeiro deste trabalho, através da bolsa a mim concedida.

Muitos são os esforços, muitas são as
Expectativas, que exigem muita
Sabedoria, disciplina, coragem e
Trabalho duro. Sem dúvida,
Renúncias são necessárias, mas o
Amor pela ciência supera todas as
Dificuldades e, acima de tudo recompensa
Os que estão dispostos a aprender para ensinar

Renata Caramez

RESUMO

Dias RHFCP. Análise do fenômeno da imunotolerância na fotocarcinogênese em lábio [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

A radiação ultravioleta (UV) do sol é a principal responsável pelo desenvolvimento do câncer de pele não-melanoma. A radiação UV induz efeitos biológicos, que promovem a fotocarcinogênese, agindo diretamente sobre o DNA, provocando mutações. Porém, tudo indica que há um efeito indireto, que induz imunossupressão. O fenômeno fisiológico da imunotolerância, que é responsável pela prevenção de doenças autoimunes e pela modulação da resposta inflamatória, pode ser aproveitado por determinadas neoplasias para escaparem do controle imunológico e reforçado pela radiação UV. Os personagens principais da imunotolerância no ambiente tumoral são células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores (Treg), além de inúmeras citocinas imunossupressoras. Com o objetivo de avaliar a imunotolerância na fotocarcinogênese em lábio, foram analisadas, por meio da técnica de imuno-histoquímica, 75 amostras de material fixado e embocado em parafina, sendo 44 casos de queilite actínica (QA) nos três graus de displasia epitelial (discreta, moderada e intensa), 18 casos de carcinoma epidermoide de lábio (CEL) e 12 espécimes representativos de lábio normal (LN). Tais amostras foram submetidas aos anticorpos anti-CD83, anti-DEC-205, anti-FOXP3, anti-CD1a e anti-CD207. Foi efetuada a contagem de células em 3 campos significativos, escolhidos aleatoriamente, e obtida a média de células contadas/campo. Assim, os resultados mostraram uma grande quantia de linfócitos Treg FOXP3⁺ tanto no CEL como na QA. Também houve uma expressão acentuada de DEC-205 nos casos estudados. Quanto à presença de células de Langerhans CD207⁺ e CD1a⁺, notou-se um acúmulo no epitélio das lesões de QA e nas ilhotas do CEL, além de algumas células estarem presentes no tecido conjuntivo. Já para o marcador CD83, a contagem de células positivas foi baixa em relação aos demais marcadores tanto no CEL como na QA. Portanto, sugere-se um

microambiente imunotolerante tanto no início, quanto no estabelecimento do processo da fotocarcinogênese em lábio.

Palavras-chave: Queilite actínica. Carcinoma de células escamosas. Fotocarcinogênese. Tolerância imunológica. Células de Langerhans.

ABSTRACT

Dias RHFCP. Analysis of the immunotolerance phenomenon of in the lip photocarcinogenesis [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

Ultraviolet radiation (UV) is the main cause of non-melanoma skin cancer and induces biological effects that promote photocarcinogenesis by causing mutations directly on DNA. However, there seems to be an indirect effect, which induces immunosuppression. The physiological phenomenon of immune tolerance, which is responsible for the prevention of autoimmune diseases and the modulation of inflammatory response, may be used by certain tumors to escape immune control. This phenomenon is enhanced by UV radiation. Immature dendritic cells, regulatory T cells (Treg), and also several immunosuppressive cytokines play a central role in immune tolerance associated to the tumor environment. In order to assess the immune tolerance in lip photocarcinogenesis, we analyzed 75 samples represented by 44 cases of actinic cheilitis (AC), 18 cases of lip squamous cell carcinoma (LSCC) and 12 specimens of normal lip. Sections were submitted by means of immunohistochemistry, to the antibodies against CD83, DEC-205, FOXP3, CD1a and CD207. Positive cells for each marker were counted in three high-power fields in each section and the results expressed by the mean number of cells per field. The results showed a large amount of Treg FOXP3⁺ in both AC and LSCC. There was also a strong staining for DEC-205 in the cases studied. There were an increased number of CD1a⁺/CD207⁺ Langerhans cells in the AC epithelium and LSCC islets, as well as a few cells in the connective tissue. For the marker CD83, the count of positive cells was low compared to other markers for both lesions. Therefore, we suggest an immune tolerant microenvironment both at the beginning, and in the establishment of the lip photocarcinogenesis process.

Keywords: Actinic cheilitis. Squamous cell carcinoma. Immune tolerance, Langerhans cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Marcação imuno-histoquímica para CD83, DEC-205 e FOXP3. A) Positividade para CD83 em CEL (400x no original); B) Células positivas para DEC-205 em QA com displasia epitelial intensa (100x); C) FOXP3 presente no núcleo de linfócitos em QA com displasia intensa (100x); D) Positividade nuclear e citoplasmática para FOXP3 em CEL (100x).....52

Figura 5.2 - Marcação imuno-histoquímica para CD1a e CD207. A) Células positivas para CD1a em QA com displasia epitelial discreta (400x no original); B) Positividade para CD1a no CEL; C) Células marcadas para CD207 em QA com displasia intensa (400x); D) Positividade para CD207 em CEL (100x). Estreptavidina-biotina.....53

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 – Critérios para o diagnóstico e classificação de displasias epiteliais propostos pela OMS.....	32
Quadro 4.2 – Interpretação dos valores de P, segundo o programa GraphPad Prism.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Média de células positivas por campo para cada um dos anticorpos estudados.....	39
Tabela 5.2 – Porcentagens de células marcadas com anti-CD207 em cada grupo analisado.....	44
Tabela 5.3 – Porcentagens de células marcadas com anti-CD1a em cada grupo analisado.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 – CD83: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado.....	41
Gráfico 5.2 – DEC-205: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado.....	43
Gráfico 5.3 – CD207 Epitélio: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado.....	45
Gráfico 5.4 – CD207 Conjuntivo: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado.....	46
Gráfico 5.5 – CD1a Epitélio: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado.....	48
Gráfico 5.6 – CD1a Conjuntivo: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado.....	48
Gráfico 5.7 – FOXP3: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado.....	49
Gráfico 5.8 – QA: Média de células contadas/campo para cada marcador utilizado.....	50
Gráfico 5.9 – CEL: Média de células contadas/campo para cada marcador utilizado.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Carcinoma epidermoide de lábio.....	17
2.2 Queilite actínica.....	18
2.3 Fotocarcinogênese	20
2.4 Fenômeno da imunotolerância	24
2.4.1 Células dendríticas.....	25
2.4.2 Linfócitos T reguladores.....	27
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Seleção das amostras	31
4.2 Análise morfológica	31
4.3 Classificação do grau de displasia.....	32
4.4 Imuno-histoquímica.....	32
4.5 Análise dos resultados	34
4.6 Análise estatística	35
5 RESULTADOS	37
5.1 Morfologia	37
5.2 Expressão imuno-histoquímica	38
5.2.1 CD83.....	41
5.2.2 DEC-205	42
5.2.3 CD207.....	43
5.2.4 CD1a.....	46
5.2.5 FOXP3	49
5.2.6 Avaliação conjunta dos resultados para queilite actínica.....	50
5.2.7 Avaliação conjunta dos resultados para carcinoma epidermoide de lábio.....	50
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Grande parte das atividades econômicas e sociais da humanidade tradicionalmente tem sido desenvolvida ao ar livre, fazendo com que o homem se exponha cronicamente à radiação solar. Além disso, a estética sempre foi um aspecto valorizado pela sociedade desde a Grécia antiga. A necessidade de exposição ao sol e a constante busca da beleza, muitas vezes, trazem consequências graves à saúde, como a exposição à radiação ultravioleta (UV) tanto do sol, como de câmaras de bronzeamento, as quais aumentam em 75% o risco de câncer de pele por quem as utiliza antes dos 30 anos. Da mesma forma que a pele, o lábio também sofre alterações causadas pela radiação UV como a queilite actínica (QA) que é uma desordem potencialmente cancerizável e que precede o carcinoma epidermoide de vermelhão de lábio (CEL).

A radiação UV, embora tenha efeitos benéficos como o de promover a conversão de vitamina D para suas formas ativas, provoca efeitos tanto mutagênicos quanto imunossupressores, que podem ser capazes de iniciar e manter processos neoplásicos, pois embora haja evidências de que o sistema imunológico é capaz de eliminar células malignas, os mecanismos de evasão tumoral potencializam o estabelecimento de uma neoplasia. Tais mecanismos incluem o processamento antigênico aberrante por células neoplásicas, deleção de células T citotóxicas tumor-específicas, prejuízo de função das células dendríticas e recrutamento de células T reguladoras.

Nesse sentido, a fotocarcinogênese é iniciada principalmente por mutações induzidas pela radiação UV, no entanto, é o microambiente neoplásico que, provavelmente, determina e modifica a progressão das células tumorais. Desse modo, a compreensão de como ocorre a malignização da QA é fundamental para novas abordagens terapêuticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermoide de lábio

A incidência mundial do carcinoma epidermoide de lábio (CEL) ainda não está clara na literatura. Alguns autores consideram que essa é a forma mais comum de câncer oral, correspondendo a 25% de todos os casos¹. O CEL apresenta uma fisiopatologia condizente com a dos carcinomas presentes em pele submetida à exposição solar, sendo diferente do carcinoma intraoral². De acordo com a literatura, pode-se afirmar que o CEL é mais frequente em homens de pele clara (80% a 90% dos casos) e em pessoas submetidas aos raios solares de forma contínua e por período prolongado^{3, 4}. O tempo necessário de exposição ao sol para induzir as alterações no lábio, levando ao câncer, varia entre 20 e 30 anos, porém, em alguns indivíduos, esse processo ocorre mais rapidamente⁵.

A faixa etária mais frequentemente atingida está entre 60 e 70 anos de idade, sendo o lábio inferior a região mais afetada em virtude da posição anatômica que propicia a incidência direta dos raios ultravioleta (UV) do sol¹.

Clinicamente, as lesões são descritas como sendo ulceradas, com bordas elevadas, nítidas e endurecidas, com centro necrótico, que revela infiltração dos tecidos circundantes; geralmente assintomáticas no período inicial e de crescimento acelerado⁶.

Histopatologicamente, o CEL apresenta-se em ilhas e cordões invasivos de queratinócitos malignos. As células neoplásicas mostram-se alteradas quanto a sua morfologia, exibindo pleomorfismo, hipercromatismo nuclear, citoplasma eosinofílico, alterações na relação núcleo/citoplasma, além do aumento significativo do número de mitoses e mitoses atípicas. Ocorre, ainda, queratina no interior das ilhotas da neoplasia caracterizando as pérolas de queratina, fato que demonstra a manutenção funcional das

células epiteliais, apesar de malignas. Com frequência, o CEL apresenta-se bem diferenciado².

Até o presente, a melhor opção de tratamento para o CEL é a excisão cirúrgica, que, embora leve a resultados excelentes quanto à sobrevida do paciente — especialmente quando realizada nos estágios iniciais da doença —, representa um tratamento mutilador na face do paciente.

Neoplasias malignas que progridem a partir de lesões cancerizáveis, como é o caso do CEL, representam uma vantagem prognóstica por proporcionarem a chance de uma intervenção precoce e anterior ao estabelecimento da malignidade, pois os primeiros passos para o desenvolvimento do CEL podem ocorrer muitos anos antes do desenvolvimento da neoplasia, quando danos irreversíveis tanto no epitélio quanto no tecido conjuntivo da zona de vermelhão de lábio, causados pela ação cumulativa da radiação solar, constituem a lesão cancerizável queilite actínica (QA)⁷.

