



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

LARISSA CUNHA CÉ

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BETA-DEFENSINA 3 EM LESÕES DE
LEUCOPLASIA ORAL POR MEIO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E CORRELAÇÃO COM
O GRAU DE DISPLASIA EPITELIAL

RIBEIRÃO PRETO

2018

Larissa Cunha Cé

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BETA-DEFENSINA 3 EM LESÕES DE
LEUCOPLASIA ORAL POR MEIO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E CORRELAÇÃO COM
O GRAU DE DISPLASIA EPITELIAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto
UNAERP, como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Yara T. Corrêa Silva Sousa

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso

RIBEIRÃO PRETO

2018

Dedico este trabalho à minha família, pai Flávio,
mãe Lívia e irmãos, Flávio, Lísia e Laura, pessoas
que amo incondicionalmente e pelas quais sou
grata por ter em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da magnífica reitora **Profa. Elmara Lúcia de Oliveira Bonini**, por possibilitar meu desenvolvimento intelectual e profissional.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara T. Corrêa Silva Sousa**, por não medir esforços para a manutenção e pela constante evolução do programa *stricto sensu*. Pela oportunidade concedida e por contribuir para o meu crescimento profissional e intelectual.

A Orientadora e Amiga Yara Silva Sousa, pela orientação e ensinamentos proporcionados nessa pesquisa;

A Co-Orientadora e Amiga Fernanda G. Basso, por todo auxílio, dedicação e atenção para a realização desse estudo;

A Professora e Amiga Erica, pelos bons momentos e ensinamentos durante o curso;

A técnica do Laboratório de Patologia Bucal da UNAERP, Marilena Heredia, pela disponibilidade, atenção e boa vontade na realização da parte experimental desse estudo;

Aos meus colegas do Curso, em especial ao meu Amigo e Colega Carlos Rech, pela companhia e amizade;

Ao meu Amigo e Colega Alexandre Basualdo, por estar sempre presente em minha vida, pelo estímulo sempre gerado de sua parte e pela disponibilidade em sempre me ajudar;

A minha Amiga e colega Roberta Neuwald Pauletti, pela disponibilidade em me ajudar e por entender minha ausência em alguns momentos.

A minha Amiga e Professora Ivonete Brum, por me auxiliar e participar de mais uma etapa de minha formação acadêmica;

A minha família, que está sempre presente em minha vida, me apoiando e torcendo positivamente por mim.

RESUMO

O diagnóstico precoce das lesões malignas da cavidade oral relaciona-se diretamente ao prognóstico do tratamento, bem como à qualidade de vida dos pacientes. Estudos recentes têm demonstrado que o carcinoma espinocelular, assim como as desordens orais potencialmente malignas (DOPM), apresentam aumento da expressão de algumas proteínas, consideradas, atualmente, como marcadores da carcinogênese oral, podendo ser utilizadas como fatores de diagnóstico precoce. Dentre estas proteínas, cita-se a beta-defensina 3 (HBD3), que apresenta sua expressão aumentada em lesões leucoplásicas com displasia epitelial. Porém, sua incidência e sua participação nas DOPM e lesões malignas da cavidade oral não está totalmente caracterizada. Desta forma, este estudo teve como objetivo determinar a expressão da HBD3 em lesões de leucoplasia da cavidade oral, correlacionando-se esta expressão com níveis de displasia tecidual. Foram analisadas 16 amostras de lesões de leucoplasia oral, provenientes do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Obtiveram-se novas secções histológicas dos casos selecionados, que foram submetidas à coloração em hematoxilina e eosina e à análise da expressão de HBD3 por meio de imuno-histoquímica. Após os protocolos, analisaram-se as amostras em microscópio óptico, obtendo-se fotomicrografias, nas quais foram analisados 10 campos por amostra. Considerou-se a distribuição da expressão de HBD-3 nos diferentes estratos epiteliais, bem como a presença e gravidade de displasia tecidual. Como controle negativo e positivo, utilizaram-se amostras de hiperplasia gengival e carcinoma espinocelular, respectivamente, as quais foram submetidas aos mesmos procedimentos. Para avaliar a correlação entre ambos os fatores, realizou-se o teste estatístico Qui-quadrado, considerando-se o nível de significância de 5%. Dos casos avaliados, a incidência de lesões foi uniforme para os gêneros feminino e masculino. Os pacientes apresentaram média de idade de 57 anos, com variação entre 39 e 73 anos de idade. Observou-se maior expressão de HBD3 para os casos de leucoplasia oral quando comparados com o controle negativo. Também foi observada correlação positiva entre a expressão de HBD3 nos estratos epiteliais mais superiores (escamoso, granuloso e córneo) e a presença e gravidade de displasia nas amostras de leucoplasia oral. Dessa forma, conclui-se que a HBD3 pode ser utilizada como um possível marcador da carcinogênese em lesões malignas e DOPM, colaborando para seu diagnóstico precoce e melhor prognóstico.

Palavras-chave: Leucoplasia. Lesões potencialmente malignas. Beta-defensina 3. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

The early diagnosis of malignant disorders of the oral cavity is closely related to its prognosis, as well as patients quality of life. Recent studies have shown that squamous cell carcinoma (SCC), as well as oral potentially malignant disorders (OPMD), show increased expression of some proteins, which have been considered as oral carcinogenic markers and can be used as precocious diagnosis factors. Among these proteins, we can mention beta-defensin 3 (HBD3), that is increased in oral leukoplakic lesions that show epithelial dysplasia. However, incidence and participation of HBD3 in oral cavity malignant and OPMD are not fully characterized. Thus, this study aimed to determine the HBD3 expression in oral leukoplakia lesions, correlating its expression to tissue dysplasia levels. Sixteen oral leukoplakia lesions samples coming from the Laboratory of Oral Pathology of Ribeirão Preto University (UNAERP) were analyzed. New histological sections were obtained from the selected cases, which were stained with hematoxylin and eosin and also for the analysis of HBD3 expression, by immunohistochemistry. After the protocols, the samples were analyzed in optical microscope, through which photomicrographs were obtained. Ten fields were analyzed for each sample considering the HBD-3 expression distribution in the different epithelial layers, as well as tissue dysplasia presence and severity. Gingival hyperplasia and SCC samples, respectively, were considered as negative and positive controls, which were submitted to the same procedures. To evaluate the correlation between both factors, the chi-square statistical test was performed, considering a significance level of 5%. About the evaluated cases, the lesions incidence was uniform for the female and male genders. The patients average age was 57 years, ranging from 39 to 73 years-old. The largest HBD3 expression was observed for oral leukoplakia cases when compared with negative control. Also, a positive correlation was observed among HBD3 expression in the upper epithelial layers (squamous, granular and corneal) and dysplasia presence and severity in oral leukoplakia samples. Thus, it can be concluded that HBD3 can be used as a carcinogenesis marker in malignant lesions and OPMD, collaborating for the early diagnosis and better prognosis.

Key words: Leukoplakia. Potentially malignant lesions. Beta-defensin 3. Immunohistochemistry.

SUMÁRIO

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	08
1.1 DESORDENS ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS	08
1.2 DISPLASIA EPITELIAL ORAL.....	10
1.4 LEUCOPLASIA ORAL.....	13
1.5 DEFENSINAS.....	18
2 PROPOSIÇÃO	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
3.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HBD3 POR IMUNO-HISTOQUÍMICA	23
3.3. COLORAÇÃO EM HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)	25
3.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	26
3.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	28
4 RESULTADOS	29
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desordens Orais Potencialmente Malignas

As desordens orais potencialmente malignas (DOPM) são condições crônicas que possuem risco aumentado para a transformação em carcinoma espinocelular (MELLO et al., 2018). O termo envolve ambas, condições e lesões pré-cancerosas referidas previamente nas definições pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WARNAKULASURIYA, 2018). Em 1972, a OMS subdividiu o termo “pré-câncer” em “lesões” e “condições” potencialmente malignas e, recentemente, o termo “desordens potencialmente malignas da cavidade oral” tem sido utilizado. (SARODE et al., 2014). Por definição, DOPMs são apresentações clínicas que apresentam risco de desenvolvimento de câncer na cavidade oral, seja em uma lesão precursora clinicamente definível ou na mucosa oral clinicamente normal (REIBEL et al., 2017).

Pesquisadores estabeleceram que, virtualmente, todos os cânceres orais são precedidos por alterações clínicas visíveis na mucosa oral, geralmente em forma de manchas/placas brancas ou vermelhas (processo de duas etapas do desenvolvimento do câncer). A prevenção e o diagnóstico precoce das DOPM têm potencial não apenas de reduzir a incidência, mas também de melhorar a sobrevivência daqueles que desenvolvem câncer oral (SARODE et al., 2012).

As DOPM são amplamente discutidas na literatura. O conceito de denotar algumas lesões ou desordens da mucosa oral como “potencialmente malignas” baseia-se nas seguintes evidências (WARNAKULASURIYA, 2007):

1. Em estudos longitudinais, áreas de tecido com determinadas alterações clinicamente identificadas primeiramente como "pré-cancerosas" sofreram alterações malignas durante o acompanhamento;

2. Algumas dessas alterações, particularmente manchas vermelhas e brancas, são vistas coexistindo nas margens dos CEC;

3. Uma proporção dessas lesões pode compartilhar alterações morfológicas e citológicas observadas nas malignidades epiteliais, mas sem invasão franca;

4. Algumas das alterações cromossômicas, genômicas e moleculares encontradas nos cânceres orais claramente invasivos são detectadas nessas fases presumíveis "pré-cancerosas" ou "pré-malignas".

De acordo com Warnakulasuriya (2018), o espectro das DOPM inclui: leucoplasia oral, eritroleucoplasia oral, fibrose submucosa oral, lesões palatinas em pacientes que fazem uso do fumo invertido, líquen plano oral, reações liquenoides orais, doença do enxerto versus hospedeiro, lúpus ritematoso oral e algumas condições hereditárias como a disceratose congênita e a epidermólise bolhosa. A queilite actínica do lábio inferior também está associada ao risco

aumentado do câncer de lábio. De acordo com a OMS (2017), as DOPM são: eritroplasia, eritroleucoplasia, leucoplasia, fibrose roal submucosa, disceratose congênita, ceratose do tabaco sem fumaça, lesões palatinas associadas ao fumo invertido, candidíase crônica, líquen plano, lúpus eritematoso discoide, glossite sífilítica e queilite actínica (apenas no lábio) (REIBEL et al., 2017).

As DOPM possuem diferentes causas. O uso de tabaco (mascado e/ou tragado) e o consumo de álcool estão associados a algumas leucoplasias (NAPIER e SPEIGHT, 2008). O uso da noz de areca, com ou sem tabaco, causa fibrose oral submucosa (TILAKARATNE et al., 2006). Para muitos casos de DOPM, nenhum fator etiológico é conhecido. Alto risco para infecção por HPV raramente está presente nas DOPMs (MCCORD et al., 2013; WOO et al., 2013) e quando ele apresenta papel na transformação ainda não foi determinado.

A maioria dessas desordens pode ser assintomática nos estágios iniciais de sua evolução e podem ser detectadas por cirurgiões-dentistas em exame clínico de rotina. Portanto, é essencial que os profissionais de saúde conheçam as características clínicas e os aspectos diagnósticos das DOPM no intuito de investigar melhor e, quando apropriado, encaminhar a um especialista para tratamento (WARNAKULASURIYA, 2018).

A maioria das DOPMs de alto risco formam lesões orais vermelhas, brancas ou salpicadas. Usa-se o termo clínico "leucoplasia" para descrever placas brancas de risco questionável, uma vez excluídas outras condições específicas e outras DOPMs (WARNAKULASURIYA et al., 2007), o que normalmente requer biópsia. As DOPMs especificamente definidas possuem apresentações características e a displasia epitelial pode ou não estar presente (VAN DER WAAL, 2009).

Dentre as DOPMs, a eritroplasia e a leucoplasia apresentam maior potencial de malignidade (definir porcentagem), sendo este potencial definido a partir da identificação de áreas com displasia celular/tecidual. Além disso, as características clínicas das lesões como heterogeneidade e rugosidade também estão diretamente relacionadas ao potencial de malignização (REF).