2.2 Queilite actínica

A QA é uma alteração, considerada potencialmente cancerizável, do vermelhão do lábio inferior, que resulta da exposição excessiva ou por período prolongado à radiação ultravioleta do sol^{2, 5, 8} principalmente a radiação UVB⁹. A lesão, inicialmente, apresenta-se discreta e assintomática, desenvolvendo-se lentamente^{2, 10}. Atinge, principalmente, pessoas de pele clara que não se bronzeiam facilmente. É predominante em indivíduos que trabalham ao ar livre, com exposição crônica aos raios solares. Pacientes do sexo masculino, de pele clara e com idade entre 40 e 80 anos são os mais atingidos^{5, 9, 11}.

Quanto às características clínicas, a QA apresenta-se de forma aguda ou crônica. A forma aguda é caracterizada por eritema e edema, ou ainda, por fissuras e úlceras, embora não apresente alterações epiteliais irreversíveis. Ocorre como resultado de exposição excessiva à radiação UV do sol por um curto período de tempo.

Em contrapartida, a forma crônica, irreversível, caracteriza-se por lábios ressecados, edemaciados, com rachaduras e difuso. Ocorre quando o período de exposição é prolongado¹².

Os achados histopatológicos da QA revelam hiperqueratose ou paraqueratose, acantose e áreas de atrofia do epitélio⁵. As atipias são relevantes e aparecem, de forma gradual, no epitélio de superfície, desde os graus mais leves até os mais severos. Diante disso, é possível que um diagnóstico clínico de QA seja um carcinoma *in situ* ou, até mesmo, invasivo, através do exame histopatológico^{13, 14}. Esse fato revela a enorme importância que a biópsia assume nessas lesões.

O tecido conjuntivo subjacente mostra uma faixa de alteração basofílica, acelular e amorfa das fibras elásticas e colágenas, denominada elastose solar, que é resultado da ação do componente ultravioleta do sol. Geralmente, um infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade variável está presente².

A literatura mostra que um pior prognóstico pode estar relacionado com a perda da nitidez do limite entre lábio e pele¹⁴ e com a existência de úlcera que não se repara, indicando que a transformação maligna já ocorreu¹⁰.

Para um tratamento adequado, a biópsia é uma opção necessária, pois os aspectos clínicos não são capazes de definir precisamente o diagnóstico, pois só o exame histopatológico pode revelar um possível processo de malignização⁹ ou um carcinoma epidermoide.

Os métodos de tratamento para a QA podem ser cirúrgicos (curetagem, laserterapia com CO₂, crioterapia, vermelhnectomia) ou não-cirúrgicos (dermoabrasão, quimioterapia com 5-fluoracil ou masoprocol, o “peeling” químico)^{14, 15}. Ainda que existam diversas opções de tratamento tópico, a vermelhnectomia permanece como padrão ouro quanto à eficácia¹⁶. Entretanto, as consequências pós-cirúrgicas constituem um fator de morbidade importante para o paciente, tanto por questões estéticas, como também por questões psicológicas implicadas nessa forma de tratamento.

Desse modo, a melhor compreensão do processo de estabelecimento e progressão da QA garante expectativas com relação ao encontro de marcadores de prognóstico confiáveis, além de novos tratamentos mais eficazes.

2.3 Fotocarcinogênese

Os três principais componentes do espectro solar, radiação UV, visível e infravermelho são coletivamente chamados de radiação óptica.

A radiação UV corresponde a uma pequena porção do espectro eletromagnético, cujo comprimento de onda está entre 100 e 400 nm. No entanto, a porção UV é subdividida em três regiões, pois os efeitos biológicos da radiação variam enormemente com o comprimento de onda.

De acordo com o encontro realizado em Copenhague, durante o Segundo Congresso Internacional sobre Luz, em agosto de 1932, recomendaram-se os seguintes limites: UVA (400-315 nm), UVB (315-280 nm) e UVC (280-100 nm). Entretanto, tais subdivisões são arbitrárias e dependem da disciplina envolvida, pois os fotobiologistas normalmente definem os intervalos de comprimento de onda dessa forma: UVA (400-320 nm), UVB (320-290 nm) e UVC (290-200 nm). Embora a radiação em comprimentos de onda menores de 320 nm seja, geralmente, mais ativa fotobiologicamente do que a radiação UV em comprimentos maiores, recentes avanços em fotobiologia molecular indicam que uma subdivisão em 330-340 nm pode ser mais apropriada e, por esta razão, a região UVA foi subdividida, mais recentemente, em UVAI (340-400 nm) e UVAIL (320-340 nm)¹⁷.

Aproximadamente 90 a 99% da radiação UV solar que atinge a superfície terrestre é UVA e apenas 1 a 10 % corresponde a UVB¹⁸. Considera-se que quantias insignificantes de UVC atingem a Terra, pois são filtradas inteiramente pela camada de ozônio¹⁹.

A radiação UVA está relacionada, principalmente, a danos indiretos como a geração de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica (aumento da produção de prostaglandinas) e oxidação de proteínas e de nucleosídeos guanosina do DNA, aumentando o estresse oxidativo²⁰. Sendo responsável por mutações no DNA mitocondrial²¹. Dessa forma, a radiação UVA, também por produzir danos estruturais ao DNA, prejudica o sistema imune e, por consequência, induz ao câncer.

Em virtude do dano substancial à camada protetora de ozônio, foi registrado um aumento na quantidade de radiação UVB que atinge a superfície da Terra^{22, 23}.

Certamente, a radiação UVB é a principal responsável pelo câncer de pele não-melanoma, pois além de ser mais genotóxica, possui cerca de mil vezes a capacidade de causar queimadura solar em relação a UVA²³. Diversos estudos, utilizando animais de laboratório, concluíram que a radiação UVB é muito eficiente na indução do câncer de pele²⁴⁻²⁶. Além disso, possui não só uma capacidade mutagênica como imunossupressora²⁷.

Embora a radiação UV possua efeitos benéficos à saúde como a formação da vitamina D₃ e sua aplicação, em combinação com certas drogas, na terapia de doenças da pele como psoríase e vitiligo, é capaz de provocar muitos efeitos biológicos prejudiciais, incluindo o desenvolvimento de lesões malignas²³, pois a energia dos fótons da radiação ultravioleta é da ordem da energia de ativação de muitas reações químicas, o que explica muitos de seus efeitos.

Os fótons são os menores carregadores de energia da radiação não ionizante (UV), eles transferem energia para os cromóforos, que são moléculas biológicas capazes de absorverem essa energia, como a melanina, o ácido urocânico e o DNA. Assim, os efeitos biológicos da radiação UV são advindos dessa absorção de energia²⁸.

Desse modo, o resultado dessa transferência energética da radiação UV para o DNA é a formação dos dímeros de pirimidina (bases timina e citosina do DNA). Essas fotolesões são formadas quando a energia do fóton é absorvida pelo DNA, provocando uma ligação covalente entre bases adjacentes na mesma fita. Os fotoprodutos mais

importantes são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e o fotoproduto 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4 PP)²⁹.

Tais danos, quando não reparados pelos diversos sistemas de reparo do DNA, levam a mutações, que podem ser de dois tipos TC → TT ou CC → TT, uma vez que durante a replicação, a enzima DNA-polimerase não reconhece o dímero formado e insere uma base adenina, resultando em erro durante as próximas replicações, caracterizando uma mutação com assinatura UV³⁰.

Já é bem estabelecido que as alterações de DNA, causadas pela radiação UV, que atingem genes essenciais para o controle da proliferação celular, como o gene supressor de tumor *TP53*, são definitivas para a evolução da fotocarcinogênese, provocando anomalias na proteína p53, por ele codificada³¹. Em situações normais, a produção de proteína p53 não é recrutada, contudo em situações de estresse, como incidência de radiação ionizante, hipoxia, ativação de oncogenes que causam danos ao DNA, entre outras, ela é recrutada, levando a uma regulação do ciclo celular, à apoptose e a uma reparação do DNA³⁰. Desta maneira, a alteração da p53 a torna incapaz de reparar defeitos no DNA, permitindo a divisão celular sem correções e tendo como consequência o acúmulo de mutações.

Além do DNA, outro cromóforo, presente na epiderme, que é alvo dos efeitos da radiação UV, é o ácido *trans*-urocânico. Este cromóforo é o principal agente de absorção da radiação UV, sofrendo isomeria para a forma *cis* que está associada a atividades imunossupressoras por afetar populações de células do sistema imune não apenas na epiderme, mas também na derme, nos linfonodos e ainda, no sangue, no baço e na medula óssea. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que o isômero *cis* afeta a capacidade das células dendríticas, incluindo as células de Langerhans, em apresentar antígenos³².

Na verdade, há, pelo menos, dois mecanismos pelos quais a radiação UVB induz a fotocarcinogênese: um efeito direto sobre o DNA, causando mutações específicas ou com assinatura UV, e um efeito indireto sobre o sistema imune, seja por meio da conversão do ácido *trans*-urocânico para sua forma *cis*, altamente

imunossupressora³³, ou ainda, prejudicando a resposta imunológica contra antígenos tumorais, induzindo a produção de citocinas imunossupressoras e modulando reações de hipersensibilidade de contato do tipo tardia³⁴. Este último mecanismo é uma característica interessante desta radiação, pois, ao contrário das drogas imunossupressoras, ela não provoca a supressão do sistema imune de modo generalizado, mas sim de uma maneira especial³⁵, embora haja autores que consideram haver consequências sistêmicas pós-exposição à radiação UV^{27, 36}.

A radiação UV também é capaz de alterar determinadas moléculas na pele e formar antígenos (“neoantígenos”) que promoveriam reações do sistema imune. Assim, a imunossupressão induzida por UV serviria, portanto, para impedir tais reações imunológicas (como ocorre nas fotodermatoses). Entretanto, essa imunossupressão pode claramente ter efeitos adversos. Os efeitos da UV sobre infecções fúngicas, virais, bacterianas e parasíticas foram estabelecidos em experimentos com animais³⁷. Infecções que possuem manifestação em pele como o herpes simples, a exposição ao sol atua como um gatilho sobre o aparecimento das vesículas³⁸.

Dessa forma, a imunossupressão local em pele, ocorre quando a radiação UVB, mesmo em doses baixas, atinge diretamente as células de Langerhans, prejudicando sua função crucial de apresentadora de antígenos para o sistema imune³⁹, além disso, há indução de células T reguladoras antígeno-específicas³⁵.

Há cerca de trinta anos, Kripke e colaboradores⁴⁰ foram os primeiros a observar o efeito imunossupressor da radiação UV em uma série de experimentos com camundongos, pois descobriu-se que a radiação ultravioleta era capaz de suprimir a imunidade mediada por células.

Foi demonstrado que os tumores de pele induzidos pela exposição crônica à radiação UVB são altamente antigênicos, pois são rejeitados quando transplantados para camundongos saudáveis singênicos. Dessa forma, quando os animais receptores foram tratados com drogas imunossupressoras, os tumores transplantados não foram rejeitados, implicando que este tipo de rejeição é de natureza imunológica²⁷ e,

portanto, um mecanismo de reconhecimento do antígeno é de extrema relevância para a prevenção das neoplasias cutâneas iniciadas por radiação UV^{19, 41}.

Tais experimentos iniciais contribuíram para o desenvolvimento de uma disciplina que abrange conceitos de fotobiologia, imunologia e oncodermatologia denominada fotoimunologia. Posteriormente, novos estudos realizados com pacientes transplantados imunossuprimidos, pacientes tratados com radiação UVB e pacientes com câncer de pele, confirmaram que a imunossupressão induzida por radiação UVB pode contribuir significativamente para o desenvolvimento do câncer de pele em humanos⁴².