1.2 Displasia epitelial oral

A displasia epitelial oral (DEO) é um espectro das alterações epiteliais arquiteturais e citológicas causadas pelo acúmulo de alterações genéticas, associadas ao aumento do risco de progressão para carcinoma espinocelular (REIBEL et al., 2017).

A DEO inclui proliferação, maturação e diferenciação anormais das células epiteliais. O epitélio pode ser atrófico, acantótico, queratinizado ou não queratinizado. A tabela 1 lista as

alterações arquiteturais e citológicas que são usadas no diagnóstico das DEO. O número e a combinação das características variam entre as lesões. Não há evidências para indicar como a presença de características individuais poderia ser traduzida em um grau de displasia. Nenhuma combinação específica das características distingue fielmente hiperplasia de displasia leve. A DEO pode ser diagnosticada apenas com base nas características arquiteturais e citológicas. Tradicionalmente, a DEO divide-se em três graus de severidade. Julgando-se o número de terços do epitélio afetado define-se um fator na graduação.

Tabela 1. Critérios diagnósticos para a displasia epitelial; adaptado de Barnes L et al., 2005

Alterações na arquitetura	Alterações citológicas
Estratificação epitelial irregular	Variação anormal no tamanho do núcleo
Perda da polaridade basal das células	Variação anormal na forma do núcleo
Projeções epiteliais em forma de gota	Variação anormal no tamanho da célula
Aumento do número de figuras mitóticas	Variação anormal na forma da célula
Figuras mitóticas superficiais anormais	Relação N:C aumentada
Queratinização precoce em células isoladas	Figuras mitóticas atípicas
Pérolas de queratina dentro das cristas epiteliais	Número e tamanho aumentados do nucléolo
Perda da coesão das células epiteliais	Hipercromasia

Fonte: WHO Classification of Tumours of the Head and Neck. Tumours of the oral cavity and oropharynx. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017.

A displasia é um espectro e não existem critérios para dividir precisamente este espectro em categorias leve, moderada e severa (BARNES et al., 2005). Displasia leve é caracterizada pela perda da arquitetura limitada ao terço inferior do epitélio acompanhado de atipias citológicas define o critério mínimo de displasia (BARNES et al., 2005).

A displasia moderada, apresenta perda da arquitetura que se estende até o terço médio da epitélio é o critério inicial para o reconhecimento dessa categoria (BARNES et al., 2005), enquanto a displasia severa inicia-se com mais de dois terços do epitélio mostrando perda arquitetural com atipias citológicas associadas (BARNES et al., 2005).

Já o termo carcinoma *in situ* utiliza-se para lesões em que houve transformação maligna, mas não há invasão presente. Não é possível reconhecer isso morfológicamente. Recomenda-se

o seguinte para o diagnóstico de carcinoma *in-situ*: anormalidades na arquitetura celular em espessura total ou espessura quase total nas camadas celulares viáveis acompanhadas por atipias celulares pronunciadas. Figuras mitóticas atípicas e mitoses superficiais anormais são comumente vistas no carcinoma *in situ* (BARNES et al., 2005)

No entanto, os graus de displasia são pobremente reproduzíveis entre observadores. Alguns estudos mostram bom prognóstico (SPERANDIO et al., 2013), mas outros encontram uma má associação com o resultado (FISCHER et al., 2004; MACDONALD et al., 1975). Um consenso na graduação após a revisão por mais de um patologista pode melhorar a fidelidade do diagnóstico. (FLESKENS et al., 2011; SPEIGHT et al., 2015; SPERANDIO et al., 2013).

Embora a presença de displasia correlacione-se com o desenvolvimento de carcinoma espinocelular, muitas DEOs nunca progridem para carcinoma. Encontrou-se em uma meta-análise de casos com displasia epitelial uma taxa de 12% (MEHANNA, 2009). Geralmente, quanto mais avançado o grau de displasia, maior a chance de desenvolver-se carcinoma espinocelular (LEE et al., 2000; MEHANNA et al., 2009; SILVERMAN et al., 1984; WARNAKULASURIYA et al., 2011). As taxas de transformação maligna de 15 anos de displasia leve, moderada e grave (conforme definido pelo sistema tradicional de três graus) são de aproximadamente 6%, 18% e 39%, respectivamente, e a presença de displasia indica risco a longo prazo (SPERANDIO et al., 2013). O problema geral da baixa reprodutibilidade dos critérios diagnósticos atuais é subjacente à fraca correlação com a transformação encontrada em alguns estudos (BROUNS et al., 2009; DOST et al., 2014; HOLMSTRUP et al., 2006).

1.3 Leucoplasia Oral

No intuito de diagnosticar precisamente esta condição é importante considerar a definição dada à leucoplasia oral (LO) (WARNAKULASURIYA e ARIYAWARDANA (2016). Historicamente o termo leucoplasia era um termo clínico utilizado para denotar qualquer mancha branca aderente ou uma placa (ceratose). Ao longo de muitas décadas, os clínicos perceberam que nem todas as manchas brancas na cavidade oral deveriam ser classificadas como leucoplasia oral. Muitas definições foram dadas à leucoplasia oral nas últimas décadas. A definição mais recente em uso refere-se à leucoplasia como “placas predominantemente brancas de risco questionável excluindo-se outras doenças ou desordens conhecidas que possuem risco aumentado para câncer” (WARNAKULASURIYA, 2007). A OMS define a LO como uma placa ou mancha branca que não pode ser caracterizada clínica ou patologicamente como qualquer outra doença. O termo é estritamente clínico e não implica uma alteração tecidual histopatológica específica (AWADALLAH et al., 2018). Exemplos de outras lesões brancas benignas que devem

ser excluídas para se chegar ao diagnóstico de leucoplasia oral são: ceratose friccional, ceratose do rebordo alveolar, leucoedema, nevo branco esponjoso, grânulos de Fordyce que são geralmente de cor amarela” (WARNAKULASURIYA, 2018).

A leucoplasia oral pode ser assintomática ou apresentar uma aparência clínica benigna tornando difícil para o clínico, por vezes, diferenciá-la de desordens reacionais ou inflamatórias (benignas) comuns da mucosa oral (VÁZQUEZ-ÁLVAREZ et al., 2010). Geralmente é diagnosticada após a quarta década de vida, sendo mais comum em homens (VÁZQUEZ-ÁLVAREZ et al., 2010) e seis vezes mais comum entre tabagistas do que entre não tabagistas. O consumo de álcool é um fator de risco independente. A leucoplasia não está associada a agentes causais químicos ou físicos exceto o tabaco, álcool ou masca de Betel (AXÉLL et al., 1996). Em uma minoria de casos de leucoplasia o papiloma vírus humano pode apresentar papel potencial. Algumas leucoplasias são idiopáticas e podem não apresentar um fator de risco conhecido (WARNAKULASURIYA, 2018). Sítios comuns de envolvimento em populações ocidentais industrializadas incluem a margem lateral da língua e soalho da boca. Entretanto, entre asiáticos a mucosa bucal e sulco labial inferior são comumente afetados devido à colocação da masca de Betel nesses locais. A leucoplasia gengival é incomum, mas foi relatada afetar predominantemente a população japonesa (NAGAO et al., 2016).

Uma mancha de leucoplasia oral pode variar de uma área circunscrita muito pequena até a uma lesão extensa envolvendo grande área da mucosa. Existem dois tipos clínicos de leucoplasia encontrados na prática clínica: leucoplasia homogênea e leucoplasia não-homogênea. A diferença baseia-se na cor da superfície e nas características morfológicas (espessura e textura). As leucoplasias homogêneas são uniformemente achatadas e finas, possuem superfície lisa e podem exibir fissuras rasas.

Variedades não-homogêneas compreendem três tipos clínicos e geralmente são sintomáticas. A leucoplasia salpicada caracteriza-se por ser mista, branca e vermelha (também chamada eritroleucoplasia) mas mantendo predominantemente a característica branca .

A leucoplasia nodular consiste em pequenos crescimentos polipoides, circundados por excrescências brancas ou vermelhas.

Por fim, a leucoplasia exofítica ou verrucosa apresenta uma aparência de superfície enrugada ou ondulada (DILHARI et al., 2016).

Geralmente, as lesões de leucoplasias são assintomáticas e são observadas durante o exame visual de rotina pelo cirurgião-dentista. Os sintomas, se presentes, estão associados ao tipo não homogêneo salpicado, podendo incluir desconforto, formigamento e sensibilidade ao toque, a bebidas quentes e alimentos temperados. O componente vermelho na leucoplasia

(eritroleucoplasia) indica a possibilidade de colonização por cândida e um risco aumentado para displasia e/ou malignidade (DILHARI et al., 2016). Quando as manchas de leucoplasia são múltiplas ou estão espalhadas utiliza-se o termo leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP). Esta é uma entidade distinta que carrega um alto risco para transformação maligna e, felizmente, é rara. Realiza-se um diagnóstico clínico provisório de leucoplasia para uma placa branca após a exclusão de uma causa traumática local, através da confirmação de que ela não pode ser removida por raspagem e que a cor não desaparece após a distensão do tecido. Deve-se dar a devida consideração também para excluir outras condições que clinicamente aparecem de cor branca (DIZ et al. 2011).

A leucoplasia é um diagnóstico clínico provisório e a lesão branca deve ser enviada ao patologista através de uma biópsia do tecido. As razões para a biópsia são para excluir outras patologias (incluindo carcinoma) que podem ser responsáveis pela lesão branca e para avaliar a presença e grau de displasia epitelial da lesão (BOY, 2012). Outro motivo adicional é avaliar qualquer colonização por cândida no epitélio. O grau de displasia relatado pelo patologista, apesar das controvérsias considerando-se a interpretação, permanece sendo a melhor maneira de avaliar o risco para a transformação maligna das DOPMs (WARNAKULASURIYA et al., 2008).

1.4 Defensinas

As superfícies epiteliais são caracterizadas por funções inatas efetivas, as quais contribuem para a proposta protetora, além de favorecer o estabelecimento do equilíbrio regulado entre saúde e doença. A função epitelial é particularmente relevante na cavidade oral, a qual inclui um meio único, no qual a mucosa preenche um propósito protetor crítico, servindo como uma interface entre os meios interno e externo. O epitélio não é apenas uma barreira física, mas também tem mecanismos de defesa químicos contendo peptídeos antimicrobianos, como as defensinas.

As defensinas são peptídeos antimicrobianos endógenos, pequenos e ricos em cisteína os quais são produzidas pelo leucócitos e células epiteliais. Muitas defensinas agem ligando-se à membrana celular e uma vez embutidas, formam defeitos na membrana, como poros, que permitem o efluxo de nutrientes e íons essenciais (BHAGAWATI et al., 2012). De acordo com Howell e Leeuw (2018), esses peptídeos efetores da imunidade inata desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro. Eles atuam diretamente pela inativação de microrganismos, mas também ligam a imunidade inata à adaptativa. Uma variedade de funções imunológicas

inatas tem sido descrita para esses peptídeos, incluindo quimiotaxia e liberação de citocinas (HOWELL e LEEUW, 2018),

No período de 2000 a 2010 houve a descoberta e caracterização de uma série de defensas humanas. A análise da informação genômica indica que o número de moléculas defensinas-like codificadas pelo genoma humano podem ser numeradas em dezenas. O crescente interesse nas defensas constantemente melhora o conhecimento sobre variados aspectos como a localização de gene, padrões de expressão e fatores de transcrição envolvidos na sua regulação *in vivo*. As propriedades das defensas como agentes antimicrobianos parecem ser apenas uma pequena parte na extensa rede das inter-relações entre o sistema imune e estudos estruturais das defensas provêm as bases moleculares para o melhor entendimento de suas propriedades, funções e seu potencial em aplicações práticas (PAZGIER et al., 2006).

As defensas podem ser subdivididas em duas famílias, α - e β -defensas. As diferenças entre as famílias são baseadas no comprimento e no dobramento das cadeias de peptídeos, localização e posição dos resíduos de cisteína na sequência de aminoácidos e pontes dissulfeto, os quais são responsáveis pelo pareamento das cisteínas. As α -defensas consistem em 29 a 35 aminoácidos e são mais curtas que as β -defensas, as quais consistem em 38 a 42 resíduos (SESTED et al., 1985).

Evidências substanciais acumularam-se nos últimos anos, indicando que as defensas em mamíferos são multifuncionais e, pela interação com receptores de células do hospedeiro, participam de ambas imunidades antimicrobianas do hospedeiro, inata e adaptativa. Em humanos, seis α -defensas e quatro β -defensas foram identificadas. Os leucócitos polimorfonucleares expressam α -defensas como parte de seu mecanismo não-oxidativo, enquanto as β -defensas são expressas pelas células epiteliais mucosas (DIAMOND et al., 1998).

As β -defensas humanas (HBDs) são peptídeos de defesa do hospedeiro que não apenas exibem propriedades antimicrobianas, mas também estimulam várias atividades celulares, incluindo proliferação de queratinócitos, migração e cicatrização de feridas (KIATSURAYANON et al., 2014).

A localização das β -defensas HBD1, HBD2 e HBD3 no epitélio estratificado escamoso (incluindo mucosa oral e pele) foram confirmadas em níveis de mRNA e proteína. Relatou-se que as β -defensas humanas 1 (HBD1) e 2 (HBD2) são expressas na pele, plasma, intestinos, saliva e epitélio estratificado na cavidade oral (SCHRODER, 1999). As células epiteliais orais normais também expressam altos níveis de beta defensas (FRYE et al., 2000). De fato, demonstrou-se a expressão das beta defensas em tecido gengival, mucosa bucal, língua,

glândulas salivares e outras regiões orais. (ZHAO et al., 1996; MATHEWS et al., 1999; KRISANAPRAKORNKIT et al., 1998). Além da expressão fisiológica, esses peptídeos também foram encontrados em condições inflamatórias orais, carcinomas e diferentes linhagens celulares derivadas de carcinomas orais (MIZUKAWA et al., 1999 (I), MIZUKAWA et al., 2000 (II)).

Pesquisas em rápida evolução analisando a extensão do papel das beta-defensinas humanas (HBDs) na quimiotaxia, resposta imune inata e promoção da angiogênese sugerem que seus efeitos coletivos se estendem além de seus mecanismos antimicrobianos (PAZGIER et al., 2006). De fato, as numerosas funções celulares básicas associadas às beta defensinas humanas demonstram que esses peptídeos possuem impacto duplo na saúde, podendo ser vantajosos em certas condições, mas potencialmente prejudiciais em outras. As consequências dessas funções são refletidas na superexpressão das HBDs nas doenças, como a psoríase e recentemente sua associação com a sinalização pró-tumoral (WEINBERG et al., 2012).

Os mecanismos reguladores das respostas das beta-defensinas na saúde e na doença ainda estão sendo elucidados. Claramente, o espectro de função atribuído agora à regulação das HBDs identifica essas moléculas como reguladores celulares importantes cuja expressão apropriada é crítica para a sobrevivência imune própria. Por exemplo: a expressão das beta-defensinas próxima a áreas de desregulação celular pode, inadvertidamente, exacerbar a progressão de uma doença. Dessa forma, entendendo os mecanismos que regulam a sinalização contextual das HBDs torna-se uma importante área de concentração laboratorial diagnóstica. Assim, usando-se uma combinação de meios biológicos imunológicos, bioquímicos e moleculares, identificaram-se vias de sinalização associadas às HBDs promotoras da homeostase imune e iniciou-se a exclusão do papel inapropriado que as beta-defensinas assumem na etiopatogênese de diversas doenças (WEINBERG et al., 2012).

As beta-defensinas interagem de forma cruzada com o sistema imune adaptativo através de interações específicas com quimiocinas e receptores de células linfóides e mielóides, resultando em modulação das respostas celulares imunocompetentes do hospedeiro (YANG et al., 1999; BIRAGYN et al., 2001, 2002; QUINONES-MATEU et al., 2003; FENG et al., 2006; FUNDERBURG et al., 2007; JIN et al., 2010; ROHRL et al., 2010).

A expressão de beta-defensinas por células epiteliais tem o objetivo de manter a flora natural em um estado estável em diferentes sítios, como a pele, o intestino e a cavidade bucal. Entretanto, há novas evidências indicando a participação destas moléculas na promoção ou severidade de neoplasias. A super-expressão de beta-defensina humana 3 (HBD3) em tumores de origem epitelial, promove quimiotaxia seletiva de células mielóides para o sítio da lesão e

estimula essas células a secretar citocinas pro-inflamatórias, contribuindo para a manutenção de ambiente favorável para o crescimento tumoral (KAWSAR et al., 2009; JIN et al., 2010).

A expressão beta-defensinas (HBD1, HBD2 e HBD3) tem sido relacionada a indução da carcinogênese oral. Segundo estudo de WENGHOEFER et al. (2008), a expressão de HBD1 apresenta-se diminuída para lesões potencialmente malignas e malignas da cavidade oral, o que sugere que esta proteína pode apresentar um papel no desenvolvimento do carcinoma de células escamosas oral, sendo que sua perda de expressão pode contribuir para a progressão maligna desses tumores (WENGHOEFER et al., 2008).

Mais recentemente, as HBD3 mostraram regular a imunidade adaptativa, através da quimiotaxia de macrófagos, células dendríticas imaturas, células T de memória, mastócitos e monócitos *in vitro*. No epitélio humano oral normal, a HBD3 é produzida por células da camada basal mitoticamente ativas, ao passo que DEFB101 e 102 são co-expressas nas camadas diferenciadas espinhosa e granulosa (KAWSAR et al., 2008). A expressão da HBD3, a maior das defensinas em comprimento, foi detectada em no tecido epitelial em várias localizações incluindo a pele, esôfago, traqueia e tecido gengival (DUNSCHE et al., 2001) e também nas glândulas salivares (HARDER et al., 2001; NISHIMURA et al., 2003). Também de acordo com BATONI et al. (2006), identificou-se a HBD3 no tecido uscular, placenta, pele bem como na placenta, fluido crevicular, segundo da expressão pelos queratinócitos orais.

Novas informações sobre o papel da HBD3 na progressão do câncer oral foram fornecidas. De forma interessante, as células presentes nas lesões potencialmente malignas da cavidade bucal apresentam super-expressão de HBD3 (KAWSAR et al., 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram que a HBD3 promove uma quimiotaxia de células monocíticas THP-1 e que o fator de crescimento epidérmico induz significativamente a expressão da HBD3 nas células epiteliais orais via proteína kinase mitógeno-ativada (MAPK) kinase MEK1/2, p38 MAPK, proteína kinase C (PKC) e kinase fosfoinositide 3 (PI3K), mas não pela via Janus kinase (JAK) e transdutor de sinal e ativador de transcrição (STATs). Esses resultados sugerem que a HBD3 atua como fator mitogênico responsivo na iniciação do câncer oral e pode atuar como um sinal mobilizador para recrutar macrófagos associados ao tumor (KAWSAR, 2009). Desta forma, este estudo teve como objetivo determinar a expressão da HBD3 em lesões de leucoplasia da cavidade bucal, através de análise imuno-histoquímica, correlacionando-se também o grau de displasia, que, de acordo com Manchanda e Shetty (2012) classifica-se em leve, moderada e severa.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão da beta defensina humana 3 (HBD3) em lesões de leucoplasia da cavidade bucal por meio de técnica imuno-histoquímica.

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a expressão da HBD3 em leucoplasias orais.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o padrão da imunomarcagem de HBD3 em lesões de leucoplasia oral;
- Avaliar e graduar a presença de displasia nas lesões de leucoplasia oral;
- Determinar a correlação entre a expressão da HBD3 e os diferentes graus de displasia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo está de acordo com a Resolução CNS/CONEP 466/12 e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto (Anexo 1).

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo casos provenientes do Laboratório de Patologia Bucal da UNAERP, com diagnóstico clínico e histopatológico compatíveis com leucoplasia.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os casos provenientes do Laboratório de Patologia Bucal da UNAERP, cujos diagnóstico clínico e histopatológico não foram confirmados clínica ou histologicamente como leucoplasia foram excluídos das análises propostas.

3.1 Delineamento experimental

O material para esse estudo foi obtido do banco de dados do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Foram selecionadas 16 amostras de lesões de leucoplasia da cavidade bucal, previamente submetidas ao processamento histológico convencional e incluídas em blocos de parafina.

Os blocos de parafina contendo os espécimes foram submetidos a novos cortes histológicos com 3µm de espessura para coloração em hematoxilina e eosina (H&E) e a realização da técnica de imuno-histoquímica para identificação da expressão de HBD3. Para tanto, anticorpos contra HBD3 humana foram utilizados.

3.2 Análise da expressão de HBD3 por imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas seguindo o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Patologia Bucal da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) descrito a seguir:

3.2.1 Desparafinização e reidratação

Esta preparação das amostras foi realizada a partir de banhos de xilol e série decrescente de álcool etílico até a água destilada.

3.2.2 Recuperação antigênica

As amostras foram submetidas à técnica de recuperação antigênica por meio de adição de solução Tris/EDTA (Promega, Madison, WS, USA) pH 9,0, em banho-maria a 95-99°C, por 30 minutos.

Após o término da recuperação, as amostras foram resfriadas por 10 minutos a temperatura ambiente.

A seguir, as amostras foram lavadas em água destilada por 3 vezes.

3.2.3 Bloqueio da peroxidase endógena

O bloqueio das amostras foi realizado com solução Bloqueadora de Peroxidase - Spring – Cód. DHP-125 ou similar) por meio de incubação a temperatura ambiente (20-25°C), por 30 minutos.

Então, as amostras foram novamente lavadas em água destilada, seguida de lavagem com tampão TBS-Tween 20 (Tris Buffered Saline) (Promega) por 5 minutos.

3.2.4 Bloqueio protéico das amostras

Para realizar o bloqueio das amostras, cujo objetivo é evitar reações inespecíficas, estas foram submetidas a incubação com solução de albumina bovina (BSA –Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) por 10 minutos, dentro da câmara úmida, em temperatura ambiente.

A seguir, o excesso do reagente foi eliminado e as amostras foram submetidas a incubação com o anticorpo primário.

3.2.5 Aplicação do anticorpo primário

Foi utilizado o anticorpo anti-DEFB3 (Biorbyt, San Francisco, California, USA), na concentração de 1:100 em solução tampão TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20 – Promega). Foram aplicados 100uL do anticorpo sobre cada corte histológico, seguido de incubação por período overnight (16 – 18 horas) a 4° C, em câmara úmida.

Após este período, as amostras foram submetidas à lavagens com tampão de lavagem TBS com Tween 20, por 3 vezes consecutivas, de 5 minutos cada.

3.2.6 Aplicação do sistema de visualização

Após incubação com o anticorpo primário, as amostras foram suavemente secas e submetidas a aplicação do polímero N-Histofine anti-rabbit (Nichirei Biosciences INC., Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, Japan), seguido de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida.

Após esta etapa, estas foram lavadas por três vezes de 5 minutos cada em tampão de lavagem TBS com Tween 20 (Promega).

3.2.7 Aplicação do substrato-cromógeno (DAB - diaminobenzidina)

A solução DAB (ScyTek Laboratories Inc., Logan, UT, EUA) foi diluída em substrato específico (50 µl de cromógeno em 1ml de Substrato) e aplicada sobre as amostras por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram lavadas em água destilada duas vezes.

3.2.8 Contra-coloração e montagem

Por fim, foi realizada a contra coloração com hematoxilina de Harris, desidratação e diafanização em xilol e a montagem das lâminas com reagente de montagem.

Para controle da reação, as amostras foram submetidas a incubação exclusivamente com o sistema de visualização histofine (Nichirei Biosciences INC)).

Como controle negativo experimental, foi utilizada amostra de hiperplasia gengival sem a presença de infiltrado inflamatório, enquanto amostra carcinoma epidermoide oral foi utilizada como controle positivo.