2.4 Fenômeno da imunotolerância

A imunotolerância é um mecanismo fisiológico utilizado pelo sistema imunológico como uma maneira de se autorregular, por meio da inibição de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, impedindo assim o desencadeamento da resposta imune. Esse mecanismo atua no controle e modulação de inflamações crônicas, inibindo o desenvolvimento de doenças autoimunes⁴³.

Sabe-se que as neoplasias malignas são capazes de criar microambientes imunossupressores que facilitam sua progressão. Dessa forma, exploram o fenômeno da imunotolerância, como um meio de escapar ao sistema de vigilância imunológica⁴⁴.

As células dendríticas imaturas desempenham um papel central nesse contexto, assim como linfócitos T reguladores (Treg)^{43, 45} e inúmeras citocinas imunossupressoras, tais como, IL-10 e MIP3α^{45, 46}.

2.4.1 Células dendríticas

As células dendríticas são apresentadoras profissionais de antígenos, que são fundamentais para o início da resposta imune. Essas células são derivadas dos progenitores linfoides e mieloides na medula óssea, de onde saem para migrar, através do sangue, para todos os tecidos do organismo, nos quais residem como células imaturas com alta capacidade fagocítica e também diretamente para os órgãos linfoides periféricos. Atualmente, são conhecidas duas classes de células dendríticas, as convencionais, que participam mais diretamente na apresentação do antígeno e ativação das células T virgens e as plasmocitoides, uma linhagem distinta que produz grande quantidade de interferon, em resposta a infecções virais, mas que parece não ser muito importante na ativação de células T virgens. As células dendríticas imaturas são muito ativas na captura de antígenos por fagocitose, por meio de receptores endocíticos como a lectina DEC-205⁴⁷.

Uma vez danificado o tecido, as células dendríticas capturam antígenos e, subsequentemente, migram para os órgãos linfoides, onde terá início a resposta imune. Durante a migração e dentro dos órgãos linfoides secundários, as células dendríticas sofrem um processo de maturação, passando de células capazes de capturar antígenos a células apresentadoras de antígeno, desempenhando o papel de estímulo de linfócitos T antígeno-específico⁴⁸. Durante a maturação, as células dendríticas sofrem tanto alterações funcionais como fenotípicas, ficando evidente a presença da glicoproteína CD83 que é considerada um dos melhores marcadores conhecidos da maturação de células dendríticas humanas^{48, 49}.

Quando permanecem em estágio imaturo, além de não conseguirem apresentar os antígenos de forma adequada, sabe-se atualmente que essas células possuem atividade imunossupressora, inibindo a ativação e atividade de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, além de estimular o recrutamento de linfócitos T reguladores, que, como foi mencionado, também possuem atividades imunossupressoras^{44, 46}.

As células de Langerhans são típicas células dendríticas imaturas convencionais que são ativamente fagocíticas, localizam-se, principalmente em áreas de interface com o meio ambiente como pele e mucosas⁴⁷.

Tais células foram reconhecidas, principalmente, por expressarem (HLA)-DR e CD1a, que são moléculas específicas para células de Langerhans na epiderme humana saudável⁵⁰.

O anticorpo anti-MHC II (complexo principal de histocompatibilidade classe II) também foi o marcador mais comum na identificação das células de Langerhans em epiderme de ratos (murine) até o advento dos anticorpos anti-langerina/CD207 alguns anos atrás⁵¹. Atualmente, a langerina é considerada como o melhor marcador de células de Langerhans tanto em ratos, como em humanos⁵⁰.

A presença ultraestrutural dos grânulos de Birbeck foi uma peça importante de identificação dessas células. Esses grânulos são compartimentos de recirculação endossomal e são exclusivos das células de Langerhans. Possuem o formato de raquete de tênis ou de bastão. Por muitos anos, esta organela permaneceu enigmática, até que Valladeau e Sem Saeland identificaram a molécula langerina/CD207 como principal componente desses grânulos, tratando-se de uma lectina transmembrana ligadora de manose do tipo C^{47, 50}. Desse modo, somente as células de Langerhans possuem os grânulos de Birbeck, e portanto, o marcador anti-CD207 é específico para tais células. Sua utilização permite estimar a imunossupressão local causada pela radiação UV em carcinomas cutâneos, uma vez que nessa condição, as células de Langerhans desaparecem da epiderme, algumas sofrem apoptose e outras migram em direção aos linfonodos regionais e, assim, a visualização da langerina permite a identificação do destino dessas células⁵¹.

No entanto, alguns estudos realizados em 2007 tornaram o quadro de células dendríticas da pele mais complexo, uma vez que revelaram a existência de células dendríticas residentes na derme que expressam langerina⁵²⁻⁵⁴. Para a comunidade científica que estuda células de Langerhans, tais células langerina⁺ residindo em estado estacionário na derme são muito raras e foram consideradas como células de

Langerhans em trânsito, em direção aos linfonodos. Foi percebido que durante a migração e a maturação dessas células não ocorre perda de expressão da langerina, o que tornou o seu uso possível como rastreador⁵⁰.

Vale destacar que há algumas evidências que as células dendríticas langerina positivas da derme sejam um subconjunto distinto de células dendríticas cutâneas, não relacionadas às células de Langerhans^{50, 54}.

2.4.2 Linfócitos T reguladores

Alguns estudos sugeriram que a imunossupressão causada pela radiação UV poderia ser mediada via indução de células T supressoras⁵⁵. No entanto, tais células foram ignoradas por quase 20 anos, até que Takahashi e colaboradores e Thornton & Shevach (2000) demonstraram que a diminuição de células T CD4⁺ CD25⁺ induzia doenças autoimunes. Essas células T foram descritas em um modelo de colite no qual a ativação antígeno-específica foi capaz de causar reações imunossupressoras. Observou-se então que, mediante a estimulação antígeno-específica, tais células liberavam grandes quantidades de citocinas imunossupressoras como IL-10 e foram denominadas células T reguladoras (Treg) tipo I^{56, 57}.

Vários subconjuntos de células Treg foram descritos. Alguns estudos revelaram que as células T CD4⁺ CD25⁺ naturais exercem papel fundamental na supressão de respostas autoimune via inibição de células T autorreativas⁵⁸, que são células que escapam do processo de tolerância central exercido pelo timo que, em condições normais, eliminaria tais células, pois elas ligam-se fortemente a peptídeos endógenos⁵⁹.

As células Treg também podem ser induzidas pela radiação UV, possuindo um papel importante na fotocarcinogênese. Embora sua atuação crucial no desenvolvimento de tumores de pele, induzidos por esta radiação, tenha sido descrita

na década de 80⁶⁰, estas células foram caracterizadas apenas recentemente e parecem pertencer à linhagem de células T Natural Killer (NK)⁶¹.

O subconjunto de interesse deste trabalho é composto por células Treg CD4⁺ CD25⁺ que atuam na supressão da autoimunidade e medeiam a imunossupressão induzida por UV, entre outras funções. Estas células têm como alvo, as células T e as células apresentadoras de antígenos e representam a população de linfócitos Treg mais relevante fisiologicamente que expressa o fator de transcrição Forkhead Box P3 (FOXP3), de modo específico, e estão presentes naturalmente no sistema imune, representando cerca de 10% das células TCD4^{+58, 62}.

A deficiência ou disfunção dessas células causa uma quebra no mecanismo de autotolerância e predispõe a doenças autoimunes em animais normorreativos⁶³⁻⁶⁵. Em seres humanos, mutações no gene *FOXP3* prejudicam a função e o desenvolvimento dos Tregs CD25⁺ CD4⁺, causando doenças autoimunes como o diabetes tipo 1 e doença inflamatória de Bowel. Esta imunodeficiência, a síndrome de poliendocrinopatia ligada ao X, estabelece o papel indispensável dos linfócitos Treg FOXP3⁺, naturalmente existentes, na manutenção da autotolerância e homeostase imunológica⁶².

Entretanto, diversos estudos revelam evidências quanto à infiltração de linfócitos Treg FOXP3⁺ em neoplasias tanto em humanos como em roedores, além de sugerirem que estas células impedem uma resposta imune às células tumorais⁶².

Os linfócitos Treg, além de atuarem sobre o mecanismo de imunotolerância, inibindo a proliferação e atividade de linfócitos T auxiliares e citotóxicos^{43, 66}, inibem também a maturação de linfócitos B em plasmócitos, reduzindo assim a produção de anticorpos⁶⁷ e suprimindo a maturação de células dendríticas imaturas⁶⁶.

Há quatro maneiras principais de atuação dos linfócitos Treg como liberação de citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGFβ, indução de citólise por meio da secreção de granzimas e perforinas (efeito citotóxico), desregulação metabólica pelo consumo de citocinas estimulatórias de linfócitos T como IL-2 e finalmente, por sua capacidade de inibir a maturação de células dendríticas que, ao permanecerem no

estágio imaturo, deixam de processar e apresentar antígenos de forma adequada, além de exercerem função imunossupressora⁴³.

Uma grande quantidade de linfócitos Treg está presente em tumores e linfonodos da via de drenagem tanto em roedores como em pacientes com câncer de cabeça e pescoço⁶⁸, pulmão⁶⁹, fígado⁷⁰, trato gastrointestinal⁷¹, pâncreas⁷², mama⁷³, e ovário⁷⁴.

A presença de Tregs em tumores diminui a quantidade de células T CD8+, empobrecendo o prognóstico de pacientes com câncer de mama⁷⁵, gástrico e ovariano^{74, 76}.

Não se sabe ao certo os motivos pelos quais ocorre o aumento dos linfócitos Treg nos sítios tumorais, uma possibilidade é que as células tumorais tanto em proliferação como as que vão morrendo são fontes de autoantígenos, os quais podem ser reconhecidos por Tregs e aumentar seu recrutamento⁷⁷.

Uma condição inflamatória em neoplasias também pode recrutar Tregs⁷⁸. Pois recrutamento de Tregs também pode ocorrer devido à produção de quimiocinas como a CCL22, por macrófagos que infiltram o tumor, atraindo Tregs que expressam CCR4⁷⁸. Além disso, é possível que Tregs Foxp3+ sejam induzidos de não-Tregs em virtude da alta concentração de TGFβ secretado pelas células tumorais e/ou células dendríticas presentes nos tumores⁷⁹.

Em resumo, a imunotolerância aliada à imunossupressão causada pela radiação UV podem favorecer o processo de malignização de lesões cancerizáveis como a QA. Dessa forma, justifica-se, nessas lesões, o estudo da presença de células envolvidas diretamente no mecanismo da imunotolerância e que, ao mesmo tempo, são alvos dos efeitos imunossupressores da radiação UV. Como a QA é considerada uma lesão potencialmente cancerizável, quaisquer intervenções que sejam passíveis de ocorrer antes da malignização são fundamentais à qualidade de vida do paciente acometido.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho pretendeu verificar se a imunotolerância exerce algum papel na fotocarcinogênese em lábio, uma vez que, apesar desse fenômeno ser fisiológico, há ainda a contribuição da radiação ultravioleta devido a seus efeitos imunossupressores. Podendo haver um reforço da imunotolerância já existente, o que facilitaria o processo de malignização da queilite actínica (QA) e consequente progressão para carcinoma epidermoide em lábio (CEL).

Para tanto, foram estudadas, por meio da técnica de imuno-histoquímica, a quantidade e a distribuição de:

- células dendríticas maduras e imaturas, utilizando-se os anticorpos anti-CD83, DEC-205, CD207, e CD1a;
- linfócitos T reguladores, com a utilização do anticorpo anti-FOXP3;

em casos de QA nos três graus de displasia epitelial (discreta, moderada e intensa) e de CEL, bem como espécimes contendo epitélio de vermelhão de lábio sem quaisquer alterações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Com o intuito de verificar o fenômeno da imunotolerância em lesões de queilite actínica e carcinoma epidermoide de vermelhão de lábio, foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica para a detecção de células dendríticas imaturas, maduras e linfócitos T-reguladores.