3.3. Coloração em Hematoxilina e Eosina (H&E)

Para coloração em H&E, os blocos de parafina contendo as amostras foram fixados em micrótomo (Leica modelo RM 2125 RT; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e foram obtidos cortes seriados de 5,0 µm de espessura, que foram posicionados em lâminas

histológicas identificadas. Em seguida, as mesmas foram colocadas em estufa para fixar os cortes e escorrer a parafina.

A seguir, as amostras foram submetidas ao procedimento de coloração, conforme descrito: banho em xilol (3 vezes, por 10 minutos cada), banhos em soluções de álcool etílico (95%, 80%, 70%, 50%), seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e água destilada. Coloração com hematoxilina por 7 minutos, seguido de água corrente por 10 minutos, banho de etanol 80% e coloração em eosina por 1 minuto.

Após estes procedimentos, as amostras foram então submetidas a desidratação e clarificação e montagem.

3.4. Análise dos resultados

A análise dos resultados foi realizada em microscópio de luz. Foram avaliados 10 campos aleatórios de cada amostra, dos quais foram obtidas fotomicrografias, considerando a positividade da imunomarcção para HBD3 (DEFB103), bem como a distribuição da imunomarcção nos diferentes estratos do tecido epitelial estratificado. Utilizou-se o microscópio BIOFOCUS BIO-2000 com câmera digital MDC2000 Microscope Digital Camera através do programa de computador Future WinJoe nos aumentos de 50, 100 e 200 vezes.

Portanto, cada campo foi analisado de acordo com a distribuição da imunomarcção positiva para HBD3, considerando os estratos do tecido epitelial. Os critérios estabelecidos para tal análise estão descritos na Tabela 2. Após análise de cada campo, foi considerado para cada amostra o valor da média de scores obtida.

Tabela 2. Determinação da disposição (extensão) das imunomarcção positiva para HBD3 para cada campo e para as amostras.

Score	Estratos do epitélio com imunomarcção positiva
1	Basal e para-basal
2	Basal, para-basal e escamoso
3	Basal, para basal, escamoso e granuloso

Fonte: Autor

As amostras também foram avaliadas quanto a presença e grau de displasia, utilizando aquelas amostras coradas em H&E. Após análise de 10 campos por amostra, estes foram

classificados de acordo com os critérios demonstrados na Tabela 3. Após análise de cada campo, foi considerado para cada amostra o valor da média de scores obtida.

Tabela 3. Determinação do grau de displasia para cada campo e para as amostras

Score	Grau de displasia	Características observadas
0	Ausência	Ausência de características de displasia celular/tecidual
1	Displasia leve	Alterações limitadas principalmente às camadas basal e para-basal.
2	Displasia moderada	Envolvimento da camada basal a porção media da camada espinhosa
3	Displasia severa	Alterações desde a camada basal até um nível acima da porção media do epitélio

Fonte: Adaptado de MANCHANDA e SHETTY, 2012.

3.5 Análise dos dados

Após análise qualitativa, scores foram utilizados para análise de correlação, considerando o grau de displasia e a distribuição da imunomarcação para HBD3, utilizando o teste Qui-Quadrado, também considerando nível de significância de 5%. Os dados epidemiológicos foram demonstrados descritivamente.

4 RESULTADOS

Foram avaliados 16 casos de lesões leucoplásicas da cavidade oral, a partir de amostras previamente enviadas ao Laboratório de Patologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), para análise histopatológica. Dos pacientes avaliados, houve uma distribuição homogênea entre gênero feminino (50%) e masculino (50%). A idade dos pacientes variou de 39 a 73 anos, com maior incidência para a 5ª década de vida (50 – 60 anos de idade). O sítio bucal mais afetado foi o lábio inferior (31,25%), seguido do soalho bucal (25%) (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição epidemiológica dos pacientes avaliados

Características	Número de pacientes (%)
<i>Gênero</i>	
Feminino	8 (50%)
Masculino	8 (50%)
<i>Idade</i>	
0 – 40	1 (6,25%)
40 – 50	2 (12,5%)
50 – 60	7 (43,75%)
60 - 70	3 (18,75%)
70 - 80	3 (18,75%)
<i>Raça</i>	
Branca	16 (100%)

Fonte: Autor

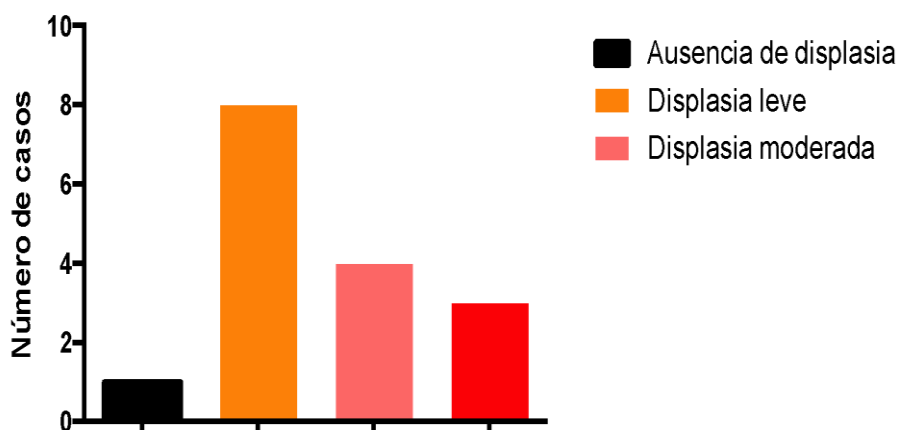
Quanto aos aspectos clínicos, a maior parte das lesões era caracterizada como manchas e placas brancas (75%), de superfície rugosa (56%). As lesões descritas como de superfície rugosa apresentaram maiores graus de displasia (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição das lesões de leucoplasia

Características	Número de pacientes (%)
<i>Sítio bucal</i>	
Lábio inferior	5 (31,25%)
Soalho bucal	4 (25%)
Mucosa jugal	2 (12,5%)
Dorso/lateral de língua	2 (12,5%)
Ventre de língua	1 (6,25%)
Rebordo alveolar	2 (12,5%)
<i>Lesão fundamental</i>	
Placa	6 (37,5%)
Mancha	6 (37,5%)
Pápula/Nódulo	4 (25%)
<i>Coloração</i>	
Branca	10 (62,5%)
Rósea	6 (37,%)
<i>Superfície</i>	
Lisa	7 (43,75%)
Rugosa	9 (56,25%)

Fonte: Autor

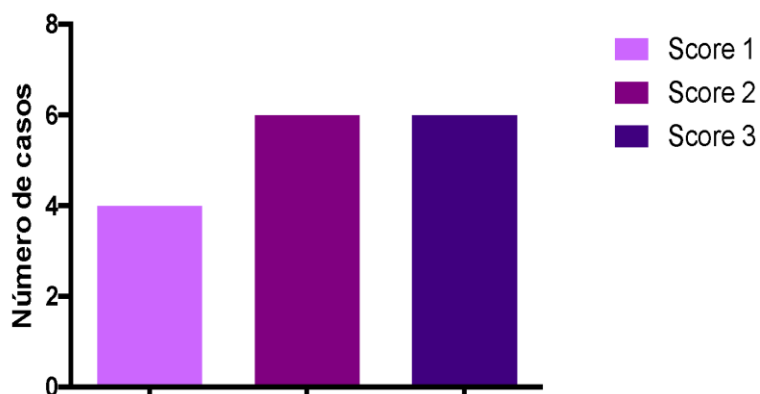
Os resultados demonstraram que a maior parte das lesões apresentava grau de displasia leve, que correspondeu a 50% dos casos avaliados (Figura 1).

Figura 1. Número de casos de acordo com o grau de displasia tecidual.

Fonte: Autor

Além disso, a maioria das lesões apresentou scores 2 e 3 para a distribuição da imunomarcação (75%) (Figura 2).

Figura 2. Número de casos de acordo com o score para imunomarcação de HBD3.



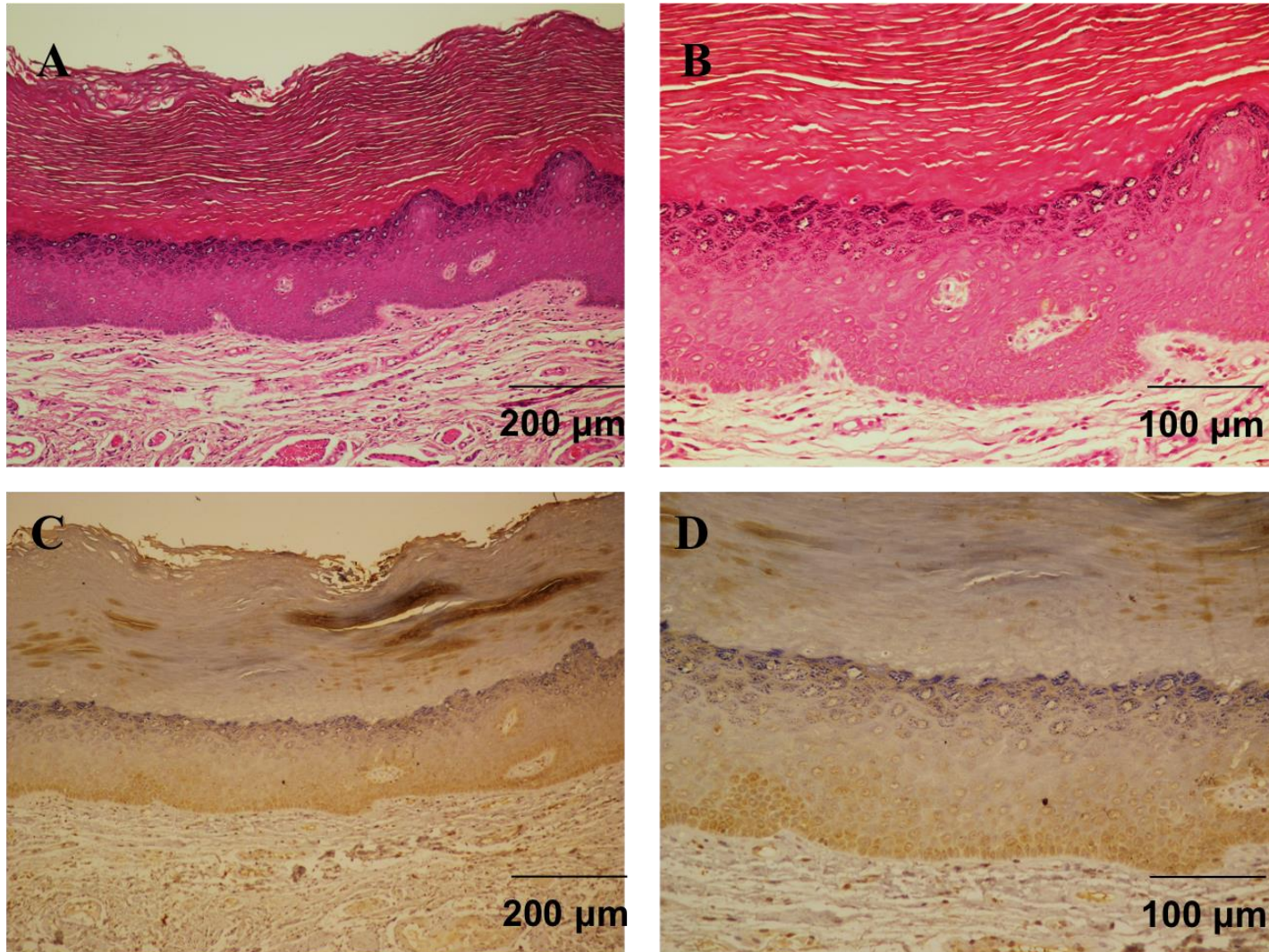
Fonte: Autor

Os resultados também demonstraram que houve correlação positiva entre o número de camadas do epitélio (score 3) que se apresentaram positivas para a imunomarcação para HBD3 e a presença e severidade da displasia tecidual (scores 2 e 3) (Qui-quadrado, $p < 0,05$).