4.1 Seleção das amostras

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP, conforme o parecer em anexo (Anexo A), foram selecionadas dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, 73 amostras de material fixado e embocado em parafina, sendo 44 casos de queilite actínica (QA), 18 casos de carcinoma epidermoide de lábio (CEL) e 12 espécimes contendo fragmentos do epitélio do vermelhão de lábio que não apresentavam quaisquer alterações morfológicas, os quais foram denominados de “lábio normal (LN)” neste trabalho.

Os critérios de inclusão de casos para o grupo de QA e de CEL foram a presença de degeneração basofílica do colágeno e presença de infiltrado inflamatório.

4.2 Análise morfológica

A análise morfológica dos casos deste trabalho foi feita a partir do estudo de cortes de 5 µm de espessura, corados por hematoxilina e eosina, e observados ao microscópio de luz.

4.3 Classificação do grau de displasia

Os casos de QA foram classificados de acordo com o grau de displasia epitelial (discreta, moderada, intensa), conforme os critérios arquiteturais e citológicos, propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005 para a graduação das displasias epiteliais⁸⁰.

DISPLASIA		
Presença de uma alteração arquitetural e uma citológica		
DISCRETA	MODERADA	INTENSA
Alteração arquitetural restrita ao terço inferior do epitélio acompanhada por atipia citológica	Alterações arquiteturais estendendo-se ao terço médio do epitélio.	Alterações arquiteturais em mais de dois terços do epitélio associadas a atipias citológicas
ALTERAÇÕES		
ARQUITETURAIS		CITOLÓGICAS
Estratificação epitelial irregular		Anisonucleose
Perda da polaridade da camada basal		Pleomorfismo nuclear
Projeções epiteliais em forma de gota		Anisocitose
Aumento do número de figuras de mitose		Pleomorfismo celular
Mitose superficiais (mitoses altas)		Proporção núcleo/citoplasma aumentada
Disqueratose		Aumento no tamanho do núcleo
Pérolas de queratina		Mitoses atípicas
		Aumento em nº e tamanho de nucléolos
		Hipercromatismo

Quadro 4.1 – Critérios para o diagnóstico e classificação de displasia epiteliais propostos pela OMS

4.4 Imuno-histoquímica

Para a realização das reações de imuno-histoquímica, foram feitos cortes com espessura de 3 µm, que foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas pelo 3-aminopropiltrietoxisilano para aumento da adesividade do corte.

Os anticorpos propostos para este estudo foram: anti-CD83 (clone 1H4b, Novocastra, UK), anti-DEC-205 (policlonal, R&D system, UK), anti-CD207 (policlonal, R&D Systems), anti-CD1a (clone O10, Dako, USA), e anti-FOXP3 (clone 236A/E7, AbCam, UK), com o objetivo de se obter a imunoexpressão de células dendríticas maduras e imaturas (células de Langerhans) e linfócitos T reguladores.

Para tanto, os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, sendo o primeiro a 60 °C, por 30 minutos, e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos.

A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95% e 85%. Após a reidratação, foi realizada a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 10 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas receberam o tratamento de recuperação antigênica para a exposição dos epítomos, por meio da imersão das lâminas por 30 minutos em banho-maria a 95°C com solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 1 mM pH 9,0. Para os cortes submetidos ao anticorpo anti-FOXP3, foi utilizada a solução de EDTA 1 mM com pH 8.0.

Ao final do tratamento de recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados em água destilada por 10 minutos e seguiram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizada pela incubação em dois banhos de 15 minutos cada em solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. Repetida a lavagem em água destilada, os cortes foram imersos em solução de TRIS (50 mM, NaCl 150 mM) pH 7,6, a solução tampão da reação, fazendo-se três banhos de 5 minutos cada.

A seguir, foi feita a incubação dos anticorpos primários diluídos em tampão TRIS acrescido de BSA (albumina bovina e azida sódica), nas seguintes proporções: 1:50; 1:25; 1:150; 1:150 e 1:200 para os anticorpos anti-CD83, anti-DEC-205, anti-CD207, anti-CD1a, e anti-FOXP3, respectivamente.

Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi usado o kit LSAB plus (DAKO). As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO

Liquid DAB+, K3468) através de incubação por 10 minutos e, após lavagem em TRIS e água destilada, para remoção de excessos, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer.

Desidratação em série crescente de etanóis seguida de diafanização em xilol e montagem permanente no aparelho *Tissue Tek*® SCA (Sakura) para microscopia, concluíram o preparo dos cortes que seguiram para análise em microscopia de luz.

4.5 Análise dos resultados

Foi realizada a análise quantitativa dos resultados, todas as lâminas foram observadas em microscópio de luz e as células positivas para os anticorpos anti-CD83, anti-DEC-205, anti-CD207, anti-CD1a, e anti-FOXP3 foram contadas em 3 campos selecionados aleatoriamente, porém mais significativos quanto à marcação.

Dessa forma, os cortes foram examinados e capturados em microscópio Axio Imager A2 (Zeiss) com uma câmera digital acoplada (Axio Cam HRc-Zeiss®) e com o auxílio do software AxioVision (Zeiss), utilizando-se o aumento de 400X. O valor final consistiu na média dessas 3 contagens e foi expresso em número de células por campo⁸¹.

Para os casos de QA e de epitélio normal, foram realizadas duas contagens diferentes para a presença de células marcadas com os anticorpos anti-CD207 e anti-CD1a, sendo escolhidos 3 campos significativos no epitélio e outros 3 no tecido conjuntivo, assim, obteve-se uma média de células marcadas tanto no epitélio como no conjuntivo para cada caso.

4.6 Análise estatística

De acordo com o programa utilizado para a análise estatística, GraphPad Prism versão 5.0, e adotando-se o valor de $P < 0,05$ como padrão de significância, há diferentes interpretações para os valores encontrados, conforme demonstrado no quadro 4.2.

Valor de P	Nível de significância
<0,001	Extremamente significativa (***)
0,001 a 0,01	Muito significativa (**)
0,01 a 0,05	Significativa (*)
>0,05	Insignificante

Quadro 4.2 – interpretação dos valores de P segundo o programa GraphPad Prism

Para a análise estatística, os casos foram divididos em 5 grupos, a saber:

- a) QAs com displasia epitelial discreta (QA discreta);
- b) QAs com displasia epitelial moderada (QA moderada);
- c) QAs com displasia epitelial intensa (QA intensa);
- d) CEL;
- e) Lábio normal (LN), sem quaisquer alterações epiteliais.

Dessa forma, a análise estatística dos valores referentes à expressão de CD83, DEC-205, CD207 e CD1a, foi realizada, utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis que comparou todos os grupos do estudo (QA discreta, QA moderada, QA intensa, CEL e LN).

Já para a avaliação estatística dos dados referentes à expressão do fator de transcrição FOXP3, utilizou-se a análise de variância (ANOVA – 1 critério), uma vez que os valores de todos os grupos comparados seguiram uma distribuição Gaussiana (normal).

Todos os grupos foram submetidos a um pós-teste de comparação múltipla, a fim de analisá-los comparativamente, aos pares. O teste de Dunn aplicou-se à avaliação referente aos marcadores CD83, DEC-205, CD207 e CD1a, e de Bonferroni aos dados obtidos pela expressão de FOXP3.

Para todos os testes, foram considerados, estatisticamente significantes, os valores com $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia

Quanto à morfologia, os 44 casos de QA eram representados por fragmentos caracterizados por um revestimento de epitélio estratificado pavimentoso, hiperorto ou hiperparaqueratinizado, exibindo áreas ora atróficas, ora acantóticas e, por vezes, exocitose, além de figuras de atipia. A lâmina própria era constituída por tecido conjuntivo denso, em que se observava ampla faixa de degeneração basofílica (elastose solar), além de infiltrado inflamatório crônico, do tipo linfoplasmocitário distribuído, na maioria das vezes, em focos subjacentes ao epitélio de superfície.

Todos os casos de QA foram submetidos aos critérios de classificação de displasia epitelial da OMS (2005)⁸⁰. Desse modo, obtiveram-se 14 casos com displasia epitelial discreta, 15 com displasia moderada e 15 com displasia intensa.

Já os 18 casos de CEL consistiam em fragmentos de neoplasia maligna epitelial, em que se observava a invasão do tecido conjuntivo subjacente por ilhas e cordões de queratinócitos atípicos em proliferação. Tais células neoplásicas mostravam-se poliédricas, com citoplasma abundante e claro, núcleos grandes ovais ou arredondados, exibindo nucléolos centrais. Individualmente, os queratinócitos malignos apresentavam pleomorfismo celular e nuclear, aumento da proporção núcleo/citoplasma, hipercromatismo nuclear e nucléolos evidentes. Também era possível observar a presença de figuras de mitose atípicas e pérolas de queratina no interior de ilhotas. O estroma da lesão era constituído por tecido conjuntivo denso, exibindo infiltrado inflamatório predominantemente do tipo mononuclear e notava-se, ainda, a faixa de degeneração basofílica do colágeno, evidenciando a ação da radiação ultravioleta na etiologia da lesão.

E, por fim, os 12 casos representativos de vermelhão de lábio (LN), consistiam de fragmentos de semimucosa revestida por epitélio pavimentoso ortoqueratinizado, de

poucas camadas, com poucas projeções em direção à lâmina própria que, por sua vez, era representada por tecido conjuntivo denso. Salienta-se que essas amostras foram selecionadas por não apresentarem quaisquer alterações morfológicas de epitélio.

5.2 Expressão imuno-histoquímica

A tabela 5.1 expressa a média de células contadas por campo, para cada caso dos grupos analisados, individualmente.

Tabela 5.1 – Média de células positivas por campo para cada um dos anticorpos estudados

		Marcadores imuno-histoquímicos						
	CASO	CD83	DEC-205	FOXP3	CD207 EPIT	CD207 CONJ	CD1a EPIT	CD1a CONJ
QA discreta	1	2,7	1,3	30,3	5,7	8,0	8,3	1,0
	2	0,0	0,0	0,0	10,7	0,0	3,3	0,0
	3	1,7	0,0	6,3	7,0	0,0	4,7	0,0
	4	0,7	0,0	0,0	11,3	0,0	5,0	0,0
	5	19,7	5,7	58,7	18,3	10,7	20,3	0,0
	6	0,7	0,0	0,0	10,7	0,0	6,7	0,0
	7	5,0	9,7	14,0	4,7	15,0	0,0	9,3
	8	1,0	4,7	20,3	8,0	3,0	4,0	0,0
	9	15,3	45,3	32,0	18,0	0,0	15,0	0,0
	10	1,0	3,3	39,0	7,7	27,3	8,7	3,0
	11	3,0	28,7	3,0	4,0	0,0	5,0	1,0
	12	0,0	0,0	20,3	6,7	8,7	6,0	2,0
	13	4,7	12,3	39,0	2,0	3,0	4,7	4,3
	14	2,0	3,3	15,7	8,3	3,0	7,0	3,3
QA moderada	15	12,7	27,7	6,7	13,0	0,7	14,0	7,7
	16	12,0	83,0	20,3	11,3	1,7	20,0	7,3
	17	6,3	4,0	21,7	13,3	14,0	16,0	14,0
	18	3,3	0,0	7,0	3,3	0,0	0,0	14,7
	19	4,0	0,0	27,3	6,3	0,0	10,3	11,3
	20	4,0	60,0	34,3	9,7	7,0	7,0	5,0
	21	3,7	0,0	0,0	2,7	14,0	5,0	4,7
	22	0,0	0,0	0,0	7,7	0,0	7,0	13,3
	23	4,7	0,0	9,0	12,0	5,0	9,0	6,7
	24	0,0	2,0	6,0	7,7	0,0	12,3	6,7
	25	9,0	3,0	17,3	4,0	0,0	4,7	4,3
	26	1,7	0,0	0,0	3,3	0,0	4,0	3,0
	27	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	4,0	2,7
	28	3,0	28,7	30,3	10,0	0,0	7,7	4,0
	29	7,0	62,0	56,7	13,3	25,3	8,0	2,7
QA intensa	30	0,7	7,3	0,0	16,0	1,3	15,7	3,3
	31	6,7	23,0	5,0	20,7	6,3	17,3	19,3
	32	6,7	41,0	0,0	19,7	23,3	17,7	11,3
	33	3,7	17,0	123,0	18,3	6,0	18,0	1,7
	34	11,7	48,3	21,3	24,0	42,0	27,7	41,3
	35	1,3	0,0	3,0	5,0	2,0	11,0	13,0
	36	7,0	107,0	50,7	19,0	16,0	23,3	8,7
	37	5,7	83,3	32,7	5,7	2,0	4,3	7,0
	38	5,7	53,3	50,0	31,7	23,0	37,3	21,3

(Continua)

*Marcação citoplasmática, não incluída na contagem de células

Marcadores imuno-histoquímicos

	CASO	CD83	DEC-205	FOXP3	CD207 EPIT	CD207 CONJ	CD1a EPIT	CD1a CONJ
QA intensa	39	13,0	68,7	43,7	13,3	20,7	24,0	26,3
	40	9,7	164,3	30,0	13,7	17,0	16,3	8,0
	41	15,7	79,3	24,7	17,7	10,3	24,0	7,7
	42	22,3	132,3	55,0	5,7	0,0	5,3	5,7
	43	15,7	205,7	86,3	17,0	3,3	16,0	3,3
	44	10,0	78,3	89,7	10,7	9,7	9,7	6,0
CEL	45	4,7	40,3	6,6*	6,0	-	10,3	-
	46	11,3	42,3	73,3	33,0	-	21,7	-
	47	4,0	19,0	75,7	0,0	-	3,0	-
	48	5,7	63,7	0 *	0,0	-	7,3	-
	49	0,0	13,7	0*	5,7	-	11,7	-
	50	10,3	27,7	16,7	10,7	-	7,7	-
	51	12,3	41,3	59,0	13,7	-	22,3	-
	52	22,3	13,7	0*	0,0	-	23,0	-
	53	11,0	62,3	58,0	20,7	-	29,3	-
	54	7,3	17,0	108,0	22,3	-	18,7	-
	55	11,3	0,0	8*	25,7	-	37,0	-
	56	9,3	0,0	53,0	8,7	-	14,0	-
	57	17,3	60,7	124,7	27,3	-	30,3	-
	58	14,0	34,3	28*	17,0	-	35,3	-
	59	0,0	0,0	29,0	8,7	-	8,0	-
	60	13,0	51,7	78,7	23,3	-	38,3	-
	61	5,0	34,7	60,0	28,0	-	0,0	-
	62	5,7	0,0	50,7	6,3	-	9,3	-
Lábio normal	63	0,7	0,0	0,0	22,7	0,0	24,0	0,0
	64	0,0	0,0	0,0	4,7	0,0	0,0	0,0
	65	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	66	0,0	0,0	0,0	13,7	0,0	11,0	3,0
	67	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	2,7
	68	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,3
	69	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	70	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	6,0	2,7
	71	23,7	0,0	0,0	6,7	0,0	10,3	10,7
	72	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	8,7	6,0
	73	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	74	0,0	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	1,7

(Conclusão)

*Marcação citoplasmática, não incluída na contagem de células

5.2.1 CD83

O padrão de marcação para a glicoproteína CD83, que é um marcador de maturação das células dendríticas, foi citoplasmático e as células marcadas localizavam-se exclusivamente no tecido conjuntivo em todos os casos analisados, como exemplificado na Figura 5.1A. Sua presença foi evidenciada em 85,7% (n=12) dos casos de QA discreta, 80% (n=12) dos casos de QA moderada, 100% (n=15) dos casos de QA intensa, em 88% (n=16) dos casos de CEL e em 16,7% (n=2) dos casos de lábio normal.

A média de células contadas/campo para todos os grupos está representada no gráfico 5.1.

Gráfico 5.1 - CD83: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado

O teste de Kruskal-Wallis revelou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, com valor de $p < 0,001$, sendo extremamente significativa. Em seguida, realizou-se o teste de Dunn que mostrou haver diferença

estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os pares QA intensa x LN (***) e CEL x LN(***)).

5.2.2 DEC-205

O receptor de manose DEC-205 pode ser encontrado em células dendríticas imaturas e em estágio de maturação. Sua presença nos casos estudados ocorreu em 64% (n=9) dos casos de QA discreta, 53% (n=8) de QA moderada, 93% (n=14) de QA intensa, 78% (n=14) dos casos de CEL e nenhum caso foi positivo entre as amostras de lábio normal.

O padrão de marcação foi exclusivamente citoplasmático e as células dendríticas marcadas apareciam, na maioria das vezes, em grupamentos dispersos exclusivamente pelo tecido conjuntivo de todos os espécimes estudados (Figura 5.1B).

A média de células contadas/campo para cada grupo está expressa no gráfico 5.2.

Gráfico 5.2 – DEC-205; Média de células contadas/campo em cada grupo analisado

Constatou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos analisados (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$, extremamente significativa), além disso a análise comparativa revelou significância estatística entre os pares QA discreta x QA intensa (**), QA moderada x QA intensa (**), QA intensa x lábio normal (***) e CEL x lábio normal (***)).

5.2.3 CD207

A langerina (CD207), que é uma glicoproteína transmembrana presente nos grânulos de Birbeck, é encontrada em células de Langerhans e em um subconjunto de células dendríticas da derme langerina⁺. Como havia a possibilidade de dois grupos distintos de células marcadas, sendo um deles exclusivamente localizado no tecido conjuntivo, optou-se, durante a contagem de células, pela divisão em dois grupos (CD207 Epitelial e CD207 Conjuntivo), com o objetivo de amplificar a análise de células langerina⁺ na QA e nas amostras de lábio normal.

Os casos de CEL não sofreram divisão de grupo durante a contagem de células, uma vez que a lesão é, histopatologicamente, constituída por epitélio, que, por estar em proliferação, se mostra substituindo o tecido conjuntivo quase que em sua totalidade, não sendo possível a eleição de três campos de tecido conjuntivo em todas as amostras. Deste modo, os casos de CEL foram analisados comparativamente com o grupo CD207 epitelial de cada grau de displasia das QAs e do lábio normal.

O padrão de marcação foi citoplasmático em todas células, tanto do epitélio como do tecido conjuntivo.

As células apresentavam um aspecto dendrítico, caracterizado pela presença de longas projeções citoplasmáticas, dispondo-se na porção suprabasal do epitélio nas lesões de QA (Figura 5.2C) e distribuídas pelas ilhotas do CEL (Figura 5.2D). A tabela 5.2 resume a porcentagem de células positivas para CD207.

Tabela 5.2– Porcentagens de células marcadas com anti-CD207 em cada grupo analisado

Grupo	CD207 – Epitelial	CD207 – Conjuntivo
QA discreta	100% (n=14)	57% (n=8)
QA moderada	100% (n=15)	47% (n=7)
QA intensa	100% (n=15)	94% (n=14)
CEL	84% (n=15)	-
Lábio normal	58% (n=5)	0

O gráfico 5.3 mostra a média de células/campo par o grupo CD207 Epitelial e o gráfico 5.4 para o grupo CD207 Conjuntivo.

Os dois grupos, CD207 Epitelial e CD207 Conjuntivo, foram analisados estatisticamente e, para o grupo Epitelial verificou-se que houve significância estatística entre os grupos analisados (QA discreta, moderada, intensa, CEL e LN), com valor de $p=0,0015$ (Kruskal-Wallis) e a análise de comparação múltipla de Dunn revelou significância estatística entre os pares QA intensa x lábio normal (**) e CEL x

lábio normal (*). Da mesma forma, para o grupo Conjuntivo, o teste de Kruskal-Wallis mostrou haver diferença extremamente significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos analisados (QA discreta, moderada, intensa e LN) e o pós-teste confirmou a significância estatística entre os pares QA discreta x LN (*), QA moderada x QA intensa (*) e QA intensa x LN (***)).

Gráfico 5.3 – CD207 Epitélio: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado

Gráfico 5.4 – CD207 Conjuntivo: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado

5.2.4 CD1a

Assim como para o marcador anti-CD207, foi feita a divisão entre 2 grupos de análise para o marcador anti-CD1a, possibilitando a verificação da presença da glicoproteína CD1a em células do epitélio (células de Langerhans) e do tecido conjuntivo (células de Langerhans em trânsito e demais células dendríticas). E pelas mesmas razões citadas, os casos de CEL foram incluídos no grupo CD1a - Epitelial

A porcentagem de células marcadas com o anticorpo anti-CD1a, conforme cada grupo, está demonstrada na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Porcentagens de células marcadas com anti-CD1a em cada grupo analisado

Grupo	CD1a – Epitelial	CD1a – Conjuntivo
QA discreta	93% (n=13)	50%
QA moderada	94% (n=14)	100%
QA intensa	100%	100%
CEL	95% (1 caso negativo)	-
Lábio normal	50%	0

O padrão de marcação foi exclusivamente citoplasmático, tanto nas células do epitélio quanto do conjuntivo. No epitélio observou-se um aspecto dendrítico nas células CD1a⁺, com longos prolongamentos citoplasmáticos. Quanto à localização, nas amostras de QA, as células distribuíram-se nos estratos suprabasais do epitélio (Figura 5.2A), nos casos de CEL (Figura 5.2B), não houve um padrão de distribuição definido e nos espécimes de LN, as CD dispuseram-se, ora na camada basal, ora no estrato intermediário, distribuídas esparsamente. No tecido conjuntivo, as células apresentavam um formato mais arredondado, sem projeções em todas as amostras.

A análise estatística para o grupo CD1a – Epitelial revelou uma diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos analisados, com valor de $p < 0,0001$ (***). E o pós-teste ressaltou diferença significativa entre os pares QA discreta x QA intensa (*), QA discreta x CEL (*), QA intensa x LN (**), CEL x LN (**).

Da mesma forma, para o grupo CD1a – Conjuntivo, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, com $p < 0,0001$ (***). Comparando-se aos pares no pós-teste, constatou-se diferença estatisticamente significativa entre os pares QA discreta x QA moderada (**), QA discreta x QA intensa (***) e QA intensa x LN (**).

A média de células contadas/campo tanto para o grupo CD1a – Epitelial, como para o grupo CD1a- Conjuntivo referente aos casos analisados está demonstrada no gráfico 5.5 e 5.6.

CD1a - Epitélio

Gráfico 5.5 – CD1a Epitélio: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado.

CD1a- Conjuntivo

Gráfico 5.6 – CD1a Conjuntivo: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado

5.2.5 FOXP3

Em todas as amostras de QA, o padrão de marcação para este fator foi exclusivamente nuclear, estando presente em 78% (n=11) dos casos de QA discreta, em 74% (n=11) de QA moderada e em 87% (n=13) de QA intensa (Figura 5.1C). Entretanto, entre os 18 espécimes de CEL, 12 casos apresentaram padrão exclusivamente nuclear, 3 casos exibiram padrão nuclear e citoplasmático (Figura 5.1D) e em 3 casos o padrão foi exclusivamente citoplasmático.