A análise das amostras revelou que, para as amostras com ausência de displasia (score 0), a expressão de HBD3 foi restrita às camadas basal e para-basal (score 1) (Figura 3). Das amostras que apresentavam displasia leve (score 2) (Figura 4), 25% apresentavam imunomarcação positiva apenas nas camadas basal e para-basal (score 1). Além disso, 43% das amostras que apresentaram imunomarcação positiva para as camadas espinhosa e granulosa (score 3) apresentavam displasia celular moderada (score 2) (Figura 5) ou severa (score 3) (Figura 6).

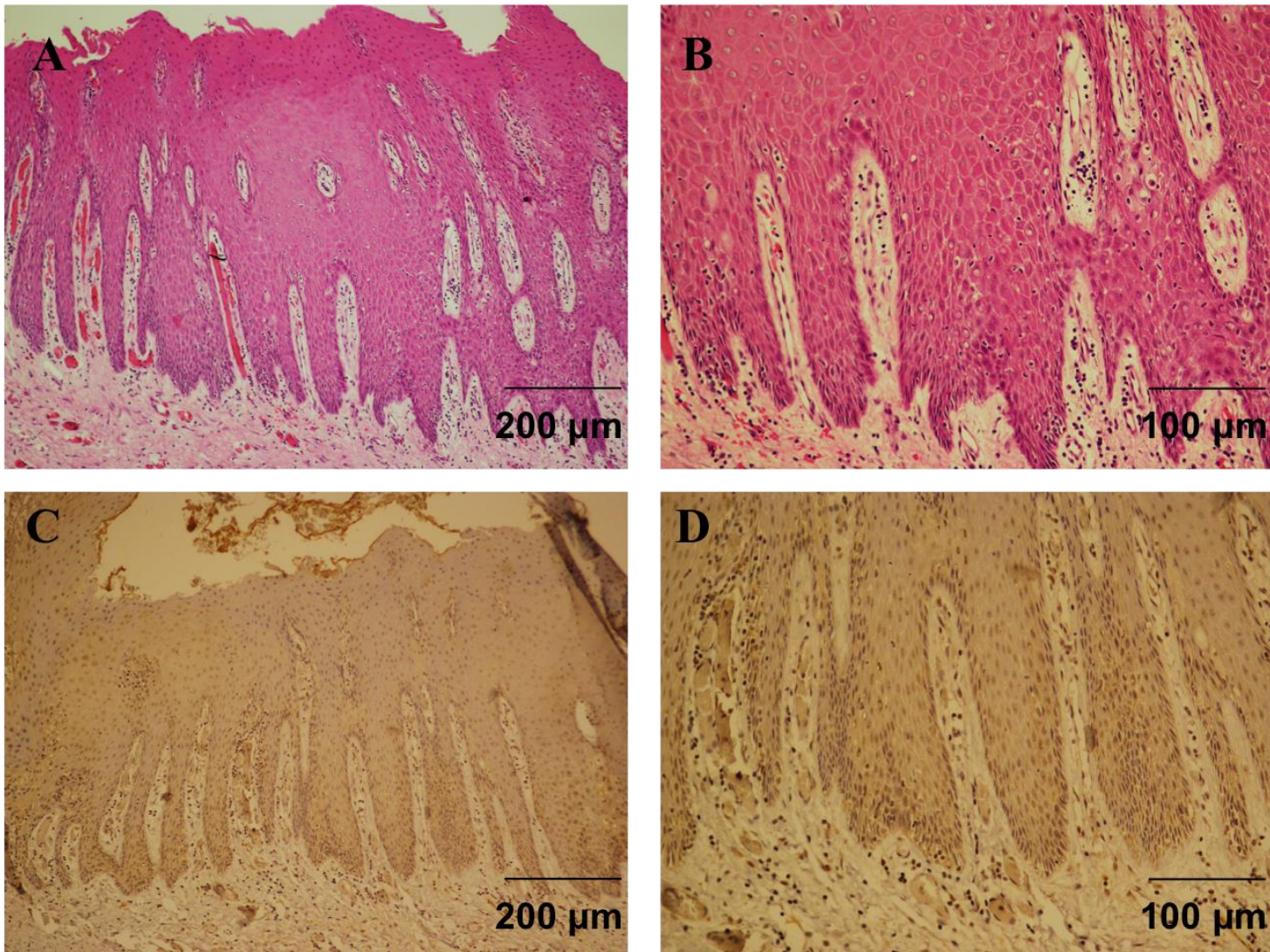
A amostra selecionada como controle negativo, de hiperplasia gengival, apresentou imunomarcação para HBD3 apenas na camada basal (Figura 7), enquanto a amostra selecionada como controle positivo, de carcinoma espinocelular, apresentou imunomarcação positiva e intensa para todas as camadas do epitélio, com marcação difusa para as ilhas de tecido epitelial que invadiram o tecido conjuntivo (Figura 8).

Figura 3. Fotomicrografias de amostra de leucoplasia oral sem alterações displásicas, em coloração H&E (A – 100X; B – 200X) e imunohistoquímica para HBD3 (C – 100X; D – 200X).



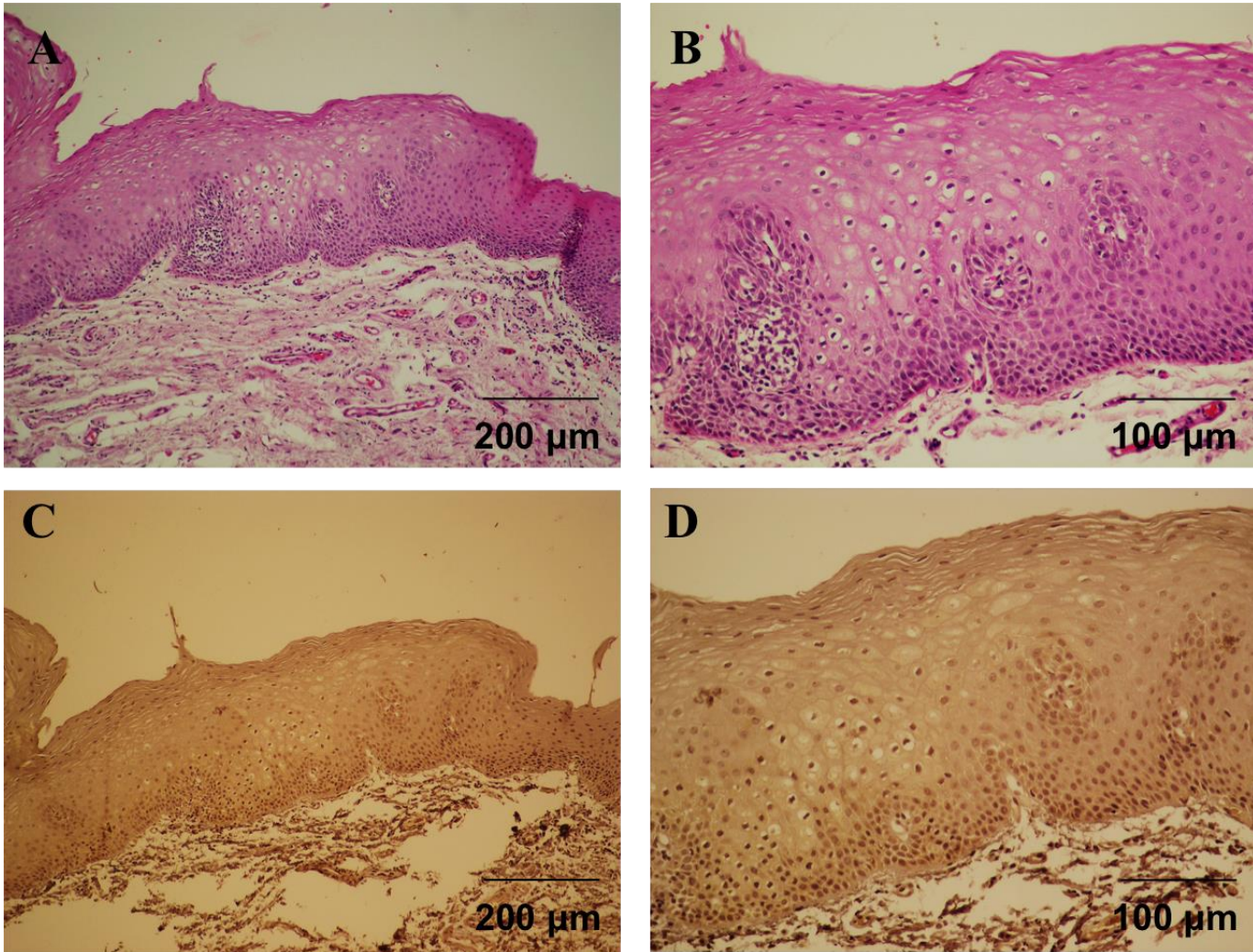
Fonte: Autor

Figura 4. Fotomicrografias de amostra de leucoplasia oral com displasia leve, em coloração H&E (A – 100X; B – 200X) e imuno-histoquímica para HBD3 (C – 100X; D – 200X).



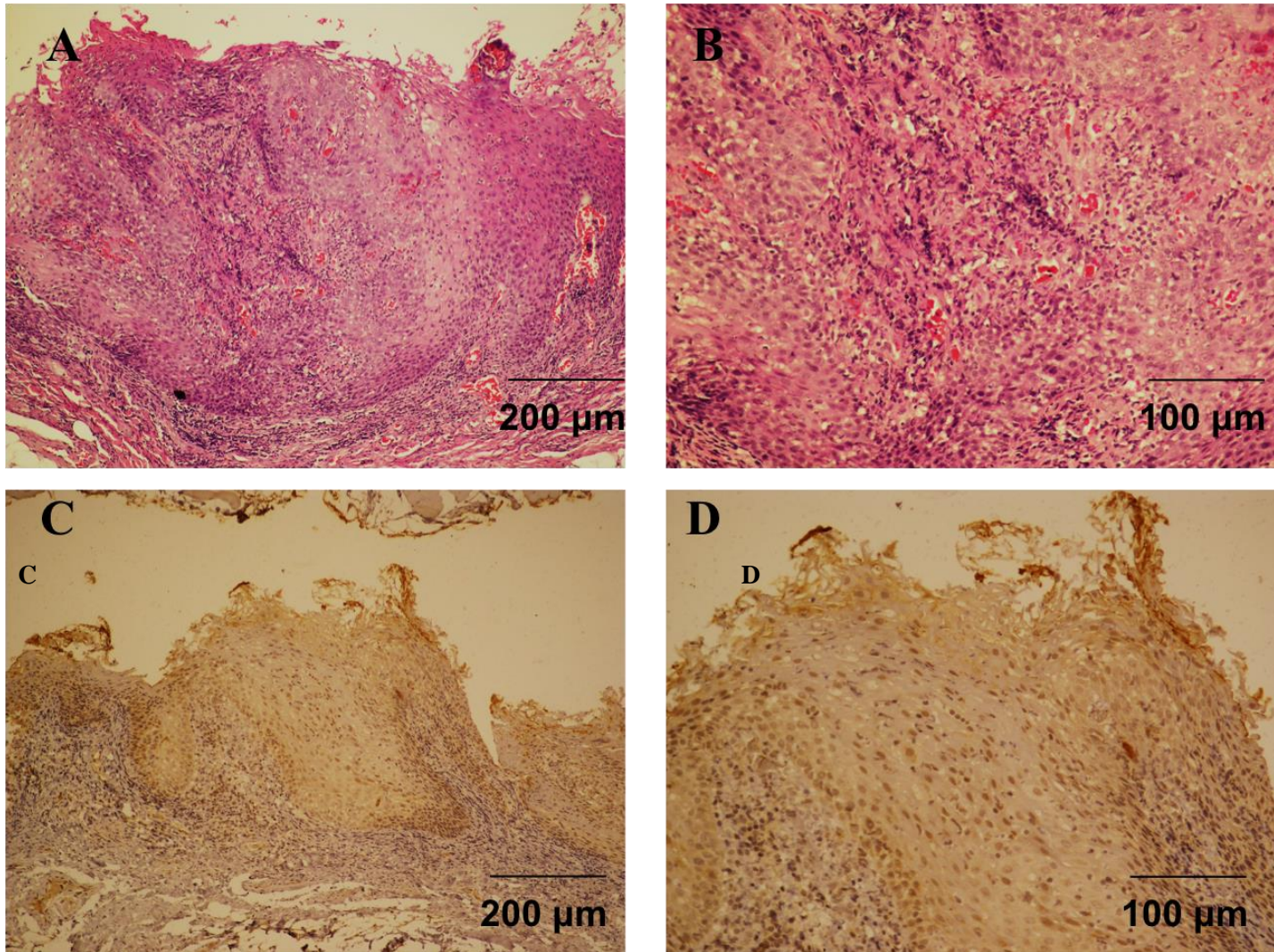
Fonte: Autor

Figura 5. Fotomicrografias de amostra de leucoplasia oral com displasia moderada, em coloração H&E (A – 100X; B – 200X) e imunohistoquímica para HBD3 (C – 100X; D – 200X).