A análise estatística pelo teste de variância (ANOVA- 1 critério) atribuiu uma diferença estatisticamente significativa entre os 5 grupos deste estudo, com valor de $p < 0,0001$ (***). Em seguida, foi realizado o teste de comparação múltipla de Bonferroni e verificou que há significância estatística entre os pares QA moderada x CEL (**), QA intensa x LN (**) e CEL x LN (***).

A média de células contadas/campo de cada grupo de casos está representada no gráfico 5.7.

Gráfico 5.7 – FOXP3: Média de células contadas/campo em cada grupo analisado

5.2.6 Avaliação conjunta dos resultados para queilite actínica

A média de todos os casos de QA para cada marcador utilizado está demonstrada no gráfico 5.8.

Gráfico 5.8 – QA: Média de células contadas/campo para cada marcador utilizado

5.2.7 Avaliação conjunta dos resultados para carcinoma epidermoide de lábio

A média de todos os casos de CEL para cada marcador utilizado está demonstrada no gráfico 5.9.

Gráfico 5.9 – CEL: Média de células contadas/campo para cada marcador utilizado

Figura 5.1 - Marcação imuno-histoquímica para CD83, DEC-205 e FOXP3. A) Positividade para CD83 em CEL (400X no original); B) Células positivas para DEC-205 em QA com displasia epitelial intensa (100X); C) FOXP3 presente no núcleo de linfócitos em QA com displasia intensa (100X); D) Positividade nuclear e citoplasmática para FOXP3 em CEL (100X). Estreptavidina biotina

Figura 5.2 - Marcação imuno-histoquímica para CD1a e CD207. A) Células positivas para CD1a e CD207. B) Positividade para CD1a no CEL (100X); C) Células marcadas para CD207 em QA com displasia intensa (400X); D) Positividade para CD207 em CEL (100X). Estreptavidina biotina

6 DISCUSSÃO

A imunotolerância é um fenômeno que exerce uma importância fisiológica fundamental, uma vez que este mecanismo participa da autorregulação do sistema imunológico, por meio da inibição da proliferação e do recrutamento de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, impedindo, desse modo, o surgimento de doenças imunomediadas⁴⁶.

Sabe-se também que o ambiente neoplásico é enriquecido por citocinas imunossupressoras como TGFβ, Il-10 e IL-13, que podem atuar no sentido de atrair células T reguladoras, caracterizando um microambiente imunotolerante⁸².

A radiação ultravioleta (UV) é considerada um carcinógeno completo, promovendo a iniciação e a progressão de neoplasias. Já é conhecida sua ação imunossupressora que pode contribuir no sentido de reforçar o fenômeno da imunotolerância, principalmente, por atingir os personagens desse mecanismo, que são as células dendríticas e os linfócitos T reguladores (Treg). A maioria dos estudos analisa somente a imunossupressão causada por UV e sua relação com o processo da fotocarcinogênese, deixando de avaliar o possível papel das células envolvidas no fenômeno da imunotolerância no desenvolvimento neoplásico. Suportando essa ideia, Bayerl e colaboradores relataram a presença de células de Langerhans CD207⁺ em proximidade a queratinócitos danificados pela radiação UV⁸³.

O objetivo deste trabalho foi verificar se havia um microambiente imunotolerante na QA que fosse capaz de contribuir para a malignização, e também em espécimes de CEL, facilitando a progressão neoplásica. Para tanto, foi analisada a presença de células que comandam esse fenômeno como células dendríticas maduras e imaturas (incluindo as células de Langerhans), além de linfócitos T reg FOXP3⁺ em lesões de QA em seus três graus de displasia epitelial, CEL e em amostras de lábio normal (LN), contendo epitélio sem alterações morfológicas.

Para as reações de imuno-histoquímica, foram utilizados os marcadores CD83 que evidencia células dendríticas maduras, DEC-205, que está presente em células

dendríticas imaturas e em estágio de maturação, CD207, que é o melhor marcador para células de Langerhans, mas que também evidencia células dendríticas da derme CD207⁺, CD1a, que é marcador de células dendríticas imaturas, inclusive células de Langerhans e FOXP3 que é o melhor marcador do subconjunto de linfócitos Treg CD4⁺ CD25⁺.

Este trabalho mostrou que células de Langerhans evidenciadas tanto pelo anticorpo anti-CD207, que reconhece a langerina (CD207), quanto pelo anti-CD1a, são mais abundantes no epitélio da QA e do CEL, comparadas ao epitélio saudável. Já no tecido conjuntivo, a presença dessas células variou entre os grupos estudados, notando-se um aumento expressivo no grupo de casos de QA com displasia epitelial intensa.

Quanto à presença de CD207 no epitélio da QA, notou-se um padrão de marcação citoplasmático que evidenciou o aspecto dendrítico ou estrelário, com longos prolongamentos, das células de Langerhans, que se distribuíam, em sua maioria, nos estratos intermediários do epitélio, ora dispersas, ora em agrupamentos formando as verdadeiras redes de células de Langerhans epiteliais. Nas amostras de LN, tais células se distribuíram esparsamente pelo epitélio e algumas na camada basal. Nos casos de CEL, não houve um padrão de distribuição, mas o aspecto morfológico foi o mesmo observado para o grupo de QA.

Notou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos QA com displasia intensa e LN e entre CEL e LN.

Ressalta-se, ainda, que a média de células contadas por campo entre os grupos CEL e QA com displasia intensa foi semelhante, sendo de 15,9 células/campo e 14,3 células/campo respectivamente.

Apesar de não observada diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de células CD207⁺ para os casos com graus de displasia epitelial diferentes, quando comparados entre si, os valores da média de células CD207⁺ contadas por campo, nas amostras de QA com displasia epitelial discreta (8,8 células/campo) e com displasia epitelial moderada (8,1 células/campo) foram superiores àqueles encontrados

nos espécimes de lábio normal (4,9 células/campo), demonstrando o acúmulo de células de Langerhans na QA.

Até 2007, o CD207 foi considerado como um marcador da superfície celular específico de células de Langerhans⁸⁴, pois essa molécula está associada aos grânulos de Birbeck, que é uma organela específica de células de Langerhans e que atua no processamento de antígeno. No entanto, três publicações nesse mesmo ano revelaram um grupo de células dendríticas da derme langerina⁺⁵²⁻⁵⁴. Por este motivo, analisou-se separadamente o epitélio e o tecido conjuntivo nos grupos de casos de QA e LN. Os casos de CEL foram comparados aos demais, levando-se em consideração a análise epitelial, pois o carcinoma é a própria substituição do tecido conjuntivo por epitélio, dessa forma, não foi possível a escolha de três campos de tecido conjuntivo para a contagem

Nas células de Langerhans, a langerina está relacionada à captura de antígenos e confere um fenótipo imaturo, indicando uma alta capacidade endocítica. Por outro lado, estas células possuem baixa capacidade de estimular linfócitos T⁵¹. Desse modo, havendo uma alta concentração dessas células de fenótipo imaturo no decorrer do processo da fotocarcinogênese, e principalmente, em lesões de CEL, pode-se inferir que, a apresentação de antígenos tumorais a células T efetoras pode estar prejudicada, mesmo porque a ativação dessas células está relacionada diretamente ao processo migratório que, por sua vez, parece estar limitado.

No tecido conjuntivo, as amostras de QA também apresentaram maior expressão de CD207, em relação aos casos de LN, destacando-se a maior média de células por campo, no grupo de QA com displasia intensa (12,2 células/campo). As células exibindo a imunomarcacão localizavam-se, geralmente, próximas ao epitélio e, por vezes, em grupamentos, algumas delas exibiam um aspecto dendrítico, estrelário e outras, um formato mais arredondado. Sugere-se, então, que essas células representam tanto células de Langerhans em trânsito, ou seja, em processo de migração para os linfonodos de drenagem local, como, em menor escala, células dendríticas da derme langerina⁺, que representa uma pequena parcela da população total de células dendríticas da derme⁵³.

Destaca-se que o processo de migração das células de Langerhans ocorre no estado estacionário⁸⁵ e é aumentado durante um processo inflamatório⁸⁶.

Como foi dito, a imunoexpressão de CD1a no epitélio das amostras estudadas foi semelhante, em termos de quantidade de células marcadas, à encontrada para CD207, porém, além de haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos QA intensa e CEL comparados, separadamente, ao grupo de LN, também houve diferença significativa entre os grupos de QA discreta e QA intensa e entre QA discreta e CEL, quando analisados comparativamente. O padrão de marcação e de distribuição das células foi o mesmo encontrado para a expressão de CD207, embora não haja completa sobreposição entre a expressão de CD1a e CD207, pois Valladeau e colaboradores relataram que cerca de 15 a 35% de células CD1a⁺ expressam CD207 e que a variação no estágio de maturação reflete-se na expressão diferente dessas moléculas⁸⁴.

Dessa forma, os achados deste trabalho, em relação à presença de células CD1a⁺, revelaram uma expressão aumentada conforme a gravidade da displasia epitelial da QA, tanto para a análise a partir do epitélio, como a partir do tecido conjuntivo, sendo que a maior média de células por campo foi encontrada no grupo de QA com displasia epitelial intensa (17,8 células/campo no epitélio e 12,3 células/campo no conjuntivo). E na comparação entre todos os grupos deste estudo, a maior média foi encontrada no grupo CEL (18,2 células/campo).

Um trabalho recente que estudou a presença de células de Langerhans na QA, por meio do marcador anti-CD1a, concluiu que havia um acúmulo de células de Langerhans nessas lesões, sugerindo que esse aumento fosse atribuído a um sinal protetor e imunoestimulatório do lábio ou de outra região, possivelmente oriundo do tecido saudável adjacente⁸⁷.

Alguns trabalhos que avaliaram a presença de células de Langerhans em líquen plano oral, pelo método da imuno-histoquímica, utilizando os anticorpos anti-CD1a e anti-CD207, também encontraram um aumento significativo na quantidade dessas células nas lesões em relação às amostras de mucosa oral saudável^{88, 89}.

As células dendríticas com positividade para CD83 são consideradas como células dendríticas maduras e ativas, as quais também podem expressar altos níveis de fatores coestimuladores como CD80 e CD86. Tais células CD83⁺ possuem uma capacidade apresentadora de antígeno muito poderosa⁹⁰. Em casos de carcinoma esofágico, por exemplo, a expressão dessas células está diminuída⁹¹. Da mesma forma, observou-se ausência ou um recrutamento mínimos de células dendríticas maduras em câncer de próstata⁹², carcinoma hepatocelular⁹³ e melanoma metastático⁹⁴.

No entanto, esses relatos sobre a prevalência de células dendríticas CD83⁺ em neoplasias malignas são conflitantes na literatura, pois Thrunher e colaboradores encontraram números substanciais de células dendríticas CD83⁺ em carcinoma de células renais⁹⁵.

Neste trabalho, os dados encontrados estão de acordo com esse último relato, pois a presença de células dendríticas maduras (CD83⁺) foi mais expressiva nos casos de CEL comparativamente. Todavia, em números absolutos, a média de células foi baixa, sendo de apenas 9,1 células por campo.

Salienta-se que a expressão de CD83 foi observada exclusivamente no tecido conjuntivo de todos os espécimes analisados e que o padrão de marcação foi citoplasmático, sendo que as células possuíam um formato arredondado. Quanto à localização, foi observada, geralmente, na periferia das ilhotas neoplásicas, mas em alguns casos as células concentravam-se em áreas focais próximas ao epitélio de superfície. Esse resultado é semelhante àquele encontrado em carcinomas de mama, no que diz respeito à distribuição dessas células de fenótipo maduro em regiões periféricas da neoplasia⁸¹.