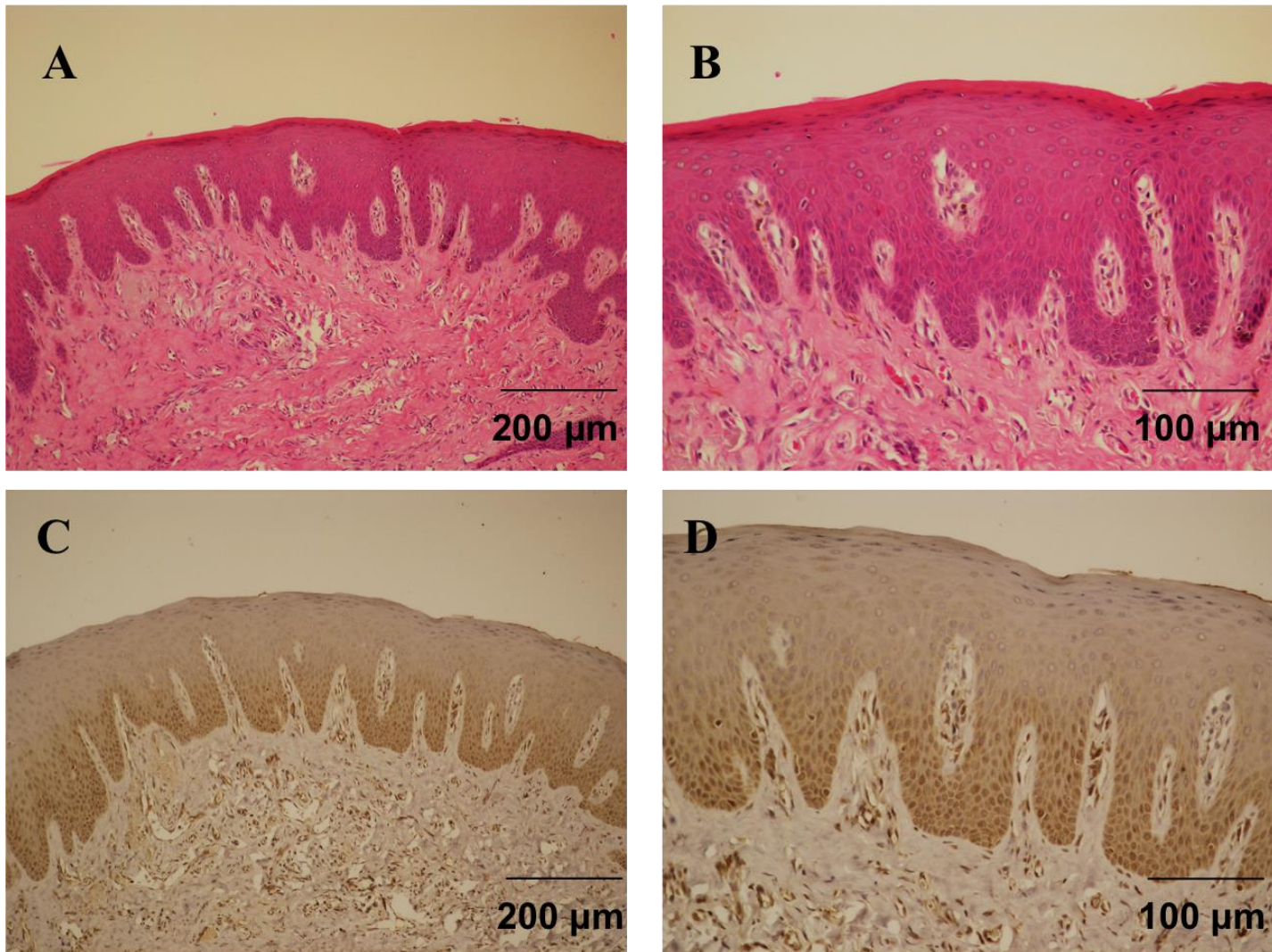
Fonte: Autor

Figura 6. Fotomicrografias de amostra de leucoplasia oral com displasia severa, em coloração H&E (A – 100X; B – 200X) e imunohistoquímica para HBD3 (C – 100X; D – 200X).



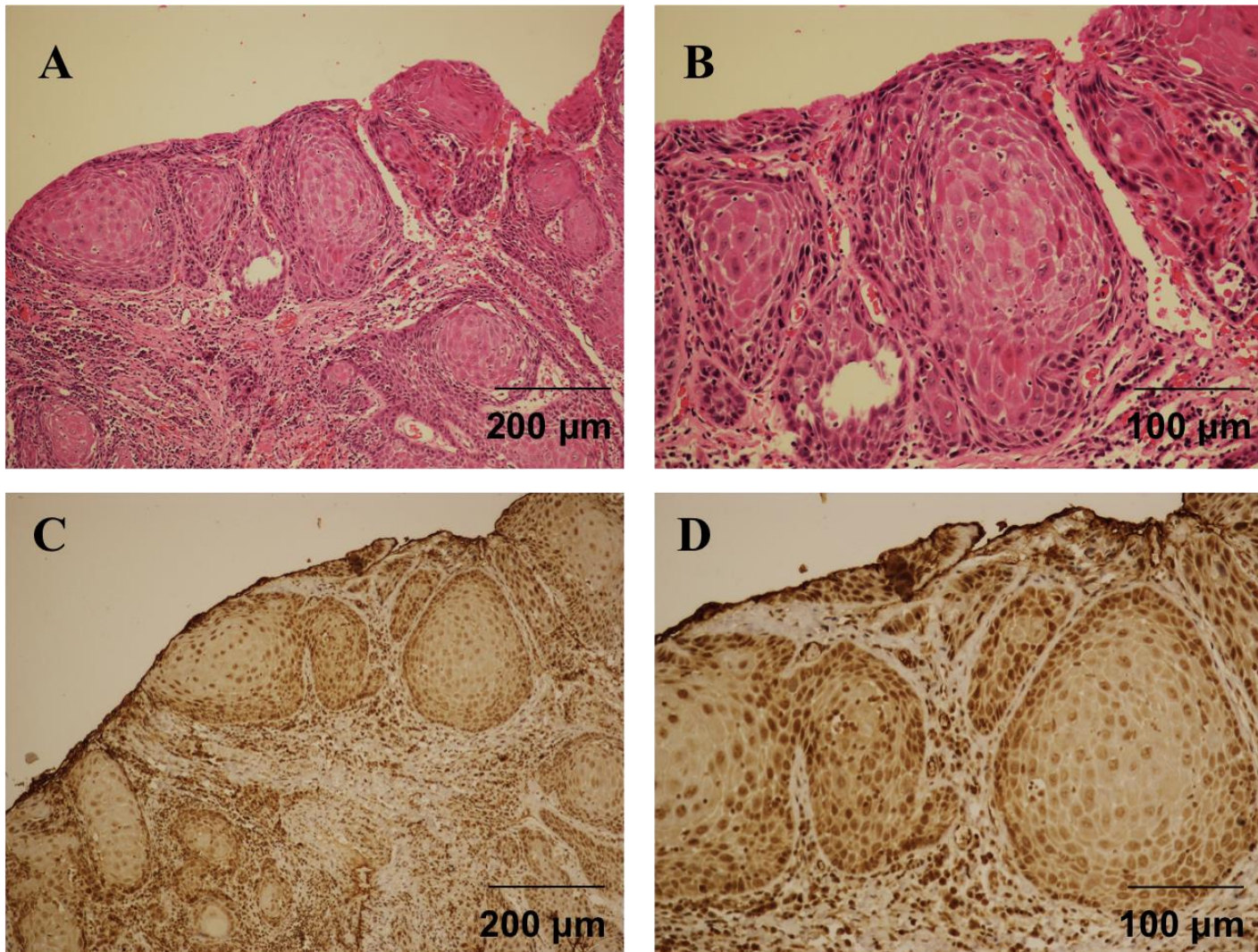
Fonte: Autor

Figura 7. Fotomicrografias de amostra de hiperplasia gengival inflamatória (controle negativo), em coloração H&E (A – 100X; B – 200X) e imuno-histoquímica para HBD3 (C – 100X; D – 200X).



Fonte: Autor

Figura 8. Fotomicrografias de amostra de carcinoma espinocelular oral (controle positivo), em coloração H&E (A – 100X; B – 200X) e imuno-histoquímica para HBD3 (C – 100X; D – 200X).



Fonte: Autor

5 DISCUSSÃO

A HBD3 é amplamente expressa nos tecidos orais, incluindo gengiva, língua, mucosa bucal e labial e folículos dentais, mas não na polpa dentária e apenas com baixa frequência nas glândulas salivares (DUNSCHE et al., 2002). Estudos em culturas de células primárias demonstraram que os queratinócitos orais, mas não os fibroblastos, contêm transcrições para HBD3, sugerindo que, a expressão de HBD3 é provavelmente restrita ao compartimento epitelial da cavidade oral. Os níveis de expressão gênica dos mRNAs de HBD1, -2 e 3 variam consideravelmente de um indivíduo para outro (SAITOH et al., 2004). No presente estudo, demonstrou-se a expressão da HBD3 em tecido gengival hiperplásico (controle negativo), em lesões de leucoplasia oral com diferentes graus de displasia epitelial e em carcinoma espinocelular (controle positivo), comprovando-se dessa forma, a presença da enzima nos tecidos orais e seus diferentes padrões de expressão.

Joly et al. (2005) demonstraram recentemente que, além de uma expressão basal variável do mRNA das beta-defensinas entre os indivíduos, o potencial de indução de mRNA de uma dada beta-defensina também pode variar entre um indivíduo e outro, mas correlaciona-se com sua expressão basal. Essa observação sugere que a saúde nas superfícies mucosas mantém-se melhor em indivíduos que apresentam altos níveis basais de expressão das defensinas, pois estes são os indivíduos que também terão maior capacidade de produzir maior quantidade desses peptídeos na presença de mediadores inflamatórios. No presente estudo, a variação da expressão da HBD3 pôde ser demonstrada nos diferentes graus de displasia epitelial nas leucoplasias orais, não se observando diferença de expressão entre os indivíduos da amostra.

De acordo com o estudo de Joly et al. (2009), as beta-defensinas estão envolvidas na manutenção da homeostasia da cavidade oral. Os resultados dos seus estudos evidenciaram que a expressão e regulação das HBD1, HBD2 e HBD3 apresentam-se alteradas no câncer. Comparando-se com linhagens de células normais, demonstraram que a expressão do mRNA basal estava significativamente reduzida no carcinoma oral de células escamosas para duas das três beta-defensinas estudadas e que a quantidade produzida em resposta à estimulação por mediadores foi mínima para as três beta-defensinas nas linhagens de células de carcinoma oral de células escamosas (JOLY et al., 2009). Também, a expressão diminuída da HBD2 em células do câncer oral já foram relatadas in vivo (ABIKO et al, 2001), ao passo que outros estudos demonstraram níveis elevados de HBD2 no carcinoma oral de células escamosas (SAWAKI et al., 2002). Os resultados do estudo de Joly et al. (2009) sugerem que essa aparente contradição pode ser explicada pelos níveis de inflamação apresentados nos espécimes. Apesar do decréscimo

na frequência e amplitude da indução das beta-defensinas no carcinoma oral de células escamosas, sobre estimulação com IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , aumentos significativos na expressão do mRNA das beta-defensinas foram observados em algumas linhagens de células carcinomas orais de células escamosas em relação ao controle. Isso sugere que a inflamação, o que não é incomum no carcinoma (BALKWILL E MANTOVANI, 2001), poderia restaurar os níveis de expressão das beta-defensinas para aqueles observados como níveis basais saudáveis em alguns casos.