Ressalta-se, ainda, que a imunoexpressão de CD83 também foi marcante nos casos de QA com displasia intensa em que se obteve praticamente a mesma média de células que os casos de CEL (9,0 células por campo). Sendo que a análise estatística revelou diferença significativa entre o grupo de CEL e o de QA intensa quando comparados às amostras de lábio normal.

Esses achados podem ter basicamente duas interpretações, a primeira refere-se à possibilidade de que está ocorrendo ativação das células dendríticas nessas lesões e que estão desempenhando sua função de apresentadora de antígeno corretamente, inclusive nos casos de CEL, contribuindo para impedir o crescimento tumoral por meio da ativação de células T citotóxicas, por exemplo, que é uma das funções das células dendríticas ativadas. Confirmando esta hipótese, um trabalho realizado em líquen plano oral, mostrou que há aumento da presença de células dendríticas CD83⁺ no tecido conjuntivo das lesões comparativamente às amostras normais de mucosa oral, sugerindo uma apresentação antigênica adequada nas áreas evidenciadas⁸⁹.

E a segunda relaciona-se com a possibilidade de que as células dendríticas mesmo estando fenotipicamente maduras, podem não estar funcionalmente maduras, assunto que foi discutido por Ira Mellman (South San Francisco, CA), durante o 11º Workshop Internacional sobre Células de Langerhans⁹⁶.

Outro marcador que teve sua expressão analisada foi o receptor DEC-205 que é o membro menos compreendido da família de lectinas do tipo C tipo I de receptor de manose⁹⁷, sendo expresso predominantemente por células do epitélio cortical do timo e por células dendríticas da derme, (inclusive células de Langerhans) tanto em ratos como em humanos, podendo também ser detectado, em baixos níveis, em linfócitos T e B e em alguns tipos de células epiteliais^{98, 99}.

As moléculas de DEC-205 são conhecidas por mediar uma ampla variedade de funções biológicas, incluindo a captura e a internalização de ligantes para processamento e apresentação subsequentes pelas células dendríticas. Embora seus ligantes aguardem identificação, as propriedades endocíticas do DEC-205 fazem dele um alvo ideal para aqueles que desejam criar vacinas e estratégias imunoterápicas⁹⁹.

Tais lectinas do tipo C são expressas de formas diferentes pelos vários subconjuntos de células dendríticas. As células dendríticas do sangue, células de Langerhans e células dendríticas imaturas derivadas de monócitos e cultivadas *in vitro* expressam apenas níveis baixos de DEC-205, porém a expressão aumenta notavelmente sob ativação, indicando que o DEC-205 é uma molécula associada à

ativação, embora tenha propriedades endocíticas que caracterizam as células dendríticas imaturas⁹⁹⁻¹⁰¹.

O trabalho realizado por Butler e colaboradores sugeriu que a expressão de DEC-205 em células dendríticas imaturas é relativamente alta, porém sob estímulo inflamatório (citocinas, TNF- α e IL-1 β), que por sua vez, induz à maturação, aumenta ainda mais⁹⁹.

Nesse sentido, a inflamação pode ter influenciado no aumento de células DEC-205⁺ nos espécimes de QA com displasia epitelial intensa, e ainda, essas células evidenciadas pelo anti-DEC-205 podem representar células de Langerhans migratórias, porque durante o processo de migração para os linfonodos, a expressão desse marcador é aumentada¹⁰².

Dessa forma, pode-se dizer que a endocitose mediada por receptor não cessa após a maturação, permitindo múltiplos ciclos de processamento e apresentação de antígeno¹⁰³.

Quanto à expressão de DEC-205, nossos achados revelaram que ela foi mais pronunciada nos casos pertencentes ao grupo de QA com displasia epitelial intensa (73,9 células/campo), seguindo-se o grupo de amostras de CEL (29,0 células/campo), sendo que os dois grupos quando comparados separadamente ao grupo de amostras de LN revelaram significância estatística.

O aumento observado no grupo de casos de QA com displasia intensa pode ser explicado pelo processo inflamatório mais evidente nessas amostras.

Também houve diferença estatisticamente significante entre os grupos de casos de QA discreta (média de 8,2 células/campo) e QA intensa; e QA moderada (18,0 células/campo) e QA intensa. Diante desses resultados, observou-se uma tendência de aumento na presença de células DEC-205⁺ com o avanço do grau de displasia epitelial, no entanto, quando o processo de fotocarcinogênese chega ao seu máximo, ocorre uma queda na presença dessas células, talvez pela diminuição do processo de ativação das

células dendríticas, que pode ser provocada pelo microambiente tumoral, como já foi sugerido⁴⁶.

A presença de células DEC-205⁺ é um dado relevante no ambiente neoplásico, uma vez que esse receptor pode ser alvo de possíveis terapias contra o câncer devido a mecanismos de entrega de antígeno às células dendríticas, via esse receptor endocítico, o que promoveria a apresentação do antígeno tumoral às células T efectoras¹⁰⁴. Um estudo em modelo de melanoma mostrou que a entrega de antígeno tumoral ao DEC-205 associada a um estímulo de maturação foram capazes de provocar a rejeição a pequenos tumores já estabelecidos na maioria dos camundongos⁶⁷.

A imunossupressão mediada por linfócitos Treg é essencial para a prevenção de doenças autoimunes, entretanto, certas neoplasias podem aproveitar desse mecanismo para escaparem do controle imunológico, essencial para a progressão neoplásica. Dessa forma, o estudo da presença dessas células naturalmente imunossupressoras é essencial para a compreensão desse mecanismo de imunotolerância no ambiente neoplásico. Desse modo, os linfócitos Treg CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ que ocorrem naturalmente nos tecidos e que podem ser induzidos, inclusive pela radiação UV, são células chave para a compreensão desse fenômeno na fotocarcinogênese.

A identificação desse subconjunto específico de Treg é realizada pela presença do fator de transcrição FOXP3, que é o marcador mais específico disponível atualmente¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

O acúmulo de linfócitos Treg induzidos por UV é dependente tanto da migração de células de Langerhans para os linfonodos, quanto da presença de dano induzido por UV no DNA dessas células, pois um estímulo que não apenas danifica as células de Langerhans, mas provoca sua morte não desencadeia a indução das células Treg. Essa descoberta sustenta a hipótese de que o aparecimento de células de Langerhans danificada pela radiação, mas ainda viável nos linfonodos é um evento essencial para a geração de Treg induzido por UV¹⁰⁸.

A presença de Treg, evidenciada pelo anticorpo anti-FOXP3, foi observada em todos os grupos analisados, excetuando-se nas amostras de lábio normal, que foram

todas negativas para esse marcador. No entanto, merecem destaque quanto às maiores médias de células por campo, os grupos de casos de QA com displasia epitelial intensa (41,0 células/campo) e de CEL (65,6 células/campo), demonstrado no gráfico 5.7. Quanto à análise estatística, houve diferença significativa entre os grupos QA moderada e CEL; QA intensa e LN; e CEL e LN.

Quanto ao padrão de marcação do fator de transcrição FOXP3, notou-se que todos os espécimes de QA exibiram apenas marcação nuclear, porém entre os 18 casos de CEL, 3 apresentaram tanto marcação nuclear, quanto citoplasmática e outros 3 exibiram somente marcação citoplasmática. Determinados fatores como citocinas, células do sistema imune, ligantes e receptores de células neoplásicas provenientes do microambiente tumoral podem induzir uma alteração na localização celular do FOXP3 entre os padrões de expressão citoplasmática e nuclear, o que resultaria de modificações pós-tradução¹⁰⁹, também observadas em lesões de carcinoma hepatocelular¹¹⁰. Por outro lado, a expressão do fator de transcrição FOXP3 no citoplasma pode indicar ausência de função.

Portanto, sugere-se que há formação de um microambiente imunotolerante tanto nas lesões de QA, principalmente aquelas classificadas no grupo de displasia intensa e nas lesões de CEL, em virtude do acúmulo observado de linfócitos Treg, além da pequena quantidade de células dendríticas maduras CD83⁺ observada em todos os casos. Desse modo, como há estudos relacionando a indução de Treg pela radiação ultravioleta, por meio de células de Langerhans apresentando fotoprodutos em seu DNA, este trabalho sinaliza que a imunossupressão induzida por UV pode contribuir para o mecanismo de imunotolerância fisiológico e induzido pelo microambiente tumoral, na fotocarcinogênese.

7 CONCLUSÃO

Verificou-se um acúmulo de células de Langerhans, evidenciado pelos marcadores CD207 e CD1a, tanto no epitélio da queilite actínica (QA), como nas ilhotas neoplásicas do carcinoma epidermoide de vermelhão de lábio (CEL) nas amostras analisadas.

Na QA, em todos os graus de displasia epitelial, foi possível notar que as células DEC-205⁺ foram as predominantes, o que significa um acúmulo tanto de células dendríticas imaturas, como em estágio de maturação.

Sugere-se que há um microambiente imunotolerante nos estágios precoces da fotocarcinogênese em lábio, evidenciado pela acentuada quantidade de linfócitos Treg FOXP3⁺ e presença mínima de células dendríticas maduras CD83⁺.

Pode-se dizer que também há sinais de formação de um microambiente imunotolerante no CEL, em virtude, principalmente, da quantia notável de linfócitos Treg FOXP3⁺ em relação às demais células analisadas. Entretanto, a presença de quantia expressiva de células dendríticas DEC-205⁺ representa uma certa taxa de maturação que deve estar ocorrendo.

A quantidade de células dendríticas CD83⁺ que são maduras e ativas, quanto à apresentação antigênica, foi baixa, contribuindo para o fenômeno da imunotolerância tanto nos eventos precoces da fotocarcinogênese, quanto no CEL já estabelecido.

REFERÊNCIAS¹

1. Luna-Ortiz K, Guemes-Meza A, Villavicencio-Valencia V, Mosqueda-Taylor A. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. *Oral Oncol*. 2004 Nov;40(10):992-9.

2. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial*. 3a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. 972 p.

3. Salgarelli AC, Sartorelli F, Cangiano A, Collini M. Treatment of lower lip cancer: an experience of 48 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Jan;34(1):27-32.

4. Rojas IG, Martinez A, Brethauer U, Grez P, Yefi R, Luza S, et al. Actinic cheilitis: epithelial expression of COX-2 and its association with mast cell tryptase and PAR-2. *Oral Oncol*. 2009 Mar;45(3):284-90.

5. Cataldo E, Doku HC. Solar cheilitis. *J Dermatol Surg Oncol*. 1981 Dec;7(12):989-95.

6. Marcucci. *Estomatologia*. 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2005.

7. Cavalcante ASR, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic Cheilitis: Clinical and Histological Features. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2008;66(3):498-503.

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

9. Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Aug;88(2):181-6.

10. Robinson JK. Actinic cheilitis. A prospective study comparing four treatment methods. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989 Jul;115(7):848-52.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

11. Manganaro AM, Will MJ, Poulos E. Actinic cheilitis: a premalignant condition. *Gen Dent*. 1997 Sep-Oct;45(5):492-4.
12. Girard KR, Hoffman BL. Actinic cheilitis. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980 Jul;50(1):21-4.
13. Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 1987 Aug;17(2 Pt 1):255-64.
14. Main JH, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc*. 1994 Feb;60(2):113-6.
15. Dufresne RG, Jr., Curlin MU. Actinic cheilitis. A treatment review. *Dermatol Surg*. 1997 Jan;23(1):15-21.
16. Shah AY, Doherty SD, Rosen T. Actinic cheilitis: a treatment review. *Int J Dermatol*. 2010 Nov;49(11):1225-34.
17. Diffey BL. Human exposure to solar ultraviolet radiation. *J Cosmet Dermatol*. 2002 Oct;1(3):124-30.
18. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*. 2010 Sep;49(9):978-86.
19. Timares L, Katiyar SK, Elmetts CA. DNA Damage, Apoptosis and Langerhans Cells—Activators of UV-induced Immune Tolerance. *Photochemistry and Photobiology*. 2008;84(2):422-36.
20. Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res*. 2001 Mar;488(1):65-76.
21. Krutmann J. The role of UVA rays in skin aging. *Eur J Dermatol*. 2001 Mar-Apr;11(2):170-1.