Então, Joly et al. (2009), sugeriram a hipótese de que a expressão diminuída observada em linhagens de células do carcinoma oral de células escamosas poderia resultar de polimorfismos na região promotora, porque polimorfismos genéticos nos fatores de transcrição podem resultar em expressão diminuída. No entanto, o perfil de expressão das HBDs apresenta-se alterado nas lesões com displasia moderada e no carcinoma *in situ*. Nestes casos, a expressão de HBD-1 e 2 apresenta-se reduzida, enquanto a expressão de HBD3 apresenta 2 padrões de resposta: além do aumento da expressão desta enzima, ocorre também uma alteração espacial na distribuição da mesma nos diferentes estratos do tecido epitelial, estando de acordo, dessa forma, com os resultados obtidos nesse estudo referentes à expressão da HBD3 em leucoplasias orais com diferentes graus de displasia.

Esta alteração no padrão de expressão também parece ocorrer em lesões potencialmente malignas da cavidade oral e, desta forma, poderia ser utilizada como marcador fenotípico no diagnóstico precoce destas lesões, auxiliando na identificação de lesões com maior potencial de transformação maligna.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente estudo, o qual avaliou a expressão de HBD3 em amostras de leucoplasia oral por meio de imuno-histoquímica. Foi observada correlação positiva entre a extensão da expressão da enzima e a presença de displasia tecidual, o que indica que a alteração da expressão de HBD3 tem papel fundamental no processo de carcinogênese da cavidade oral (LU et al., 2005), assim como tem um papel importante como ferramenta diagnóstica para tais lesões.

A análise das amostras revelou que 43% das amostras que apresentaram imunomarcagem positiva para as camadas espinhosa e granulosa apresentavam displasia celular moderada ou severa. Das amostras que apresentavam displasia leve, 25% apresentavam imunomarcagem positiva apenas nas camadas basal e para-basal. No estudo de Nishimura et al. (2003), os casos de leucoplasia demonstraram reações positivas para HBD-3, variando em intensidade e extensão, com forte marcação na camada granular, o que pode indicar que sua expressão também está envolvida na diferenciação dos queratinócitos.

No presente estudo, a amostra selecionada como controle negativo, que foi de hiperplasia gengival, apresentou imunomarcção para HBD3 apenas na camada basal, como no estudo de Bissel et al. (2003), que utilizou amostras de tecido gengival descartadas de procedimentos periodontais. Como controle positivo, a amostra selecionada de carcinoma espinocelular apresentou imunomarcção positiva e intensa para todas as camadas do epitélio, com marcção difusa para as ilhas de tecido epitelial que invadiram o tecido conjuntivo como no estudo de Kawsar et al. (2008), que detectou nas lesões diagnosticadas como carcinoma *in situ* a expressão desta enzima ao longo de todo o sítio da lesão.

A significativa super-expressão da beta-defensina e no carcinoma oral de células escamosas foi também demonstrada no estudo de Kesting et al. (2009), quando comparou a amostras de mucosa saudável através de qRT-PCR, o que sugere importante papel da HBD3 na oncogênese oral, potencialmente em uma função mediadora.

Desta forma, a super-expressão de HBD3 nas amostras de lesões potencialmente malignas, como a leucoplasia oral, pode indicar de forma precoce a presença de células morfológica e fenotipicamente alteradas, caracterizadas como células displásicas, cuja proliferação está relacionada ao processo de crescimento tumoral (KAWSAR et al., 2008).

Esta correlação positiva, portanto, ressalta a viabilidade da utilização deste marcador fenotípico, a expressão de HBDs, nas amostras de leucoplasia, como ferramenta diagnóstica e de prognóstico da evolução destas lesões na cavidade oral.

6 CONCLUSÕES

Com base nas informações obtidas nesse estudo conclui-se que:

- A expressão da beta-defensina 3 apresenta-se alterada nas lesões leucoplásicas;
- A expressão da beta-defensina 3 apresenta-se mais intensa em lesões leucoplásicas com graus de displasia epitelial moderada e severa;
- A severidade da displasia tecidual, conforme a graduação realizada neste estudo, está diretamente relacionada à imunomarcação pela beta-defensina 3 nas lesões de leucoplasia oral.

REFERÊNCIAS

ABIKO Y., MITAMURA J., NISHIMURA M., MURAMATSU T., INOUE T., SHIMONO M., KAKU T. Pattern of expression of beta-defensins in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v. 143, n. 1, p. 37-43, 1999.

ABIKO Y., SURAWEERA A.K., NISHIMURA M. et al. Differential expression of human beta defensin 2 in keratinized and non-keratinized oral epithelial lesions; immunohistochemistry and *in situ* hybridization. **Virchows Arch.**, v. 438, p. 248–253, 2001.

AWADALLAH, M.; IDLE, M.; PATEL, K.; KADEMANI D. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, p. 1-31, 2018.

AXÉLL, T.; PINDBORG, J. J.; SMITH, C. J.; VAN DER WAAL, I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco- related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21, 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 25, n. 2, p. 49-54, 1996.

BAILLIE, S., et al. Queries and responses from the Medical Committee of the Society for Investigating the Nature and Cure of Cancer. Edinburgh, **Med. Surg. J.**, v. 2, p. 382- 389, 1806.

BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, p. 539–545, 2001.

BARNES L, EVESON JW, REICHART P, SIDRANSKY D, EDITORS. World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**, 3th ed, Lyon: IARC Press, p. 283–328, 2005.

BATONI, G.; MAISETTA, G.; ESIN, S.; CAMPA, M. Human beta-defensin-3: A promising antimicrobial peptide. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 6, p.1063-1073, 2006.

BHAGAWATI, S. B.; BHAGAWATI, B. T.; MITTAL, S. Role of Defensins in Oral Diseases: An Overview. **J. Ind. Acad. Oral Med. Radiol.**, v. 24, n. 2, p. 142-145, 2012.

BIRAGYN, A.; SURENHU, M.; YANG, D.; RUFFINI, P. A.; HAINES, B.A.; KLYUSHNENKOVA, E.; OPPENHEIM J. J.; KWAK L. W. Mediators of Innate Immunity That Target Immature, But Not Mature, Dendritic Cells Induce Antitumor Immunity When Genetically Fused with Nonimmunogenic Tumor Antigens. **J. Immunol.**, v. 167. n. 11, p. 6644–6653, 2001

BOUQUOT, J. E.; GNEPP, D. R. Laryngeal precancer – a review of literature, commentary and comparison with oral leukoplakia. **Head Neck**, v. 13, p. 488-497, 1991.

BOY, S.C. Leukoplakia and erythroplakia of the oral mucosa- a brief overview. **SADJ.**, v. 67, p. 558-560, 2012.

BROUNS, E.; BAART, J.; KARAGOZOGLU, K. H.; AARTMAN, I. H., BLOEMENA, E.; VAN DER WAAL, I. Malignant transformation of oral leukoplakia in a well-defined cohort of 144 patients. **Oral Dis.**, v. 20, p. 19-24, 2014.

CHOONG N. W.; COHEN E. E. Epidermal growth factor receptor directed therapy in head and neck cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 57, n. 1, p. 25-43, 2006.

DIAMOND G, BEVIN C. Beta-defensins: Endogenous antibiotics of the innate host defense response. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, p. 221-225, 1998.

DILHARI, A.; WEERASEKERA, M. M.; SIRIWARDHANA, A., MAHESHIKA, O.; GUNASEKARA, C.; KARUNATHILAKA, S.; NAGAHAWATTE, A.; FERNANDO, N. Candida infection in oral leukoplakia: an unperceived public health problem. **Acta Odontol. Scand.**, v. 74, n. 7, p. 565-569, 2016.

DIZ, P.; GORSKY, M.; JOHNSON, N. W.; KRAGELUND, C.; MANFREDI, M.; ODELL, E.; THONGPRASOM, K.; WARNAKULASURIYA, S.; BAGAN, J. V.; VAN DER WAAL, I. Oral leukoplakia and erythroplakia: a protocol for diagnosis and management. **EAOM**, 2011.

DOST, F.; LÉ CAO, K.; FORD, P. J.; ADES, C.; FARAH, C. S. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: a real-world evaluation of histopathologic grading. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 117, p. 343-352, 2014.

DUNSCHE, A.; ACIL, Y.; SIEBERT, R.; HARDER, J.; SCHRODER, J.; JEPSEN, S. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 30, p. 154–158, 2001.

DUNSCHE, A. A. Y.; DOMMISCH, H.; SIEBERT, R.; SCHRÖDER, J. M. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 110, p. 121–124, 2002.

FENG, Z.; DUBYAK, G. R.; LEDERMAN, M. M.; ANDWEINBERG, A. Cutting edge: human beta defensin 3 – a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. **J. Immunol.**, v. 177, 782–786, 2006.

FISCHER, D.J.; EPSTEIN, J. B.; MORTON, T. H.; SCHWARTZ, S. M. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 33, p. 65-70, 2004.

FLESKENS, S. A.; BERGSHOEFF, V. E.; VOOGD, A. C.; VAN VELTHUYSERI, M. L.; BOL, F. J.; SPEEL, E. J., et al. Interobserver variability of laryngeal mucosal premalignant lesions: a histopathological evaluation. **Mod. Pathol.**, v. 24, p. 892-898, 2011.

FRYE, M.; BARGON, J.; LEMBCKE, B.; WAGNER, T.; GROPP, R. Differential expression of human alpha- and beta-defensins mRNA in gastrointestinal epithelia. **Eur. J. Clin. Invest.**, n. 30, p. 695–701, 2000.

FUNDERBURG N.; LEDERMAN M. M.; FENG Z.; DRAGE M. G.; JADLOWSKY J.; HARDING C. V.; WEINBERG A.; SIEG S. F. Human-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, n. 47, p. 18631–18635, 2007.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. **J. Oral Pathol. Med.**, V. 39, n. 1, p. 1-9, 2010.

- GREIN CAVALCANTI, L.; LYKO, K. F.; ARAÚJO, R. L.; AMENÁBAR, J. M.; BONFIM, C.; TORRES-PEREIRA, C. C. Oral leukoplakia in patients with Fanconi anaemia without hematopoietic stem cell transplantation. **Pediatr. Blood. Cancer**, v. 62, p. 1024-1026, 2015.
- HANADA T.; NAKAGAWA M.; EMOTO A.; NOMURA T.; NASU N.; NOMURA Y. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. **Int. J. Urol.** V. 7, n. 7, p. 263-269, 2000.
- HANDLEY, T. P.; MCCAUL, J. A.; OGDEN, G.R. Dyskeratosis congenita. **Oral Oncol.**, v. 42, p. 331-336, 2006.
- HARDER, J.; BARTELS, J.; CHRISTOPHERS, E.; SCHRODER, J.M. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 5707–5713, 2001.
- HOLMSTRUP, P.; VEDTOFTE, P.; REIBEL, J.; STOLTZE, K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncol.**, v. 42, p. 461-474, 2006.
- HOWELL, K.; DE LEEUW, E. Cell adhesion properties of human defensins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** p. 1-5, 2018.
- JIN, G.; KAWSAR, H. I.; HIRSCH, S. A.; ZENG, C.; JIA, X., FENG, Z.; GHOSH S. K.; ZHENG Q. Y.; ZHOU A.; MCINTYRE T. M.; WEINBERG A. An antimicrobial peptide regulates tumor-associated macrophage trafficking via the chemokine receptor CCR2, a model for tumorigenesis. **PLoS One.**, v. 5, n. 6, 2010.
- JOLY, S.; ORGAN, C. C.; JOHNSON, G. K.; MCCRAY, P. B. JR.; GUTHMILLER, J. M. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. **Mol Immunol.**, v. 42, n. 9, p. 1073-1084, 2005.
- JOLY S., COMPTON L. M.; PUJOL C.; KURAGO Z. B.; GUTHMILLER J. M. Loss of human beta-defensin 1, 2, and 3 expression in oral squamous cell carcinoma. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 24, p. 353–360, 2009.
- KAWSAR H. I.; WEINBERG A.; HIRSCH S. A.; VENIZELOS A.; HOWELL S.; JIANG B.; JIN G. Overexpression of human beta-defensin-3 in oral dysplasia: potential role in macrophage trafficking. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 8, p. 696-702, 2009.
- KESTING M. R.; LOEFFELBEIN D. J.; HASLER R.J.; WOLFF K. D.; RITTIG A.; SCHULTE M.; HIRSCH T.; WAGENPFEIL S.; JACOBSEN F.; STEINSTRAEßER L. Expression profile of human beta-defensin 3 in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Invest.**, v. 27, n. 5, p. 575–581, 2009.
- KIATSURAYANON, C.; NIYONSABA, F.; SMITHRITHEE, R.; AKIYAMA, T.; USHIO, H.; HARA, M.; OKUMURA, K.; IKEDA, S.; OGAWA, H. Host defense (Antimicrobial) peptide, human β -defensin-3, improves the function of the epithelial tight-junction barrier in human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 134, n. 8, p. 2163-2173, 2014.
- KRISANAPRAKORNKIT, S.; WEINBERG, A.; PEREZ, C.; DALE, B. Expression of the peptide antibiotic human beta defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4222–4228, 1998.

KURIBAYASHI, Y.; TSUSHIMA, F.; MERITA, K.; MATSUMOTO, K.; SAKURAI, J.; UESUGI, A., et al. Long-term outcome of non-surgical treatment in patients with oral leukoplakia. **Oral Oncol.**, v. 51, p. 1020-1025, 2015.

LEE, J.J.; HONG, W.K.; HITTELMAN, W.N.; MAO, L.; LOTAN, R.; SHIN, D.M.; BENNER, S.E.; XU, X.C.; LEE, J.S.; PAPADIMITRAKOPOULOU, V.M.; GEYER, C.; PEREZ, C.; MARTIN, J.W.; EL-NAGGAR, A.K.; LIPPMAN, S.M. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. **Clin. Cancer**, v. 6, p. 1702–1710, 2000.

LIU S. Y.; CHANG L. C.; PAN L. F.; HUNG Y. J.; LEE C. H.; SHIEH Y. S. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 44, n. 3, p. 277-285, 2008.

LU Q.; SAMARANAYAKE L. P.; DARVEAU R. P.; JIN L. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. **J. Periodontal Res.**, v. 40, n. 6, p. 474–481, 2005.

MACDONALD, D. G.; RENNIE, J. S. Oral epithelial atypia in denture induced hyperplasia, lichen planus and squamous cell papilloma. **J. Oral Surg.**, v. 4, p. 40-45, 1975.

MANCHANDA, A.; SHETTY, D. C. Reproducibility of grading systems in oral epithelial dysplasia **Med. Oral. Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 17, n. 6, p. 935-942, 2012.

MANNE, R. K. Oral potential malignant disorder/individuals. **Oral Oncol.**, v. 49, p. 39- 40, 2014.

MATHEWS, M.; JIA, H.; GUTHMILLER, J., et al. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 2740–2745, 1999.

MCCORD, C.; XU, J.; XU, W.; QIU, X.; MCCOMB, R. J.; PEREZ-ORDONEZ, B. Association of high-risk human papillomavirus infection with oral epithelial dysplasia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 115, p. 541-549, 2013.

MELLO, F. W.; MIGUEL, A. F. P.; DUTRA, K. L.; PORPORATTI, A. L.; WARNAKULASURIYA, S.; GUERRA, E. N. S.; RIVERO, E. R. C. Prevalence of oral potentially malignant disorders: a systematic review and meta-analysis. **J. Oral Pathol. Med.**, p. 1-71, 2018.

MEHANNA, H. M.; RATTAY, T.; SMITH, J.; MCCONKEY, C. C. Treatment and follow-up of oral dysplasia - a systematic review and meta-analysis. **Head Neck.**, v. 31, p.1600-1609, 2009.

MIZUKAWA, N.; SUGIYAMA, K.; YAMACHIKA, E. UENO, T.; MISHIMA, K.; TAKAGI, S. Presence of defensin in epithelial Langerhans cells adjacent to oral carcinomas and precancerous lesions. **Anticancer Res.**, v. 19, p. 2969-2971, 1999.

MIZUKAWA, N.; SUGIYAMA, K.; UENO, T.; MISHIMA, K.; TAKAGI, S.; SUGAHARA T. Defensin-1, an antimicrobial peptide present in the saliva of patients with oral diseases. **Oral Dis.**, n. 5, p. 139–142, 1999.

MIZUKAWA, N.; SAWAKI, K.; YAMACHIKA, E., et al. Presence of human beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 2005–2007, 2000

NAGAO, T.; WARNAKULASURIYA, S.; HASEGAWA, S., et al. Elucidating risk factors for oral leukoplakia affecting gingivae in Japanese subjects. **Trans. Res. Oral Oncol.**, v. 1-11, 2016.

NAPIER, S. S.; SPEIGHT, P. M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 1, p. 1-10, 2008.

NISHIMURA, M.; ABIKO, Y.; KUSANO, K.; YAMAZAKI, M.; SAITOH, M.; IZOGUCHI, I.; JINBU, Y.; NOGUCHI, T.; KAKU, T. Localization of human beta-defensin 3 mRNA in normal oral epithelium, leukoplakia, and lichen planus: an *in situ* hybridization study. **Med. Electron. Microsc.**, v. 36, p. 94-97, 2003.

PAGET, J. Cancer following ichthyosis of the tongue. **Trans. Clin. Soc. Lond.**, v. 3, p. 88- 90, 1870.

PAZGIER M.; HOOVERB D. M.; YANGC D.; LUD W.; LUBKOWSKIA J. Human β -defensins **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 1294-1313, 2006.

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

PINDBORG, J. J.; REICHART, P. A.; SMITH, C. J.; VAN DER WALL, I. **WHO, In Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa**, 2nd ed, Springer-Verlag: Berlin, p. 21-31, 1997.

PRABHU, R. S.; WILSON, D. F.; DAFTARI, D. K.; JOHNSON, N. W. Oral diseases in tropics. **Oxford: Oxford Medical.**, p. 402, 1992.

QUINONES-MATEU, M. E.; LEDERMAN, M. M.; FENG, Z.; CHAKRABORTY, B.; WEBER, J.; RANGEL, H. R.; MAROTTA M. L.; MIRZA M.; JIANG B.; KISER P.; MEDVIK K.; SIEG S. F.; WEINBERG A. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. **AIDS**, v. 17, n. 16, p. 39-48, 2003.

REIBEL, J.; GALE, N.; HILLE, J. In: EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C.; GRANDIS, J. R.; TAKATA, T.; SLOOTWEG, P. J. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. **WHO classification of tumours of the head and neck**. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017

ROHRL, J.; YANG, D.; OPPENHEIM, J. J.; HEHLGANS, T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. **J. Immunol.**, v. 184, p. 6688-6694, 2010.

SAITOH, M.; ABIKO, Y.; SHIMABUKURO, S.; KUSANO, K.; NISHIMURA, M.; ARAKAWA, T.; NAKASHIMA, K.; TAKUMA, T.; KAKU, T.; IGARASHI, S. Correlated expression of human beta defensin-1, -2 and -3 mRNAs in gingival tissues of young children. **Arch Oral Biol.**, v. 49, n. 10, p. 799-803, 2004.

SARODE, S. C.; SARODE, G. S.; PATIL, A. Criteria to define true second primary oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 46, p. 834, 2010.

SARODE, S. C.; SARODE, G. S.; KARMARKAR, S.; TUPKARI, J. V.; Oral (mucosal) potentially malignant disorders. **Oral Oncol.**, v. 48, p. 36-36, 2012.

SARODE, S. C.; SARODE, G. S.; KARMARKAR, S. Early detection of oral cancer: detector lies within. **Oral Oncol.**, v. 48, p. 193- 194, 2012.

SARODE, S. C.; SARODE, G. S.; TUPKARI, J. V. Oral potentially malignant disorders: A proposal for terminology and definition with review of literature **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v. 18, n. 1, 2014

SAWAKI, K.; MIZUKAWA, N.; YAMAIAI, T.; YOSHIMOTO, T.; NAKANO, M.; SUGAHARA T. High concentration of beta-defensin 2 in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res.**, v. 22, p. 2103–2107, 2002.

SCHRODER, J. M. Epithelial antimicrobial peptides: Innate local host response elements. **Cell Mol. Life. Sci.**, v. 56, p. 32-46, 1999.

SELSTED, M.; HARWIG, S.; GANZ, T.; SCHILLING, J.; LEHRER, R. Primary structures of three human neutrophils defensins. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p.1427-1435, 1985.

SILVERMAN, S. JR.; GORSKY, M.; LAZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. **Cancer**, v. 53, p. 563-568, 1984.

SPEIGHT, P.M.; ABRAM, T. J.; FLORIANO, P. N.; JAMES, R.; VICK, J.; THORNHILL, M. H. Interobserver agreement in dysplasia grading: toward an enhanced gold standard for clinical pathology trials. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 120, p. 474-482, 2015.

SPERANDIO, M.; BROWN, A. L.; LOCK, C.; MARGAN, P. R.; COUPLAND, V. H.; MADDEN, P. B. Predictive value of dysplasia grading and DNA ploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. **Cancer Prev. Res.**, v. 6, p. 822-831, 2013).

TILAKARATNE, W. M.; KLINIKOWSKI, M. F.; SAKU, T.; PETERS, T. J.; WARNAKULASURIYA, S. Oral submucous fibrosis: review on aetiology and pathogenesis. **Oral Oncol.**, v. 42, p. 561-568, 2006.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol.**, v. 45, p. 317-323, 2009.

VÁZQUEZ-ÁLVAREZ, R.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F.; GÁNDARA-VILA, P., et al. Correlation between clinical and pathologic diagnosis in oral leukoplakia in 54 patients. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, v. 15, n. 6, p. 832-838, 2010.

WARNAKULASURIYA, S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. **J. Pathol.**, v. 194, p. 294–297, 2001.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER, WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 36, p. 575- 580, 2007.

WARNAKULASURIYA, S.; REIBEL, J.; BOUQUOT, J.; DABELSTEEN, E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 37, n. 3, p. 127-133, 2008.

WARNAKULASURIYA, S.; KOVACEVIC, T.; MADDEN, P.; COUPLAND, V. H.; SPERANDIO, M.; ODELL, E.; MOLLER, H. Factors predicting malignant transformation in oral potentially malignant disorders among patients accrued over a 10-year period in South East England. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 40, p. 677–683, 2011.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDENA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia – A systematic review. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 45, n. 3, p. 155-166, 2016.

WARNAKULASURIYA, S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders, **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, p. 1-32, 2018.

WEINBERG, A.; KRISANAPRAKORNKIT, S.; DALE, B. A. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 9, n. 4, p. 399-414, 1998.

WEINBERG A.; JIN G.; SIEG S.; MCCORMICK T. S. The yin and yang of human Beta-defensins in health and disease. **Front. Immunol.**, v. 3, n. 294, p. 1-9, 2012.

WENGHOEFER, M.; PANTELIS, A.; DOMMISCH, H.; REICH, R.; MARTINI, M.; ALLAM, J.P. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 37, p. 660-63, 2008.

WOO, S. B.; CASHMAN, E. C.; LERMAN, M. A. Human papillomavirus-associated oral intraepithelial neoplasia. **Mod. Pathol.**, v. 26, p. 1288-1297, 2013.

YIN, L.; CHINO, T.; HORST, O. V.; HACKER, B. M.; CLARK, E. A. DALE, B. A.; CHUNG W. O. Differential and coordinated expression of defensins and cytokines by gingival epithelial cells and dendritic cells in response to oral bacteria. **BMC Immunol.**, v. 11, n. 37, p. 1-14, 2010.

ZHAO, C.; WANG, I.; LEHRER, R. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. **FEBS Lett.**, v. 396, p. 319–322, 1996.