22. Duthie MS, Kimber I, Norval M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol*. 1999 Jun;140(6):995-1009.
23. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006 Jul;150(1):25-38.
24. Urbach F. Welcome and introduction: evidence and epidemiology of ultraviolet-induced cancers in man. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1978 Dec(50):5-10.
25. Forbes PD. Photocarcinogenesis: an overview. *J Invest Dermatol*. 1981 Jul;77(1):139-43.
26. de Gruijl FR, Forbes PD. UV-induced skin cancer in a hairless mouse model. *Bioessays*. 1995 Jul;17(7):651-60.
27. Schwarz T. 25 years of UV-induced immunosuppression mediated by T cells- from disregarded T suppressor cells to highly respected regulatory T cells. *Photochem Photobiol*. 2008 Jan-Feb;84(1):10-8.
28. Okuno E, Vilela MAC. *Radiação ultravioleta: características e efeitos*. 1ªed. São Paulo: Editora Livraria da Física; 2005. 78 p.
29. Melnikova VO, Ananthaswamy HN. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res*. 2005 Apr 1;571(1-2):91-106.
30. Colman MS, Afshari CA, Barrett JC. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res*. 2000 Apr;462(2-3):179-88.
31. Benjamin CL, Ullrich SE, Kripke ML, Ananthaswamy HN. p53 tumor suppressor gene: a critical molecular target for UV induction and prevention of skin cancer. *Photochem Photobiol*. 2008 Jan-Feb;84(1):55-62.
32. Gibbs NK, Tye J, Norval M. Recent advances in urocanic acid photochemistry, photobiology and photoimmunology. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2008;7(6):655.

33. Kaneko K, Travers JB, Matsui MS, Young AR, Norval M, Walker SL. cis-Urocanic Acid Stimulates Primary Human Keratinocytes Independently of Serotonin or Platelet-Activating Factor Receptors. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(11):2567-73.
34. Beissert S, Schwarz T. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1999 Sep;4(1):61-4.
35. Majewski S, Jantschitsch C, Maeda A, Schwarz T, Schwarz A. IL-23 antagonizes UVR-induced immunosuppression through two mechanisms: reduction of UVR-induced DNA damage and inhibition of UVR-induced regulatory T cells. *J Invest Dermatol*. 2010 Feb;130(2):554-62.
36. Fisher MS, Kripke ML. Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Apr;74(4):1688-92.
37. Goettsch W, Garssen J, De Gruijl FR, Van Loveren H. Effects of UV-B on the resistance against infectious diseases. *Toxicol Lett*. 1994 Jun;72(1-3):359-63.
38. Miura S, Kulka M, Smith CC, Imafuku S, Burnett JW, Aurelian L. Cutaneous ultraviolet radiation inhibits herpes simplex virus-induced lymphoproliferation in latently infected subjects. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Jul;72(1):62-9.
39. Murphy GM. Ultraviolet radiation and immunosuppression. *Br J Dermatol*. 2009 Nov;161 Suppl 3:90-5.
40. Kripke ML. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst*. 1974 Nov;53(5):1333-6.
41. Kripke ML. Effects of UV radiation on tumor immunity. *J Natl Cancer Inst*. 1990 Sep 5;82(17):1392-6.
42. Aubin F. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *Eur J Dermatol*. 2003 Nov-Dec;13(6):515-23.

43. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(7):523-32.
44. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol*. 2004 Dec;4(12):941-52.
45. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, Flavell JR, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol*. 2008 Jul;173(1):195-204.
46. Bennaceur K, Chapman J, Touraine J, Portoukalian J. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2009;1795(1):16-24.
47. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. 6^a ed:Porto Alegre: Artmed; 2006. 908 p.
48. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
49. Lechmann M, Zinser E, Golka A, Steinkasserer A. Role of CD83 in the Immunomodulation of Dendritic Cells. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2002;129(2):113-8.
50. Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological Reviews*. 2010;234(1):120-41.
51. Valladeau J, Dezutter-Dambuyant C, Saeland S. Langerin/CD207 sheds light on formation of birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. *Immunol Res*. 2003;28(2):93-107.
52. Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devilard E, Kissenpfennig A, Malissen B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 2007 Dec 24;204(13):3119-31.

53. Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, et al. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med*. 2007 Dec 24;204(13):3133-46.

54. Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH, et al. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med*. 2007 Dec 24;204(13):3147-56.

55. Elmetts CA, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Wood PJ, Streilein JW. Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J Exp Med*. 1983 Sep 1;158(3):781-94.

56. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*. 2000 Jan 1;164(1):183-90.

57. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):737-42.
58. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol*. 2006 Jan;126(1):15-24.

59. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87.

60. Fisher MS, Kripke ML. Suppressor T lymphocytes control the development of primary skin cancers in ultraviolet-irradiated mice. *Science*. 1982 Jun 4;216(4550):1133-4.

61. Moodycliffe AM, Nghiem D, Clydesdale G, Ullrich SE. Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nat Immunol*. 2000 Dec;1(6):521-5.

62. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer*. 2010 Aug 15;127(4):759-67.

63. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
64. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol.* 2007 Feb;8(2):191-7.
65. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, et al. Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med.* 2007 Jan 22;204(1):57-63.
66. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells: major players in the tumor microenvironment. *Curr Pharm Des.* 2009;15(16):1879-92.
67. Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer Res.* 2005 Aug 1;65(15):7007-12.
68. Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *British Journal of Cancer.* 2005;92(5):913-20.
69. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003 Feb;9(2):606-12.
70. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2005 Mar 15;65(6):2457-64.
71. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res.* 2003 Oct 1;9(12):4404-8.

72. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 15;12(18):5423-34.

73. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002 Sep 1;169(5):2756-61.

74. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):942-9.

75. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 1;24(34):5373-80.

76. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*. 2003 Sep 1;98(5):1089-99.

77. Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Saito K, Ikeda H, Kuribayashi K, et al. Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):681-6.

78. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*. 2003;21:807-39.

79. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*. 2005 Oct 3;202(7):919-29.

80. Barnes. World Health Organization Classification of Tumours. pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

81. Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med*. 1999 Nov 15;190(10):1417-26.
82. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-96.
83. Bayerl C, Ueltzhoffer A, Jung EG. Langerhans cells enclosing sunburn cells in acute UV erythema in vivo. *Arch Dermatol Res*. 1999 May;291(5):303-5.
84. Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin JJ, Dezutter-Dambuyant C, Vincent C, Massacrier C, et al. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol*. 1999 Sep;29(9):2695-704.
85. Hemmi H, Yoshino M, Yamazaki H, Naito M, Iyoda T, Omatsu Y, et al. Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int Immunol*. 2001 May;13(5):695-704.
86. Stoitzner P, Stingl G, Merad M, Romani N. Langerhans Cells at the Interface of Medicine, Science, and Industry. *J Invest Dermatol*. 2010;130(2):331-5.
87. Araujo CP, Gurgel CA, Ramos EA, Freitas VS, Barbosa Ade A, Jr., Ramalho LM, et al. Accumulation of CD1a-positive Langerhans cells and mast cells in actinic cheilitis. *J Mol Histol*. 2010 Dec;41(6):357-65.
88. Santoro A, Majorana A, Roversi L, Gentili F, Marrelli S, Vermi W, et al. Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus. *J Pathol*. 2005;205(4):426-34.
89. Gustafson J, Eklund C, Wallstrom M, Zellin G, Magnusson B, Hasseus B. Langerin-expressing and CD83-expressing cells in oral lichen planus lesions. *Acta Odontol Scand*. 2007 Jun;65(3):156-61.

90. Pesce G, Fiorino N, Riccio AM, Montagna P, Torre G, Salmaso C, et al. Different intrathyroid expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease: analysis at mRNA level and association with B7.1 costimulatory molecule. *J Endocrinol Invest*. 2002 Mar;25(3):289-95.

91. Chen SR, Luo YP, Zhang JK, Yang W, Zhen ZC, Chen LX, et al. Study on immune function of dendritic cells in patients with esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004 Apr 1;10(7):934-9.

92. Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1998 Mar;4(3):585-93.

93. Chen S, Akbar SM, Tanimoto K, Ninomiya T, Iuchi H, Michitaka K, et al. Absence of CD83-positive mature and activated dendritic cells at cancer nodules from patients with hepatocellular carcinoma: relevance to hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*. 2000 Jan 1;148(1):49-57.

94. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 1997 Nov 4;73(3):309-16.

95. Thurnher M, Radmayr C, Ramoner R, Ebner S, Bock G, Klocker H, et al. Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells. *Int J Cancer*. 1996 Sep 27;68(1):1-7.

96. Stoitzner P, Stingl G, Merad M, Romani N. Langerhans cells at the interface of medicine, science, and industry. *J Invest Dermatol*. 2010 Feb;130(2):331-5.

97. Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*. 1998 Feb;10(1):50-5.

98. Kato M. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *International Immunology*. 2006;18(6):857-69.

99. Butler M, Morel A-S, Jordan WJ, Eren E, Hue S, Shrimpton RE, et al. Altered expression and endocytic function of CD205 in human dendritic cells, and detection of a CD205?DCL-1 fusion protein upon dendritic cell maturation. *Immunology*. 2007;120(3):362-71.
100. Kato M, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S, Hart DN. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol*. 2000 Nov;12(11):1511-9.
101. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Feb;2(2):77-84.
102. Inaba K, Swiggard WJ, Inaba M, Meltzer J, Mirza A, Sasagawa T, et al. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell Immunol*. 1995 Jun;163(1):148-56.
103. Stoitzner P, Tripp CH, Douillard P, Saeland S, Romani N. Migratory Langerhans cells in mouse lymph nodes in steady state and inflammation. *J Invest Dermatol*. 2005 Jul;125(1):116-25.
104. Wang B, Kuroiwa JM, He LZ, Charalambous A, Keler T, Steinman RM. The human cancer antigen mesothelin is more efficiently presented to the mouse immune system when targeted to the DEC-205/CD205 receptor on dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1174:6-17.
105. Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, Yamaguchi T, Kawano R, Suzumiya J, et al. Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *Br J Haematol*. 2004 Jul;126(1):81-4.
106. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004 Nov;16(11):1643-56.
107. Bonelli M, von Dalwigk K, Savitskaya A, Smolen JS, Scheinecker C. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis*. 2008 May;67(5):664-71.

108. Schwarz T, Schwarz A. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced immunosuppression. *Eur J Cell Biol.* 2011 Jun-Jul;90(6-7):560-4.
109. Chen C, Rowell EA, Thomas RM, Hancock WW, Wells AD. Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J Biol Chem.* 2006 Dec 1;281(48):36828-34.
110. Wang WH, Jiang CL, Yan W, Zhang YH, Yang JT, Zhang C, et al. FOXP3 expression and clinical characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2010 Nov 21;16(43):5502-9.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 367035
Protocolo 160/2010

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "Análise do fenômeno de intolerância na fotocardinogênese em tábic", da responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Renate Helena F. Caramaz P. Dias, sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Marília Trieyerler Martins.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 23 de setembro de 2010.

Prof. Dra. Marília Trieyerler Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP