



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CAMILA BATISTA DANIEL

**ESTUDO DO MICROAMBIENTE TUMORAL EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL E OROFARÍNGEO E SUA IMPLICAÇÃO
PROGNÓSTICA**

VITÓRIA, ES

2020

CAMILA BATISTA DANIEL

**ESTUDO DO MICROAMBIENTE TUMORAL EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL E OROFARÍNGEO E SUA IMPLICAÇÃO
PROGNÓSTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Ventorin von Zeidler

VITÓRIA, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

D184e Daniel, Camila Batista, 1994-
Estudo do microambiente tumoral em carcinoma
epidermoide oral e orofaríngeo e sua implicação prognóstica /
Camila Batista Daniel. - 2020.
99 f. : il.

Orientadora: Sandra Ventorin von Zeidler.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Câncer de boca. 2. Marcadores biológicos de tumor. 3.
Leucócitos. I. Ventorin von Zeidler, Sandra. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III.
Título.

CDU: 61

CAMILA BATISTA DANIEL

**ESTUDO DO MICROAMBIENTE TUMORAL EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL E OROFARÍNGEO E SUA IMPLICAÇÃO
PROGNÓSTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 12 de fevereiro de 2020

Prof^a. Dr^a. Sandra Lúcia Ventrin von
Zeidler

Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Daniel Claudio de Oliveira Gomes
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador interno

Prof^a. Dr^a Tarcília Aparecida da Silva
Universidade Federal de Minas Gerais
Examinador externo

VITÓRIA, ES

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler, por ter me dado a oportunidade de ingressar nesta equipe tão especial e ter confiado em mim para execução desta pesquisa. Obrigada pelo incentivo, dedicação e ensinamentos dados ao longo destes anos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) por fomentar e viabilizar a execução deste trabalho.

Ao Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes por ter proporcionado espaço físico para as entrevistas e coleta de amostras dos pacientes, o que permitiu o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Hospital Santa Rita de Cássia por toda a colaboração, por ceder espaço físico, profissionais capacitados, acessos aos prontuários e pela motivação na busca de resultados científicos que irão contribuir para melhor qualidade de vida dos pacientes com câncer.

Ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes e do Hospital Santa Rita de Cássia, em especial ao Dr. José Roberto Vasconcelos de Podestá, por permitirem o acompanhamento às consultas dos pacientes e por todo aprendizado.

Ao professor Hisham Mehanna, *diretor do Institute of Head and Neck Studies and Education da University of Birmingham*, Reino Unido, pela colaboração, e à *University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust*, por permitir o acesso às amostras biológicas.

Ao professor Daniel Claudio de Oliveira Gomes pela parceria e disponibilidade para os experimentos de imunofluorescência.

Ao professor Breno Salgado de Souza pelas contribuições e parceria.

Às técnicas Viviane Coutinho Meneguzzi, Tarcio e Lucienne, do Laboratório Multiusuário de Histotécnicas da Ufes e ao técnico Mário Armando Dantas do Laboratório de Histologia Molecular e Imuno-histoquímica (LHMI). Obrigada por todo o auxílio nos experimentos e por todo conhecimento transmitido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados avós Elmerinda (*in memoriam*) e José Batista. Vocês despertaram em mim a paixão pelo conhecimento e o amor pela ciência, e o mais importante: acreditaram em mim! Devo tudo a vocês.

Agradeço ao meu pai, Elias, minha mãe, Elizabeth e minha irmã Maria Eduarda por sempre estarem ao meu lado na minha jornada. Obrigada pelo carinho, incentivo e pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente.

Ao Michel pela paciência, encorajamento, incentivo, compreensão e colaboração. Seu apoio foi fundamental nesta jornada e nas outras que a antecederam.

A toda equipe do Laboratório de Patologia Molecular da Ufes: Anna Clara, Daliane, Gabi, Regina, Priscila, Jéssica, Paola, Thabata, Pâmela, Wilene, Isabella, Brenda, Roberta e Steeven. Agradeço imensamente por me abraçarem e me acolherem e dividirem comigo o conhecimento, a companhia e a amizade. Vocês foram minha família durante esses dois anos. Agradeço principalmente à Priscila, pela paciência e disponibilidade em me ensinar minuciosamente a técnica de imuno-histoquímica, à Thabata, pela ajuda nas análises histopatológicas e à Jéssica pelo companheirismo e amizade.

Ao Deyverton por toda ajuda nos cortes de tecido e análises imuno-histoquímicas. Obrigada pela colaboração, amizade e dedicação para com este trabalho.

Ao Renan Garcia pelas contribuições teóricas e pela paciência e disponibilidade nas análises de imunofluorescência.

Aos meus amigos de república Ana Paula, Arthur e Wagner. Obrigada por me acolherem com tanto carinho, por me ouvirem, incentivarem e torcerem por mim.

Ao meu grande amigo Magno por todo apoio e incentivo e por compartilhar comigo o amor pela ciência.

Aos pacientes que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa, respondendo aos questionários e compartilhando das suas histórias de vida com os pesquisadores.

Meus sinceros agradecimentos a todos!

RESUMO

DANIEL, C.B. **Estudo do microambiente tumoral em carcinoma epidermoide oral e orofaríngeo e sua implicação prognóstica**. 2020. 99f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

As células inflamatórias podem auxiliar processos importantes da carcinogênese, tais como angiogênese, invasão e metástase. Tem sido demonstrado que a inflamação sistêmica, bem como a presença do infiltrado inflamatório no tumor afeta negativamente o desfecho clínico. Nesse sentido, o valor prognóstico de marcadores inflamatórios tem sido explorado em diversos tipos de câncer. Neste estudo, investigamos o potencial biomarcador da relação neutrófilo-linfócito (RNL) pré-tratamento no sangue periférico, da expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias e de neutrófilos e linfócitos associados ao tumor em carcinoma epidermoide oral e orofaríngeo (CEOO). Realizou-se um estudo retrospectivo multicêntrico internacional com amostras biológicas, dados clínicos e de seguimento de 199 indivíduos com CEOO do Brasil e Reino Unido. Lâminas histológicas foram avaliadas quanto ao padrão de invasão, infiltrado linfocitário tumoral (TIL) e presença de invasão vascular, linfática e perineural. Tecidos tumorais parafinizados foram submetidos à reação imuno-histoquímica para identificação de neutrófilos associados ao tumor (TAN) e para avaliação da expressão de PD-L1. Para determinar a RNL, contagens absolutas de neutrófilos e linfócitos foram obtidas de hemogramas realizados no período anterior ao tratamento. TAN e RNL foram dicotomizados de acordo com o ponto de corte, estabelecido por meio de uma curva ROC. TIL foi classificado em baixo, moderado e alto e a expressão de PD-L1 foi avaliada pelo método *Combined Positive Score* (CPS). Nossos resultados mostraram que neutrófilos peritumorais foram associados à menor sobrevida livre de doença. Baixo TIL e RNL aumentada foram associados a maior tamanho tumoral e doença avançada. A RNL aumentada também foi associada ao hábito de tabagismo e etilismo. A expressão de PD-L1 não mostrou associação significativa com as características clínico-patológicas e indicadores de prognósticos analisados. O microambiente inflamado, caracterizado pela elevada expressão de PD-L1, baixo TIL e alto TAN, foi associado à pior sobrevida global. Nossas investigações indicam que a inflamação sistêmica e o microambiente tumoral inflamado podem ser considerados como

biomarcadores de prognóstico em CEOO, no entanto, em nosso grupo amostral o aumento da RNL não se relacionou ao aumento da infiltração de neutrófilos e ao microambiente tumoral inflamado.

Palavras-chave: Câncer de boca. Infiltrado inflamatório tumoral. Relação neutrófilo-linfócito. PD-L1. CPS.

ABSTRACT

DANIEL, C.B. **Study of the tumour microenvironment in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and its prognostic implications.** 2020. 99f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Inflammatory cells can assist important processes of carcinogenesis, such as angiogenesis, invasion and metastasis. It has been shown that systemic inflammation, as well as the presence of tumour-infiltrating inflammation cells, negatively affects the clinical outcome. In this sense, the prognostic value of inflammatory markers has been explored in several types of cancer. In this study, we investigated the potential biomarker of the pre-treatment neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) in peripheral blood, PD-L1 expression in tumour and inflammatory cells and tumour-associated neutrophils and lymphocytes in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC). An international multicenter retrospective study was conducted with biological samples, clinical and follow-up data from 199 individuals with OSCC from Brazil and United Kingdom. Histological slides were evaluated for invasion pattern, Tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) and presence of vascular, lymphatic and perineural invasion. Paraffinized tumour tissues were subjected to immunohistochemical reaction to identify tumour-associated neutrophils (TAN) and to evaluate PD-L1 expression. To determine NLR, absolute neutrophil and lymphocyte counts were obtained from blood counts performed in the period prior to treatment. TAN and NLR were dichotomized according to the cutoff, established by means of a ROC curve. TIL was classified as low, moderate and high and the PD-L1 expression was assessed using the Combined Positive Score (CPS) method. Our results showed that peritumoral neutrophils were associated with worse disease-free survival. Low TIL and increased NLR were associated with larger tumor size and advanced disease. Increased NLR was also associated with smoking and drinking. PD-L1 expression did not show a significant association with the clinical-pathological characteristics and prognostic indicators analysed. The inflamed tumor microenvironment, characterized by the high expression of PD-L1, low TIL and high TAN, was associated with worse overall survival. Our investigations indicate that systemic inflammation and the inflamed tumour microenvironment can be considered as prognostic biomarkers in OSCC, however, in

our sample group, the increase in NRL was not related to the increase in neutrophil infiltration and the inflamed tumor microenvironment.

Keywords: Oral cancer. Tumour-infiltrating inflammation. Neutrophil-lymphocyte ratio. PD-L1. CPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Principais citocinas produzidas pelos neutrófilo.	27
Figura 2- Sinalização PD-1/PD-L1.....	36
Figura 3 - Classificação do padrão de invasão segundo Bryne e cols (1992). Padrão I: Compressivo e bordas infiltrantes bem delineadas. Padrão II: Infiltrante com cordões sólidos. Padrão III: Pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes. Padrão IV: Marcante dissociação em grupos pequenos ou células individualizadas. Fonte: adaptado de Heerema e colaboradores	40
Figura 4 - Fotomicrografias de carcinoma epidermoide oral representando os padrões de invasão segundo Bryne e colaboradores (1992).Em (A) padrão de invasão tipo I; (B) padrão de invasão tipo II; (C) padrão de invasão tipo III; (D) padrão de invasão tipo IV. Coloração HE. Magnificação original: 40X e 100x.	48
Figura 5 - Fotomicrografias de carcinoma epidermoide oral representativas de invasão vascular (A, B); linfática (C, D) e perineural (E, F). Coloração HE. Magnificação original: 10x e 20x.	49
Figura 6 - Curva ROC para RNL em pacientes com CEOO. Ponto de corte: >1,85; sensibilidade: 83,52%; especificidade: 50,0%. Índice de Youden J: 0,335. AUC (área sob a curva): 0,705.....	50
Figura 7 - Neutrófilos associados ao tumor. (A e B) Marcação imuno-histoquímica de neutrófilos intratumorais (setas pretas) e peritumorais (setas vermelhas); (C) controle negativo tonsila: as setas pretas indicam neutrófilos não marcados; (D) controle positivo tonsila: as setas pretas indicam neutrófilos marcados. (E) Neutrófilos intratumorais (setas brancas) e peritumorais (setas vermelhas) marcados por imunofluorescência. Magnificações originais: 200x (A e E) e 400x (B, C e D).....	53
Figura 8 - Comparação das médias dos neutrófilos nos compartimentos intra e peritumoral. Teste T independente ($p=0,396$).	54
Figura 9 - Curva ROC para neutrófilos intratumorais (A) e peritumorais (B) em pacientes com CEOO. Em (A) ponto de corte: >2,2; sensibilidade 100% e especificidade 66,67%. Índice de Youden J: 0,667. AUC (área sob a curva): 0,813. Em (B) ponto de corte: >3,5; sensibilidade 100% e especificidade 71,11%. Índice de Youden J: 0,711. AUC (área sob a curva): 0,822.....	55

Figura 10 - Fotomicrografia do infiltrado linfocitário tumoral, classificado segundo Marsh et al., 2011. Em A, B padrão de baixo infiltrado linfocitário tumoral; em C e D, moderado em E e F, alto. Coloração HE. Magnificação original: 10x e 20x.....	58
Figura 11 - Expressão de PD-L1. Marcação imuno-histoquímica de PD-L1 nas células tumorais (setas pretas) em A e células inflamatórias (setas vermelhas) em B; (C) controle negativo tonsila; (D) controle positivo tonsila. (E) Células inflamatórias PD-L1 positivas marcadas por imunofluorescência. Magnificações originais: 200x (C) e 400x (A, B, D e E).	61
Figura 12 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo sítio anatômico (A); metástase linfonodal (B); tamanho do tumor primário (C); estágio clínico (D); etilismo (E) e tabagismo (F). N0: ausência de metástase linfonodal; N+: presença de metástase linfonodal; T: tamanho do tumor primário.	65
Figura 13 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank, segundo RNL, no período de 36 meses.....	66
Figura 14 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo TAN. Em A neutrófilos intratumorais e em B neutrófilos peritumorais.....	67
Figura 15 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação ao TIL.....	67
Figura 16 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias (CPS), em (A) e em função do microambiente tumoral, em (B).....	68
Figura 17 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo sítio anatômico (A); comprometimento linfonodal (B); tamanho do tumor (C); estágio clínico (D); etilismo (E) e tabagismo (F). N0: ausência de metástase linfonodal; N+: presença de metástase linfonodal; T: tamanho do tumor primário.	69
Figura 18 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo RNL.....	70
Figura 19 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo neutrófilos associados ao tumor. Em A neutrófilos intratumorais e em B neutrófilos peritumorais.....	71

Figura 20 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação ao infiltrado linfocitário tumoral (TIL) (A) e expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias (CPS) (B).71

Figura 21 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo características do microambiente tumoral. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos indivíduos com CEOO	47
Tabela 2 - Área sob a curva ROC de RNL para cada fator prognóstico avaliado	50
Tabela 3 - Associações entre RNL e variáveis clínico-patológicas em CEOO (n=118)	51
Tabela 4 - Associação entre RNL e as variáveis histopatológicas analisadas em CEOO (n=118)	52
Tabela 5 - Área sob a curva ROC de TAN para cada fator prognóstico avaliado	54
Tabela 6 - Associação entre TAN e variáveis clínico-patológicas em CEOO (n=50)	56
Tabela 7 - Associação entre TAN e variáveis histopatológicas em CEOO (n=50).....	57
Tabela 8 - Associações entre TIL e variáveis clínico-patológicas em CEOO (n=128)	59
Tabela 9 - Associações entre TIL e variáveis histopatológicas em CEOO (n=128) ..	60
Tabela 10 - Associação entre a expressão de PD-L1 e variáveis clínico-patológicas em CEOO (n=50)	62
Tabela 11 - Associação entre a expressão de PD-L1 e variáveis histopatológicas em CEOO (n=50)	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno (do inglês, <i>antigen-presenting cell</i>)
AUC	Área sob a curva (do inglês, <i>Area under the ROC Curve</i>)
BATF	<i>Basic Leucine Zipper Transcription Factor</i>
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CEOO	Carcinoma epidermoide oral e orofaríngeo
CPS	<i>Combined positive score</i>
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (do inglês, <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>)
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol-dihidrocloreto (do inglês, <i>Fluoroshield Mounting Medium with DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
FGF2	Fator de Crescimento de Fibroblastos-2 (do inglês, <i>Basic fibroblast growth factor</i>)
FMLP-1	Formil peptídeo 1 (do inglês, <i>Formyl peptide receptor 1</i>)
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos (do inglês, <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>)
HE	Hematoxilina-eosina
HIF-1	Fator induzível por hipóxia-1 (do inglês, <i>Hypoxia-inducible factor 1</i>)
HPV	Papiloma Vírus Humano (do inglês, <i>Human Papillomavirus</i>)

IL	Interleucina
INF-γ	Interferon-gama
LAG-3	gene 3 de ativação de linfócitos (do inglês, <i>Lymphocyte-activation gene 3</i>)
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>)
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês, <i>mammalian target of rapamycin</i>)
N0	Ausência de metástase linfonodal
N+	Presença de metástase linfonodal
N1	Neutrófilos com função anti-tumorigênica
N2	Neutrófilos com função pró-tumorigênica
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês, <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>)
NF-κB	Fator nuclear kappa B (do inglês, <i>nuclear factor kappa B</i>)
NRES	<i>National research ethics service</i>
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
PD-1	Receptor de morte celular programada-1 (do inglês, <i>Programmed cell death protein 1</i>)
PD-L1	Ligante de morte celular programada 1 (do inglês <i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>)
PD-L2	Ligante de morte celular programada 2 (do inglês, <i>Programmed cell death 1 ligand 2</i>)

PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase (do inglês, <i>Phosphoinositide 3-kinases</i>)
RNL	Relação neutrófilo-linfócito
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor (do inglês, <i>Receiver Operating Characteristic</i>)
r_s	Coeficiente de correlação de Spearman
SG	Sobrevida global
SHP-2	Fosfatase 2 que contém a região 2 do domínio de homologia Src (do inglês, <i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i>)
SLD	Sobrevida Livre de Doença
STAT-3	Transdutor de sinal e o ativador da transcrição (do inglês, <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face
TAM	Macrófagos associados ao tumor (do inglês, <i>tumor-associated macrophages</i>)
TAN	Neutrófilos associados ao tumor (do inglês, <i>tumor-associated neutrophils</i>)
TCR	Receptor de células T (do inglês, <i>T-cell receptor</i>)
TIL	Infiltrado linfocitário tumoral (do inglês, <i>tumor-infiltrating lymphocytes</i>)
TIM-3	Proteína mucina e imunoglobulina de célula T (do inglês, <i>T cell immunoglobulin and mucin domain-3</i>)

TGF-β	Fator de crescimento transformante beta (do inglês, <i>Transforming growth factor</i>)
Th1	Célula T auxiliar do tipo 1 (do inglês, <i>T helper 1</i>)
Th2	Célula T auxiliar do tipo 2 (do inglês, <i>T helper 2</i>)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>)
TNM	Sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástase
TPS	Porcentagem de Células tumorais PD-L1-positiva
Treg	Célula T reguladora
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, <i>Vascular endothelial growth factor</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E OROFARÍNGEO	22
1.2 MICROAMBIENTE TUMORAL	24
1.3 NEUTRÓFILOS ASSOCIADOS AO TUMOR	27
1.4 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL	31
1.5 EXAUSTÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE PD-L1 EM CEOO	34
2. OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	39
3.2 CASUÍSTICA	39
3.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	40
3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE DUPLA-MARCAÇÃO	41
3.5 REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA	43
3.6 RELAÇÃO NEUTRÓFILO-LINFÓCITO	44
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS	46
4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	46
4.2 RELAÇÃO NEUTRÓFILO-LINFÓCITO	49
4.3 NEUTRÓFILOS ASSOCIADOS AO TUMOR	52
4.4 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL	57
4.5 EXPRESSÃO DE PD-L1	60
4.6 MICROAMBIENTE INFLAMADO E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA	63
4.7 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	64

4.7.1 Sobrevida Global	64
4.7.2 Sobrevida Livre de Doença	68
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE	94
ANEXO B – PARECER DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA	96
ANEXO C – PARECER DO <i>NATIONAL RESEARCH ETHICS SERVICE</i>	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E OROFARÍNGEO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) corresponde a um grupo heterogêneo de tumores que acometem a cavidade bucal, lábio, faringe, laringe, cavidade nasal, glândulas salivares, tireoide e pele da cabeça e pescoço (LE; HANNA, 2018).

Os tumores de cabeça e pescoço são o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, com 550 mil casos e 380 mil mortes registrados anualmente (LE; HANNA, 2018). O lábio, a cavidade bucal e a orofaringe são os sítios mais frequentemente acometidos, sendo o carcinoma epidermoide o tipo histológico mais comum nestas regiões (LE; HANNA, 2018). Para o ano de 2018 foram estimados mais de 440 mil casos de tumores nestes sítios (BRAY et al., 2018). No Brasil, os tumores da cavidade bucal e orofaringe correspondem à quinta neoplasia mais frequente em homens e à 12^a em mulheres (INCA, 2018).

Os principais fatores de risco para o carcinoma epidermoide oral e orofaríngeo (CEOO) são o tabaco e o álcool, sendo a exposição solar um fator de risco para o câncer de lábio e a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) para os tumores da orofaringe. O cigarro contém mais de 300 carcinógenos que são liberados durante a combustão e se dissolvem na saliva sendo absorvidos pela mucosa oral (PEMBERTON, 2018). O álcool, por sua vez, além de produzir metabólitos carcinogênicos, aumenta a permeabilidade da mucosa oral facilitando a penetração dos carcinógenos presentes no cigarro. O álcool também causa imunossupressão e interfere nos mecanismos de reparo do DNA (OGDEN, 2005; MORSE et al., 2007).

O HPV é um grupo heterogêneo de vírus DNA de fita dupla, com cerca de 200 tipos já identificados. Alguns tipos são classificados como de alto risco oncogênico devido sua participação na tumorigênese do câncer cervical, anogenital e de orofaringe (ELREFAEY et al., 2014). O HPV infecta as células da camada basal do epitélio e, durante a tumorigênese, o DNA viral se integra ao DNA da célula hospedeira, fazendo com que a célula sintetize as oncoproteínas virais E6 e E7. A E6 inativa e degrada a proteína p53, que regula a parada do ciclo celular e apoptose. Já a E7 se liga ao

produto do gene retinoblastoma, com função de supressor tumoral, inibindo sua ação (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007).

Em geral, os tumores de cavidade bucal e orofaringe apresentam elevada taxa de mortalidade: dos 11.200 casos de câncer bucal registrados em 2018, 44% resultaram em óbito. No Brasil, essas taxas têm aumentado desde 1980 e atualmente, o país apresenta a maior taxa de mortalidade entre os países latino-americanos (INCA, 2018; PEREA et al., 2018). Embora a taxa de mortalidade em alguns sítios anatômicos tenha se estabilizado, no geral, há uma tendência de aumento por câncer de boca e orofaringe na maior parte do Brasil. Esta tendência foi evidente em regiões com menores taxas de profissionais de saúde ativos e com maior percentual de pessoas que nunca consultaram com um dentista (BOING et al., 2006; PEREA et al., 2018).

Apesar dos avanços no tratamento para o câncer, as taxas de sobrevida em 5 anos para o câncer de boca ainda são muito baixas (menores que 50%) e poucas melhorias foram constatadas nas últimas décadas. Embora muitos fatores biológicos como comorbidades, estado imunológico e nutricional contribuam para este cenário, o estadio avançado ao diagnóstico é o mais significativo fator relacionado a um pior prognóstico (SEOANE-ROMERO et al., 2012).

Embora a cavidade bucal seja um sítio anatômico de fácil acesso à visualização de lesões suspeitas, a maioria dos casos de câncer de boca é diagnosticado em estadios avançados (III e IV), o que implica em tratamento multimodal, resultando em maior morbidade e mortalidade. Estima-se que tumores em estadios iniciais tenham chance de cura de 80%, enquanto tumores em estadio IV apresentem uma taxa de cura de apenas 20% (LE CAMPION et al., 2016).

A dificuldade de acesso aos serviços de saúde, bem como a falta de conhecimento sobre o câncer bucal tanto por parte dos pacientes quanto dos profissionais da saúde, têm sido apontadas como as principais razões para o atraso no diagnóstico. O fluxo de encaminhamentos dentro do sistema de saúde, por sua vez, posterga o início do tratamento, o que compromete a eficiência do esquema terapêutico, aumentando as comorbidades em decorrência da própria terapia antineoplásica (FELIPPU et al., 2016; LE CAMPION et al., 2016; PEREA et al., 2018).

Assim, podemos observar que a detecção precoce é a forma mais eficaz de reduzir as taxas de morbimortalidade do câncer bucal, nesse sentido, políticas que visem a detecção precoce precisam ser incentivadas no país, priorizando grupos expostos aos fatores de risco para a doença. Desde a década de 1970, várias campanhas e estratégias para detecção precoce de câncer de boca foram promovidas por entidades vinculadas à saúde e pelo Ministério da Saúde, no entanto, ainda há necessidade da efetivação dessas estratégias como políticas públicas de saúde (SEOANE-ROMERO et al., 2012; TORRES-PEREIRA et al., 2012).

1.2 MICROAMBIENTE TUMORAL

O câncer surge a partir de células que sofreram uma sequência de alterações genéticas e epigenéticas ocasionadas por fatores intrínsecos e extrínsecos, as quais interferem progressivamente nos mecanismos responsáveis pela proliferação, diferenciação e morte celular (ONUICHIC; CHAMMAS, 2010).

O desenvolvimento tumoral depende da aquisição de múltiplas funções pelas células tumorais, tais como, autossuficiência de sinais proliferativos, evasão à apoptose, multiplicação autônoma e capacidade de invasão e metástase (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Embora as mutações sejam as causas mais comuns dessas modificações, sabe-se que a interação entre as células tumorais e outros tipos celulares e moléculas diversas é fundamental para a progressão tumoral. Dentro deste contexto, o câncer emerge estando sujeito a condições de vascularização, oxigenação e necrose (ONUICHIC; CHAMMAS, 2010; BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2016).

As células tumorais, portanto, interagem com outros elementos celulares e moleculares, constituindo o microambiente tumoral. Neste ambiente, fibroblastos, células endoteliais, fagócitos, vasos sanguíneos, citocinas e quimiocinas interagem, gerando estímulos celulares, bioquímicos e biofísicos que atuam sobre as células tumorais incentivando a promoção e progressão tumoral. O estudo dessas interações é fundamental para compreensão da dinâmica tumoral, e, portanto, podem ser úteis para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas (ALSIBAI; MESEURE, 2018).

Estudos têm mostrado que a composição do microambiente tumoral determina o comportamento do tumor (EREZ et al., 2010; YE et al., 2018). A presença de determinadas linhagens celulares e a expressão de algumas moléculas podem favorecer ou inibir processos cruciais da tumorigênese, como invasão, angiogênese e metástase. Deste modo, o microambiente tumoral interfere diretamente no prognóstico e na resposta ao tratamento (HINSHAW; SHEVDE, 2019).

Células da imunidade inata e adquirida e mediadores químicos da inflamação estão entre os elementos mais frequentes no microambiente tumoral, o que reflete a contribuição da inflamação para a tumorigênese e para a composição do microambiente tumoral. Esta relação foi inicialmente proposta por Rudolf Virchow, em 1863, após observação de que a infiltração leucocitária era uma característica marcante dos tumores. Evidências mais recentes apontam que a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), produzidas pelos fagócitos que infiltram o sítio da inflamação, bem como, a produção de citocinas pró-inflamatórias, podem causar danos ao DNA, provocando alterações genéticas e epigenéticas (MURATA, 2018).

Neutrófilos e macrófagos recrutados para os tecidos durante a inflamação produzem radicais hidroxila, superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. A expressão contínua desses radicais livres altera a estrutura de bases nitrogenadas do DNA e pentoses, promovem quebras de cadeias, criação de sítios abásicos e ligações cruzadas de proteínas com DNA. Esses danos podem ocorrer em regiões codificantes de genes que controlam a proliferação, apoptose e o reparo do DNA. Ademais, o acúmulo de mutações ao longo do DNA leva à instabilidade genômica e, conseqüentemente, à iniciação e progressão tumoral (DIZDAROGLU et al., 2002; BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2016; QU et al., 2018).

A exposição a radicais livres e citocinas pró-inflamatórias podem levar à hipermetilação das ilhas CpG, causando o silenciamento de genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA. Por outro lado, a hipometilação geral do DNA, também decorrente da exposição a radicais livres, contribui para a instabilidade genômica (KIM; CHANG, 2014).

Além das EROs, alguns mediadores inflamatórios participam da tumorigênese, contribuindo para o crescimento tumoral, invasão e metástase, principalmente pela

ativação de fatores de transcrição que controlam a proliferação e a sobrevivência celular, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), o transdutor de sinal e o ativador da transcrição 3 (STAT-3) e fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1) (MULTHOFF et al., 2012; MURATA, 2018).

Alguns estados patológicos relacionados à inflamação persistente estão intimamente associados ao dano ao DNA e consequente contribuem para a tumorigênese, como é o caso das doenças inflamatórias intestinais e inflamação secundária a infecções persistentes. A inflamação crônica provoca um aumento da renovação tecidual favorecendo a ocorrência e o acúmulo de mutações gênicas (WROBLEWSKI et al., 2010). Estudos mostraram que indivíduos com doença inflamatória intestinal, por exemplo, têm elevado risco de desenvolver carcinoma colorretal, com o risco aumentando de acordo com a duração e extensão da doença (KIM; CHANG, 2014).

A queima do cigarro produz EROs, que não são retidas pelos filtros, e atuam diretamente sobre as células epiteliais das vias aéreas superiores. Outros metabólitos originados da combustão, por sua vez, induzem a produção de mediadores inflamatórios que promovem o recrutamento de células inflamatórias e elevam a resistência das células epiteliais à apoptose.(LEE et al., 2012).

A fumaça do cigarro também tem efeito imunossupressor e prejudica os mecanismos inatos de defesa, modulando a apresentação de antígeno e promovendo a auto-imunidade. Essas alterações também contribuem para a imunossupressão no microambiente tumoral, levando a um prognóstico desfavorável e pior resposta ao tratamento imunoterápico (BONOMI et al., 2014).

A imunossupressão no microambiente tumoral tem se tornado cada vez mais relevante para a compreensão da biologia tumoral. A presença de células imunorreguladoras e moléculas de exaustão, como PD-L1 podem contribuir para uma resposta anti-tumoral ausente ou ineficiente o que colabora para menor sobrevida global e maior índice de recidiva e metástases em tumores de cabeça e pescoço (MULTHOFF et al., 2012; QU et al., 2018). Nesse contexto, o microambiente tumoral emerge como fonte para possíveis alvos terapêuticos e potenciais biomarcadores que possam prever o prognóstico e a resposta ao tratamento (ALSIBAI; MESEURE, 2018).

1.3 NEUTRÓFILOS ASSOCIADOS AO TUMOR

A mobilização dos neutrófilos é importante porque estas células são capazes de neutralizar os microrganismos com eficiência uma vez que conseguem matar, fagocitar e digerir bactérias e fungos. Ademais, os neutrófilos também desempenham um papel mediador da resposta inata e adaptativa do hospedeiro liberando citocinas e quimiocinas que recrutam outras células, tais como monócitos, células dendríticas, células *natural killer*, linfócitos Th1 (*T helper* ou auxiliares) e Th17, além de regularem o desenvolvimento de linfócitos B e T e liberarem fatores angiogênicos e fibrogênicos, conforme ilustrado na figura 1 (TECCHIO et al., 2014; POWELL; HUTTENLOCHER, 2016; TENG et al., 2017).

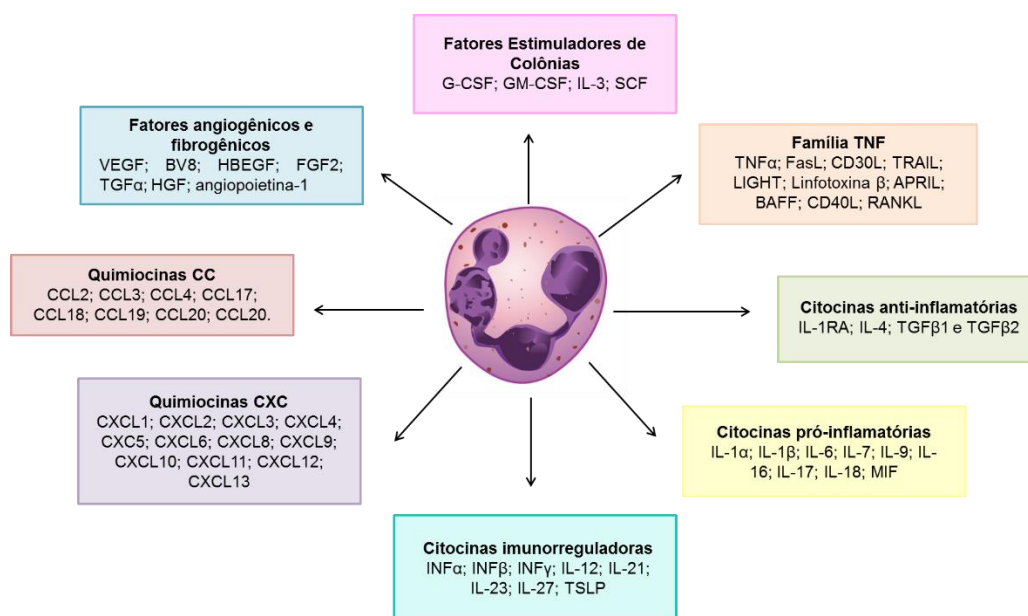


Figura 1- Principais citocinas produzidas pelos neutrófilo. Dentre as citocinas produzidas pelos neutrófilos destacam-se os fatores angiogênicos e fibrogênicos, que favorecem a neoangiogênese tumoral.

Devido à variedade de citocinas produzidas, os neutrófilos são as células mais comuns nos infiltrados teciduais e sua persistência no local está relacionada com inflamação crônica e dano tecidual (TECCHIO et al., 2014). Além de estarem presentes em sítios inflamatórios, os neutrófilos podem ser encontrados associados ao tumor (TAN).

Os neutrófilos são atraídos para o tumor pela ação de quimiocinas produzidas pelas células do sistema imune que estão no microambiente tumoral e também diretamente pelas células tumorais (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2015). Essas quimiocinas atraem os neutrófilos circulantes para o tumor que, por sua vez, produzem CCL17 recrutando células T regulatórias (Treg), as quais produzem mais IL-8, atraindo mais neutrófilos. A presença de células Treg no microambiente contribui para a imunossupressão tumoral, posto que, os neutrófilos também sintetizam arginase-1 que inibe os linfócitos T CD8 (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2015).

A presença de TAN têm um papel considerado controverso na tumorigênese, uma vez que têm efeitos benéficos e prejudiciais relatados. Em muitos tipos de câncer, incluindo os tumores de cabeça e pescoço, a infiltração de neutrófilos tem sido associada a menor sobrevida, metástase linfonodal, estadio avançado e maiores chances de recorrência (MAGALHAES et al., 2014)

Evidências têm mostrado que os TAN têm um papel pró-tumoral, uma vez que produzem moléculas que induzem a proliferação celular, angiogênese e metástase (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2015; POWELL; HUTTENLOCHER, 2016). Os neutrófilos participam da angiogênese fisiológica através da síntese de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e estudos *in vitro* já mostraram seu papel na neoangiogênese tumoral. A presença de grande quantidade de neutrófilos tem sido correlacionada ao aumento da densidade de microvasos em tumores malignos, o que é uma forte evidência de seu papel pró-angiogênico em tumores (TAZZYMAN et al., 2009; LI, T.-J. et al., 2017).

Adicionalmente, os neutrófilos sintetizam metaloproteinases de matriz, como a MMP9, que tem atividade pró-angiogênica. A MMP9 degrada e remodela a matriz extracelular, processos que culminam na liberação e ativação de fatores angiogênicos como VEGF e fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF2). Esses fatores atuam sobre as células endoteliais levando à síntese e crescimento de novos vasos sanguíneos (TAZZYMAN et al., 2009).

Macrófagos também são produtores de MMP9, no entanto, em modelos animais, Nozawa e autores (2006) identificaram os dois tipos celulares associados ao tumor, porém, apenas neutrófilos eram MMP9+, o que sugere que estas células estejam mais diretamente implicadas na neoangiogênese tumoral. Outros achados suportam esta

teoria: neste mesmo estudo, a depleção temporária de neutrófilos suprimiu a atividade de VEGF (NOZAWA et al., 2006). Li e colaboradores (2017) identificaram predomínio de neutrófilos MMP9+ na margem invasiva do tumor e em cultura de células, sendo que os neutrófilos secretaram níveis mais elevados de MMP9, em comparação com células tumorais, macrófagos e linfócitos T. Em outro estudo, a inibição da infiltração de neutrófilos MMP9+ para o tumor, através da neutralização da IL-8, reduziu a atividade angiogênica tumoral (BEKES et al., 2011).

A presença de neutrófilos também foi correlacionada com metástases. A metástase é um fenômeno complexo, caracterizado pelo destacamento de células tumorais do sítio primário e subsequente invasão de vasos sanguíneos ou linfáticos (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2016). A migração das células tumorais através da membrana basal, do tecido conjuntivo e da parede dos vasos é favorecida pela ação de MMP, uma vez que degradam a rede de macromoléculas permitindo este processo (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2016).

Tumores metastáticos exibem alta densidade de neutrófilos MMP9+ no estroma tumoral. Isto tem sido observado em diversos tumores, incluindo os da cavidade bucal (SILVA et al., 2018). Os neutrófilos MMP9+, portanto, têm sido estudados como possíveis alvos terapêuticos para prevenir angiogênese e metástase e, também como biomarcadores de progressão tumoral (BEKES et al., 2011; HUANG, H., 2018).

Além das metaloproteinases, as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) também contribuem para a metástase. As NETs são redes fibrilares constituídas por DNA e enzimas citotóxicas que são liberadas no espaço extracelular onde os microrganismos são capturados. Estruturas semelhantes a estas armadilhas foram encontradas em torno de células tumorais da mama e do cólon em camundongos onde foi demonstrado que estas células induzem os neutrófilos a formarem as armadilhas na ausência de patógenos. Sugere-se que as NETs aumentam a permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de células, além de promoverem a invasão pelo aumento da concentração de proteases associadas (PARK et al., 2016; AL-HAIDARI et al., 2019).

Por ter um papel proeminente na angiogênese e metástase, a neutropenia em pacientes com câncer tem sido relacionada à melhor sobrevida. A neutropenia é uma condição clínica comum em pacientes submetidos à quimioterapia, por esse motivo,

é comum junto ao tratamento a administração de G-CSF para prevenir a mortalidade associada a infecções neutropênicas (PARK et al., 2016).

Embora o uso de G-CSF seja imprescindível para prevenção de infecções, a estimulação de neutrófilos resulta em aumento da capacidade metastática em alguns tumores. No estudo de Kowanetz e colaboradores (2010) foi demonstrado que o G-CSF, expresso pelas células de câncer de pulmão, facilita a metástase, por outro lado, o uso de anticorpo anti-G-CSF levou à redução da metástase (KOWANETZ et al., 2010)

Os neutrófilos podem contribuir com a metástase através da liberação de leucotrienos, como foi evidenciado por Wculek e Malanchi (2015). Neste estudo, foi observado acúmulo de neutrófilos no tecido metastático antes da infiltração por células tumorais derivadas da mama em modelo animal. *In vitro*, foi identificado aumento do potencial metastático em cultura de células tumorais expostas a neutrófilos. Esta ação foi mediada pelos leucotrienos derivados de neutrófilos que também foram encontrados em altas quantidades na cultura de neutrófilos e foram responsáveis pelo aumento da proliferação de células tumorais. Ainda neste estudo, a inibição da síntese de leucotrienos reduziu a metástase, e os autores também mostraram que a neutropenia tumoral induzida geneticamente proporcionou redução da metástase espontânea, enfatizando ainda mais sua participação neste processo (WCULEK; MALANCHI, 2015).

Embora os neutrófilos estejam associados a um pior prognóstico na maioria dos tumores malignos, estas células também podem desempenhar função anti-tumoral e, por esse motivo, o papel dos neutrófilos na tumorigênese ainda é bastante controverso. Os neutrófilos têm sido reportados na literatura como sendo de dois tipos: N1, que exibe funções pró-inflamatórias e anti-tumorigênicas e N2 com função pró-tumorigênica (MANTOVANI et al., 2011; URIBE-QUEROL; ROSALES, 2015).

Assim, o microambiente tumoral funcionaria como o coordenador do *status* funcional dos TANs: em estadios iniciais, TANs têm sido relatados como mais citotóxicos para as células tumorais, sintetizando altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e EROs, que podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais, conforme será discutido adiante. Em estadios mais avançados, tem sido mostrado que os neutrófilos desempenham atividade imunossupressora e pró-tumorigênica, sobretudo devido à superexpressão

de citocinas imunossupressoras como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (FRIDLENDER et al., 2009; URIBE-QUEROL; ROSALES, 2015).

O TGF- β parece desempenhar um papel importante na polarização dos neutrófilos para o fenótipo N2, além de aumentar a infiltração de TANs. Em contrapartida, a inibição de TGF- β , além de aumentar a ativação de linfócitos T CD8, polariza para o fenótipo N1 (FRIDLENDER et al., 2009; MANTOVANI et al., 2011).

As EROs indiretamente levam à progressão tumoral induzindo a proliferação e angiogênese uma vez que ativam metaloproteínases, além de atuarem diretamente no DNA levando a mutações pontuais, quebra de cadeia de DNA e danos oxidativos. A genotoxicidade induzida por EROs pode levar as células tumorais à morte, mas também pode induzir a carcinogênese (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2015).

As enzimas que compõem os grânulos também têm implicação na tumorigênese e na progressão tumoral. Foi demonstrado que a elastase, presente nos grânulos azurofílicos, atua promovendo a proliferação de células tumorais e a migração celular, o que sugere sua participação na metástase. A catepsina G, também oriunda dos grânulos azurofílicos, atua na remodelação da matriz extracelular e também foi demonstrada sua implicação na migração celular, angiogênese e metástase (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2015).

Os neutrófilos são células altamente proteolíticas e móveis, o que possibilita seu contato com grande parte das células que compõem o microambiente tumoral. Devido à sua acessibilidade e abundância no sangue e saliva, eles têm sido considerados bons candidatos para prospecção de biomarcadores em diversos tipos câncer, incluindo CCP (MAGALHAES et al., 2014). A infiltração de TAN, proteínas secretadas por neutrófilos e a relação neutrófilo-linfócito (RNL) no sangue periférico têm sido estudados como biomarcadores de progressão tumoral e prognóstico.

1.4 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL

A infiltração de linfócitos é uma característica marcante dos tumores de cabeça e pescoço devido à proximidade dos sítios acometidos aos tecidos linfoides do anel

linfático de Waldeyer e à infiltração das células na lesão. Além disso, infecções por HPV e vírus Epstein-Barr estão associadas à oncogênese em alguns sítios, onde é comum a infiltração de linfócitos T induzidos pela presença de antígenos virais (LEI et al., 2016). Assim, tumores desencadeados por vírus provocam uma resposta imune adaptativa mais eficiente, uma vez que a resposta contra antígenos virais tem menor probabilidade de ser suprimida (WARD et al., 2014).

Adicionalmente, as intensas mutações que ocorrem no DNA das células tumorais, devido à elevada instabilidade genômica, podem alterar a sequência de codificação de aminoácidos, resultando na expressão de proteínas mutantes. Essas proteínas são processadas como epítomos e expostas na superfície celular, funcionando como neoantígenos, conferindo imunogenicidade ao tumor e induzindo a resposta anti-tumoral (YARCHOAN et al., 2017).

A atuação do sistema imunológico frente ao tumor é dividida em sete estágios, de acordo com Chen e Mellman (2013): (1) liberação de neoantígenos pelas células tumorais; (2) apresentação de antígenos; (3) iniciação e ativação de linfócitos T; (4) trânsito de linfócitos T ativados; (5) infiltração de linfócitos T ativados no leito tumoral; (6) reconhecimento das células tumorais e (7) eliminação (CHEN, D. S.; MELLMAN, 2013; KIM, J. M.; CHEN, 2016).

A interação entre as células tumorais e os linfócitos T tem um papel dubio uma vez que pode proteger o organismo do câncer ou auxiliar no seu desenvolvimento, contribuindo para o escape da vigilância imunológica. Este processo, denominado imunoedição, é caracterizado por três fases: (1) eliminação, onde as células tumorais são eliminadas pela vigilância imunológica; (2) equilíbrio, onde as células transformadas não são extintas, mas mantidas sob controle; (3) e escape, caracterizada por modificações nas células tumorais que as permitem escapar da resposta imunológica (DE MEULENAERE et al., 2017).

A presença do infiltrado linfocitário tumoral (TIL) no microambiente tumoral, portanto, reflete a resposta imunológica direcionada ao tumor. Evidências apontam que a presença de linfócitos no microambiente tumoral está relacionada a melhores respostas à terapia adjuvante, por este motivo, o TIL emergiu como um potencial biomarcador de prognóstico (LEI et al., 2016).

O TIL é composto por uma variedade de subpopulações de linfócitos. Os subtipos celulares variam de acordo com a localização do tumor, tipo tumoral, estadió e outros fatores relacionados ao microambiente tumoral, como a expressão de moléculas imunossupressoras. Embora a elevada infiltração de linfócitos por si só tenha sido correlacionada com prognóstico favorável, sua composição é relevante uma vez que pode refletir a resposta imune ou a evasão, afetando o desfecho (DE MEULENAERE et al., 2017).

Os principais subtipos de TIL incluem os linfócitos T CD8+, células T CD4+ e células T reguladoras CD4+/CD25+ (CHEN, W.-Y. et al., 2018). As células T CD8+ e T CD4+ mediam a resposta imune adaptativa e reagem ao tumor através da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) derivadas de proteínas mutadas. A resposta mediada pelas células T CD8+ são mais efetivas uma vez que estas desempenham atividade tumoricida (HADRUP et al., 2013).

As células T CD4+ exercem atividade anti-tumoral fornecendo ajuda aos linfócitos T CD8+ através da ativação de células apresentadoras de antígeno e pelo aumento da apresentação de antígenos via MHC classe II. Além disso, os linfócitos T CD4+ podem reconhecer neoantígenos expressos nas células tumorais diretamente, no entanto, grande parte dos tumores sólidos não expressam moléculas MHC de classe II. Embora eles exerçam atividade anti-tumoral, a presença de células T CD4+ no TIL permanece controversa com alguns estudos relacionando a presença de linfócitos T CD4+ à metástase e acometimento linfonodal (DENARDO et al., 2009; HADRUP et al., 2013; DURGEAU et al., 2018).

Em outros tumores, altos níveis dessas células foram positivamente correlacionados a melhor sobrevida global, no entanto, na cavidade bucal, altos níveis de T CD4+ estão associados a um pior prognóstico. Esses resultados conflitantes podem ser explicados pela heterogeneidade da população de linfócitos T CD4+, formada por Th1, Th2, Th9 e Th17 e os linfócitos T reguladores (DE MEULENAERE et al., 2017).

Estudos têm mostrado que os linfócitos Treg são mais frequentemente encontrados no TIL, em comparação dos linfócitos T auxiliares. Os Treg migram para sítios inflamatórios e suprimem a atividade de linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos através da produção de citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β , deste

modo, atuam na manutenção da autotolerância e previnem doenças autoimunes (TOGASHI et al., 2019).

Os linfócitos T reguladores auxiliam no escape à resposta imunológica, uma das marcas registradas do câncer (HANAHAH; WEINBERG, 2011). Eles representam cerca de 10% a 50% das células T CD4+ que infiltram o tumor (TOGASHI et al., 2019). A presença de linfócitos T reguladores no infiltrado linfocitário de tumores da cavidade bucal e orofaringe tem papel controverso, conforme mostrado por O'Higgins e colaboradores (2018) em uma revisão sistemática analisando 45 estudos (O'HIGGINS et al., 2018).

A avaliação do TIL pode ter um valor prognóstico importante em alguns tipos tumorais. Em tumores de cólon, Galon e colaboradores (2014) propuseram um *immunoscore* baseado na quantificação de duas populações de linfócitos, o qual teve melhor valor preditivo para sobrevida global e livre de doença comparado ao sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástase (TNM) .

No entanto, a avaliação da abundância do TIL, sem discriminar as subpopulações que compõem, tem emergido como um potencial biomarcador, e tem como vantagem a aplicabilidade clínica e o baixo custo

1.5 EXAUSTÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE PD-L1 EM CEOO

Os linfócitos T ativados reconhecem células infectadas por patógenos e células malignas. Sua ativação requer a interação com células apresentadoras de antígenos (APC) o que se dá através da ligação de receptores de células T (TCR) a peptídeos antigênicos do MHC (SUN et al., 2018).

Durante a ativação inicial, vários mecanismos regulatórios são induzidos através dos checkpoints imunológicos. Esses mecanismos desempenham um importante papel na regulação da quantidade e atividade de células T, controlando o grau de inflamação, limitando o dano tecidual e mantendo a autotolerância (ALSAAB et al., 2017; SUN et al., 2018).

Células T constantemente expostas a antígenos têm sua função regulada e perdem sua função e reatividade, o que caracteriza o fenômeno de exaustão celular. Neste processo, células T podem expressar receptores inibitórios, como antígeno-4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4), receptor de morte celular programada-1 (PD-1), LAG-3 (gene 3 de ativação de linfócitos) e TIM-3 (proteína mucina e imunoglobulina de célula T) (WANG, J. et al., 2018).

A via PD-1 tem um papel crucial na exaustão de células T. O PD-1 é expresso na superfície de linfócitos T e se liga aos ligantes PD-L1 e PD-L2, os quais são frequentemente encontrados em células inflamatórias e células tumorais, em diversos tipos de câncer. A interação do PD-1 com seus ligantes leva à neutralização de sinais de ativação para as células T e inibição da proliferação e diferenciação. Os principais mecanismos envolvidos nesse processo estão representados esquematicamente na figura 2 (KYTHREOTOU et al., 2018; SUN et al., 2018).

A interação PD-1/PD-L1 inibe a sinalização TCR através da fosforilação da proteína tirosina quinase Zap-70, regulando negativamente a via de sinalização de RAS, o que resulta em redução na ativação de alguns fatores de transcrição como NF- κ B, proteína ativadora 1 e fator nuclear de células T ativadas. Estes fatores atuam na ativação, proliferação, função efetora e sobrevivência de células T, deste modo, essas funções são suprimidas (SHEPPARD et al., 2004; SUN et al., 2018).

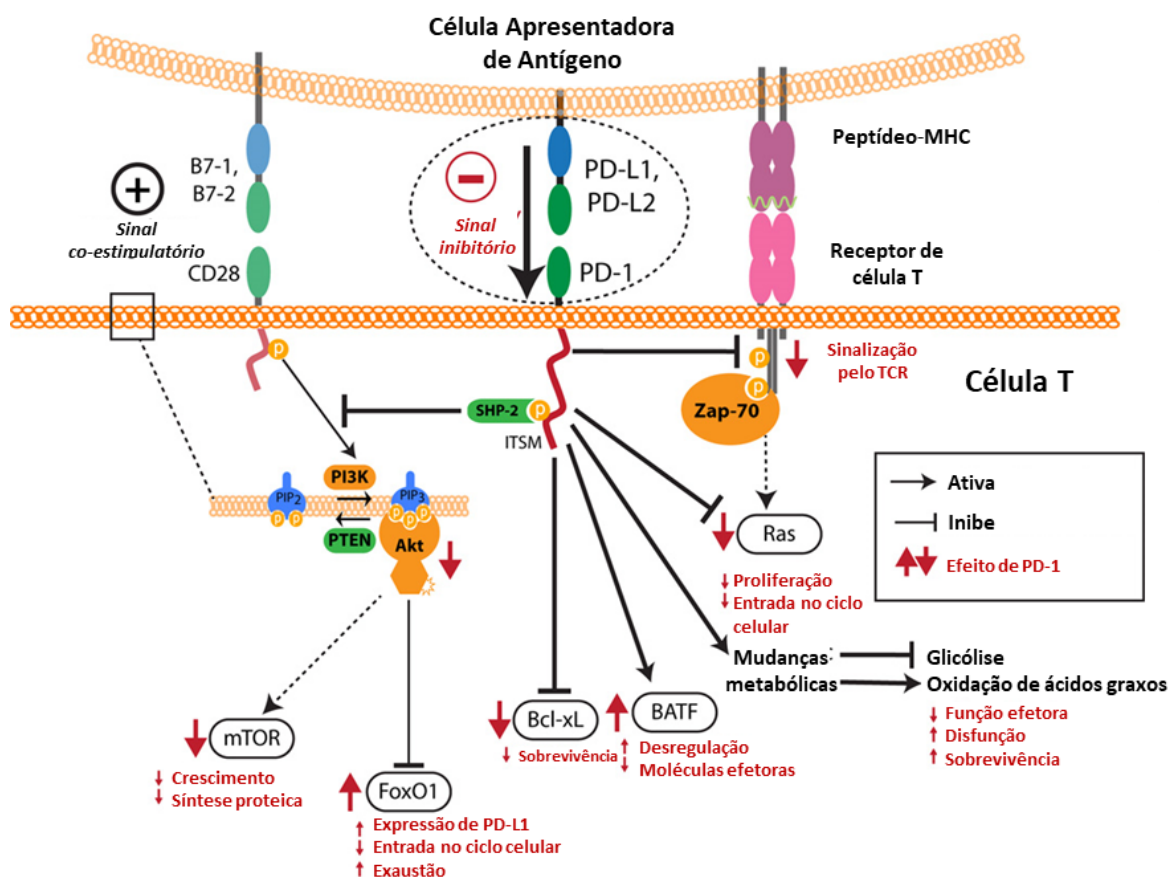


Figura 2- Sinalização PD-1/PD-L1. A interação de PD-1 com seus ligantes regula inúmeras vias como RAS, BATF (*Basic Leucine Zipper Transcription Factor*) e mTOR que culminam na redução da síntese proteica e diminuição na proliferação de linfócitos e surgimento do fenótipo de linfócitos T esgotados. Esses eventos contribuem para a evasão à resposta imunológica. Adaptado de Chinai e colaboradores (2015)¹.

Esta interação também promove o recrutamento de fosfatases, dentre elas a SHP-2 que aumenta a expressão de BATF, um fator de transcrição que controla o desenvolvimento e diferenciação de linhagens de linfócitos T, incluindo T CD8. Estudos têm mostrado que a superexpressão deste fator leva à diminuição da proliferação celular e da produção de IL-2, que são ocorrências associadas à exaustão de células T em infecções virais crônicas e câncer (QUIGLEY et al., 2009; KUROMA et al., 2011; GULER et al., 2015; SHARPE; PAUKEN, 2018).

A SHP-2 também inibe a ativação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que resulta na regulação negativa de mTOR, levando a diminuição da proliferação, diferenciação e

¹ Adaptado/traduzido de Chinai J.M et al (2015). New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. Trends in pharmacological sciences, 36(9), 587-595, sob os termos de Clearance Center Copyright © 2015, com permissão da Elsevier.

sobrevivência de linfócitos e redução da síntese proteica. A inibição de PI3K também culmina em aumento a meia-vida de FoxO1 que contribui com um aumento na expressão de PD-1 e promove um perfil de linfócitos T esgotados (CHINAI et al., 2015; CONCIATORI et al., 2018).

Além do aumento da expressão de receptores inibitórios, na exaustão celular há uma mudança no perfil de citocinas produzidas: há redução de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-2 e interferon-gama (INF- γ), o que implica em redução da proliferação e diferenciação de linfócitos T e sua atividade citolítica, e aumento da produção de IL-10 e TGF- β , citocinas que vem sendo associadas a um estado de imunossupressão (BALKHI et al., 2015; WHERRY; KURACHI, 2015).

Em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, a expressão de PD-L1 constitui o principal mecanismo responsável pelo fenótipo imunossupressor. A elevada expressão deste ligante sugere a evasão à resposta, o que tem sido associado a pior prognóstico. Desse modo, seu potencial biomarcador tem sido amplamente estudado em CCP (FARKONA et al., 2016; HIRAI et al., 2017). Ainda nestes tumores, a expressão de PD-L1 tem sido correlacionada a menor tempo de sobrevida global e livre de doença e presença de metástase linfonodal e à distância (MÜLLER et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2018).

Seu uso como biomarcador tem sido considerado principalmente para seleção de pacientes para terapia de bloqueio de PD-1/PDL-1. O uso de anticorpos monoclonais que bloqueiam a via PD-1/PD-L1 restaura a função de células T exauridas, além de reduzir a atividade imunossupressora de linfócitos T reguladores e células malignas imunossupressoras. No entanto, apesar desta terapia culminar em respostas duradoras, estudos têm mostrado que um número limitado de pacientes tem sido beneficiado, com alguns grupos não apresentando resposta ou desenvolvendo resistência e recidiva (ZHOU, J. et al., 2017; LIN et al., 2018; NOWICKI et al., 2018).

Assim, o uso de PD-L1 como biomarcador pode auxiliar na identificação de pacientes com maiores chances de se beneficiarem com o tratamento imunoterápico. Estudos já mostraram que tumores que expressam PD-L1 respondem melhor à terapia anti-PD-1/PD-L1 (MÜLLER et al., 2017; NOWICKI et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial prognóstico de componentes do microambiente tumoral e da relação neutrófilo-linfócito (RNL) em carcinoma epidermoide oral e orofaríngeo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de neutrófilos e linfócitos associados ao tumor no microambiente tumoral;
- Determinar a RNL no sangue periférico pré-tratamento;
- Avaliar a expressão de PD-L1 em células tumorais e células inflamatórias;
- Verificar a correlação entre o infiltrado inflamatório no microambiente tumoral, os parâmetros histopatológicos de padrão de invasão tumoral, invasão linfática, vascular e perineural e as características clínico-patológicas.
- Avaliar o emprego de RNL, TIL, TAN e PD-L1 como biomarcadores de prognóstico em CEOO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo (processo nº 318/2011) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde, Vitória - ES (Anexo A), pela Comissão Nacional de Ética em pesquisa (Parecer nº 681/2011) (Anexo B) e pelo *National Research Ethics Service (NRES) - Coventry & Warwickshire* (EC.10.H1210.9) (Anexo C).

3.2 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo analítico longitudinal multicêntrico internacional no qual foram utilizadas amostras biológicas e dados clínicos de 199 pacientes atendidos nos serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (AFECC), do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo e do *University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust* (Reino Unido) no período de 2005 a 2017.

Para seleção foram definidos os seguintes critérios de inclusão: indivíduos de ambos os sexos, de todas as faixas etárias e grupos étnicos e com diagnóstico conclusivo de CEOO, sem tratamento prévio, com pelo menos 24 meses de acompanhamento, com registro de hemograma anterior à data de tratamento e com lâminas e/ou blocos em bom estado de conservação, isto é, com mais de 75% da área tecidual total representada.

Como critérios de exclusão foram considerados: casos com blocos ou lâminas defeituosos ou com menos de 75% de tecido tumoral; recidivas e casos submetidos a tratamento anti-neoplásico prévio e portadores de imunodeficiências.

Os pacientes foram acompanhados por no mínimo 24 meses e no máximo 60 meses. Durante este período foram coletados dados clínico-patológicos tais como sexo, idade, estadiamento clínico (TNM) e histórico de consumo de álcool e tabaco, por meio

de entrevista, consulta médica e revisão de prontuários. Foram considerados ex-tabagistas e ex-etilistas indivíduos que não possuíam histórico de consumo de tabaco e álcool, respectivamente, por no mínimo 12 meses. Também foram coletados dados referentes à progressão da doença, remissão, recidiva regional e à distância.

3.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Fragmentos tumorais, obtidos por biópsia ou ressecção cirúrgica, foram fixados em formalina e emblocados em parafina. Secções de 5 µm foram obtidas a partir dos blocos de parafina, e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio Zeiss® quanto ao padrão de invasão tumoral, TIL, invasão vascular, linfática e perineural.

O padrão de invasão tumoral foi avaliado no aumento de 200x seguindo os critérios propostos por Bryne e colaboradores (1992), os quais classificam o front de invasão tumoral em quatro categorias, conforme esquematizado na figura 3 (BRYNE et al., 1992).



Figura 3 - Classificação do padrão de invasão segundo Bryne e cols (1992). Padrão I: Compressivo e bordas infiltrantes bem delineadas. Padrão II: Infiltrante com cordões sólidos. Padrão III: Pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes. Padrão IV: Marcante dissociação em grupos pequenos ou células individualizadas. Fonte: adaptado de Heerema e colaboradores²

² Adaptado/traduzido de Heerema M. G et al (2015). Reproducibility and prognostic value of pattern of invasion scoring in low-stage oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*, 68(3), 388-397, sob os termos de Clearance Center Copyright © 2015, com permissão da John Wiley and Sons.

O padrão do infiltrado linfocitário foi analisado no aumento de 2,5x e classificado de acordo com os critérios proposto por Marsh e cols. (2011) os quais categorizam o TIL em: alto quando difuso e com presença de infiltrado em mais 80% do tumor/estroma; moderado, quando irregular e presente entre 20 a 80% do estroma/tumor e, baixo, quando fraco ou ausente e distribuído em menos de 20% do estroma/tumor (MARSH et al., 2011).

A invasão vascular, linfática e perineural seguiu os critérios estabelecidos pelo *The Royal College of Pathologists* no qual é considerado presente quando há identificação de células tumorais no espaço vascular, linfático e nas camadas da bainha nervosa, respectivamente (FARUQI; ROUS, 2018).

3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE DUPLA-MARCAÇÃO

Para detecção imuno-histoquímica de neutrófilos e PD-L1, lâminas gelatinizadas contendo cortes de 3 µm de espessura dos fragmentos tumorais fixados em formalina e emblocados em parafina foram submetidos ao processo de desparafinização, inicialmente por calor em estufa a 60 °C por 1 hora e posteriormente, em soluções de xilol à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram reidratados em concentrações graduais de etanol e lavados em água destilada.

Para a recuperação antigênica, os espécimes foram imersos em tampão citrato de sódio (pH=6,0) e aquecidos a 90-95 °C em banho-maria por 20 minutos. Após esfriamento, as lâminas foram lavadas com tampão diluído 1:20 (*Wash Buffer Envision™ DuoFLEX*, pH=7,6, Dako®) e procedeu-se com o bloqueio de proteínas por meio da solução *Protein Block* do kit *Novolink™ Polymer Detection System* (Leica Biosystem, Wetzlar, Alemanha) por 1 hora à temperatura ambiente.

O primeiro anticorpo primário foi aplicado (anti-PD-L1 – Abcam Biotechnology, Cambridge, MA, USA), previamente diluído na proporção de 1:400, e incubado em câmara escura e úmida a 4 °C *overnight*. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem, seguida do bloqueio da peroxidase endógena e da aplicação do sistema de detecção pós-primário e polímero conjugado com peroxidase (*Novolink™ Polymer Detection System* – Leica Biosystem, Wetzlar, Alemanha).

Posteriormente, procedeu-se a revelação utilizando 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) à temperatura ambiente por 2 minutos.

Após revelação, os espécimes foram lavados em água destilada e submetidos a uma nova recuperação antigênica com a finalidade de desnaturar anticorpos de alta afinidade e inibir reações inespecíficas (VAN DER LOOS, 2008). A recuperação antigênica foi então realizada novamente utilizando-se citrato de sódio (pH=6,0) aquecido a 90-95 °C em banho-maria por 10 minutos. Posteriormente, um novo bloqueio de proteína foi realizado, empregando-se a solução *Protein Block* do kit Novolink™ Polymer Detection System (Leica Byosystem, Wetzlar, Alemanha), desta vez por 10 minutos.

O segundo anticorpo primário foi aplicado (anti-elastase de neutrófilos – Abcam Biotechnology, Cambridge, MA, USA), previamente diluído na proporção de 1:100, e incubado em câmara escura e úmida a 4 °C *overnight*. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem e procedeu-se com a aplicação do anticorpo secundário e do sistema de detecção conjugado com fosfatase alcalina (Envision™ DuoFLEX. Dako, CA, USA) por 30 minutos cada. A reação foi revelada através da aplicação da solução *Permanent Red* por 5 minutos à temperatura ambiente.

A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e logo em seguida, imersas em água de amônia 10 vezes. A montagem foi feita em meio aquoso utilizando-se o *Ultramount aqueous permanent* (Dako, CA, USA), sem desidratação com solventes orgânicos.

Para controle positivo da reação, foram utilizados cortes de tonsila palatina humana. Os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários, os quais foram substituídos por tampão de lavagem.

Para a quantificação dos neutrófilos, dez campos contendo áreas representativas do tumor e estroma concomitantemente foram selecionados no aumento de 40x. Áreas de necrose e áreas adjacentes a ulcerações foram desconsideradas. Os neutrófilos foram quantificados e, em seguida, foi determinada a média em cada região (estroma e tumor). Para análise dos dados, os neutrófilos foram divididos em dois grupos (alto e baixo) de acordo com o ponto de corte adotado obtido pela análise da Curva de

Características de Operação do Receptor, curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

Para avaliar a expressão de PD-L1 foi considerada a marcação membranar e citoplasmática utilizando o método *Combined Positive Score* (CPS), o qual considera a marcação de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias (macrófagos e linfócitos). O CPS foi obtido pela fórmula:

$$CPS = \frac{\text{Total de células PD – L1 positivas}}{\text{Total de células tumorais viáveis}} \times 100$$

Para determinar o CPS seguiu-se as recomendações de Gauduchon e cols (2019): áreas contendo pelo menos 100 células tumorais viáveis e com células PD-L1 positivas foram selecionadas no aumento de 100x. Em seguida, utilizando o aumento de 200x, as células viáveis totais do campo (denominador) e as células PD-L1 positivas (numerador) foram contadas e os valores obtidos foram aplicados à fórmula. Todos os campos com marcação positiva foram avaliados e a média do CPS foi determinada. Os casos foram categorizados em: <1; 1 a 19 e ≥20.

3.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a realização da reação de imunofluorescência, a desparafinização e recuperação antigênica foram realizadas seguindo os mesmos protocolos empregados na imunohistoquímica. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a dois banhos de 5 minutos cada, em tampão fosfato salino (PBS) e em seguida, incubadas em solução de albumina soro bovina a 1%, para bloqueio de proteínas inespecíficas, durante 20 minutos.

Posteriormente, os anticorpos primários anti-PD-L1 (diluição 1:400, Abcam) e anti-elastase de neutrófilos (1:200, Abcam) foram aplicados juntos e incubados em câmara escura e úmida a 4 °C *overnight*.

Em seguida, as lâminas foram submetidas a dois banhos (5 minutos) em PBS e procedeu-se com a aplicação de ambos os anticorpos secundários por 1 hora em

câmara escura e úmida à temperatura ambiente. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-IgG de coelho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 e anti-IgG de camundongo conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), diluídos em PBS na proporção de 1:500 e 1:400, respectivamente.

Após incubação, foram realizados dois banhos de PBS (5 minutos) e aplicou-se duas gotas da solução de 4,6-diamino-2-fenilindol-dihidrocloreto (DAPI) (Abcam Biotechnology, Cambridge, MA, USA) sobre os cortes e recobriu-os com lamínulas.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Leica 2500, contendo câmera Leica DFC 310 FX com software para captura de imagem versão 7.7.1 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

3.6 RELAÇÃO NEUTRÓFILO-LINFÓCITO

Contagens absolutas de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos foram obtidas por meio de análise de hemogramas disponíveis nos prontuários. Foram incluídos hemogramas realizados após confirmação do diagnóstico clínico e no período anterior ao início do tratamento anti-neoplásico.

A RNL foi calculada como a razão entre o número de neutrófilos e linfócitos. A partir dos valores obtidos, foi definido um ponto de corte e a relação foi categorizada como alta ou baixa. Para a obtenção do ponto de corte, foi plotada uma curva ROC relacionando os valores de RNL com diferentes prognósticos. O ponto de corte foi definido tendo como critério os valores de sensibilidade e especificidade do teste.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas através dos softwares MedCalc® versão 14.8.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) e *Statistical Package for the Social*

Sciences (SPSS)® software, versão 23.1 e o nível de significância adotado para todos os testes foi de 95%, $p \geq 0,05$.

Uma curva ROC foi plotada para selecionar o ponto de corte da RNL e TAN. O valor de corte ideal foi determinado pelo índice de Youden J, o qual é definido como a distância máxima entre a curva ROC e a linha diagonal onde os valores de sensibilidade e especificidade são maximizados. A área sob a curva (AUC) foi utilizada para avaliar a acurácia do teste em função do ponto de corte. Quanto mais próximo de 1, maior é a precisão do teste (LOPES et al., 2014).

O teste de Qui-Quadrado e o exato de Fisher foram utilizados para instituir associação entre as variáveis independentes. A comparação entre a quantidade de neutrófilos nos compartimentos intratumoral e peritumoral foi realizada através do teste T independente.

Foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (r_s) para verificar a correlação entre RNL e TAN e RNL aumentada e microambiente tumoral inflamado. O coeficiente de Spearman varia de -1 a +1, onde -1 representa correlação decrescente perfeita e +1 correlação crescente perfeita. Um coeficiente zero indica ausência de correlação.

O método de Kaplan-Meier foi utilizado para traçar as curvas de sobrevida as quais foram comparadas com o teste de Long Rank (GOEL et al., 2010). Sobrevida Global (SG) foi definida pelo intervalo entre a data do diagnóstico e data do óbito ou último acompanhamento. Sobrevida livre de doença (SLD) foi definida como intervalo entre a data do fim do tratamento e data da recidiva ou último acompanhamento. Indivíduos submetidos a tratamento paliativos ou que não finalizaram o esquema de tratamento foram censurados. Tanto a SG e SLD foram ajustadas para 36 meses.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

No período de 2005 a 2017 foram incluídos no estudo 199 indivíduos com diagnóstico conclusivo de CEOO atendidos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, sendo 73,8% do Brasil (n=147) e 26,2% do Reino Unido (n=52). O sexo masculino foi predominante entre os casos (78,9%) e a idade média da população ao diagnóstico foi de 58 anos (mínimo de 31 anos e máximo de 98 anos), com discreta predominância de indivíduos com idade igual ou inferior a 60 anos (55,6%).

Quanto à exposição aos fatores de risco álcool e tabaco, a maioria dos indivíduos era tabagista ou ex-tabagista (34,8% e 44,9%, respectivamente) e era etilista ou ex-etilista (50,4% e 41,7%, respectivamente). Metade dos indivíduos (n=100) consumiam álcool e tabaco concomitantemente.

O sítio anatômico mais acometido foi a língua (45,7%), seguido do assoalho bucal (14,2%). Dentre os casos de carcinoma epidermoide de orofaringe, a base de língua e o palato mole foram os sítios mais frequentemente acometidos, representando respectivamente 7,6% e 6,6% do total de casos.

Ao diagnóstico, 41,4% dos casos apresentavam tumores T4, enquanto 40,7% tinham metástase linfonodal. Considerando a classificação TNM, 51,1% apresentavam doença em estadio avançado (IV). Dados mais detalhados sobre as características clínico-patológicas dos casos selecionados podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos indivíduos com CEOO

Características clínico-patológicas	n	%
Sexo		
Masculino	157	78,9
Feminino	42	21,1
Idade (anos)^a		
≤ 60 anos	110	55,6
> 60 anos	88	44,4
Sítio anatômico (cavidade oral)^a		
Língua	90	45,7
Assoalho bucal	28	14,2
Área retromolar	10	5,1
Gengiva	10	5,1
Outros	10	5,0
Sítio anatômico (orofaringe)		
Base de língua	15	7,6
Palato mole	13	6,6
Outros	18	10,5
Tabagismo^a		
Sim	48	34,8
Ex-tabagista	62	44,9
Não	28	20,3
Etilismo^a		
Sim	64	50,4
Ex-etilista	53	41,7
Não	10	7,9
Tamanho do tumor^a		
T1	28	14,7
T2	65	34,0
T3	19	9,9
T4	79	41,4
Metástase linfonodal^a		
N+	81	40,7
N0	106	53,3
Estadiamento^a		
I	23	12,2
II	42	22,3
III	27	14,4
IV	96	51,1

^aNão informados: Idade: (n=1); sítio (n=2); tabagismo (n=61); etilismo (n=72); tamanho (n=8); metástase linfonodal (n=12); estadiamento (n=11).

Considerando as características microscópicas avaliadas nas lâminas coradas em HE, observamos que o padrão de invasão tipo III foi o mais frequente na população analisada (40,2%), seguido do padrão tipo II (33,6%). Os padrões menos frequentes foram o I e IV (ambos 13,1%). A figura 4 ilustra os principais aspectos observados na

análise do padrão de invasão tumoral seguindo os critérios propostos por Bryne e colaboradores (1992).

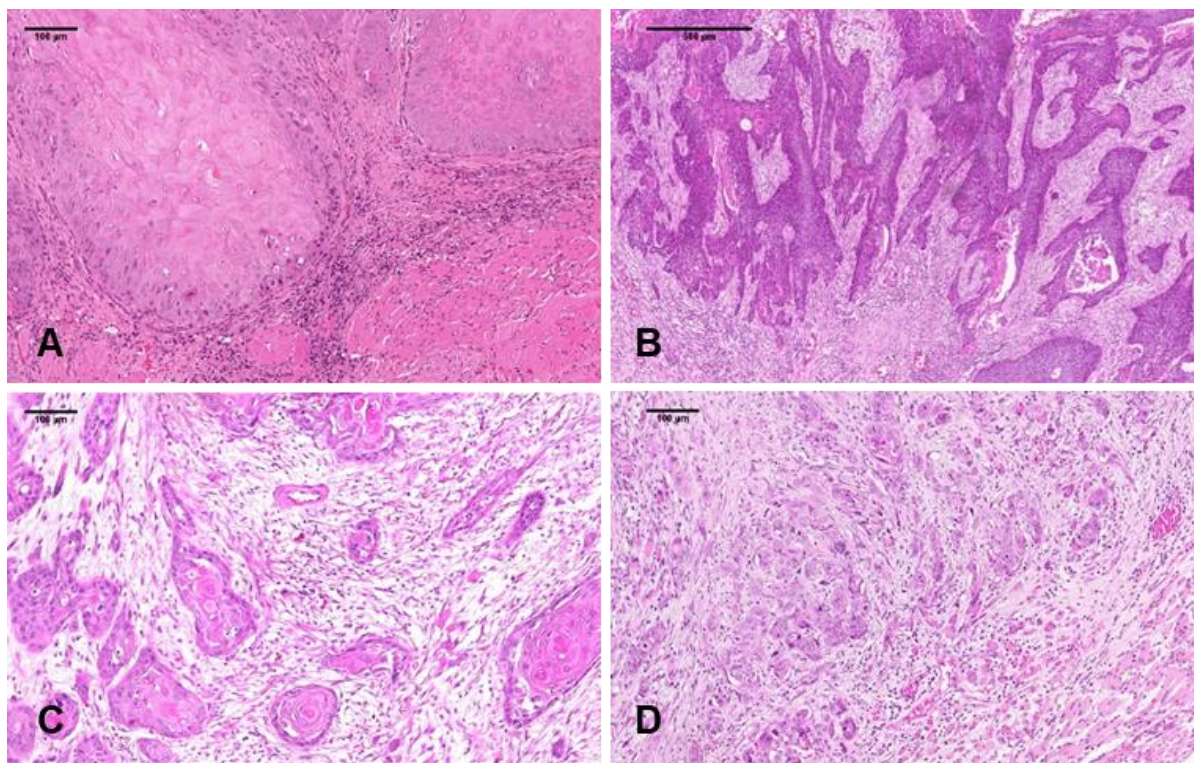


Figura 4 - Fotomicrografias de carcinoma epidermoide oral representando os padrões de invasão segundo Bryne e colaboradores (1992). Em (A) padrão de invasão tipo I; (B) padrão de invasão tipo II; (C) padrão de invasão tipo III; (D) padrão de invasão tipo IV. Coloração HE. Magnificação original: 40X e 100x.

Durante a análise histopatológica invasão vascular foi identificada em 84,7% dos casos avaliados. Invasão linfática e perineural foram observadas em 45,2% e 64,7% das amostras analisadas, respectivamente. Aspectos histopatológicos representativos de invasão vascular, linfática e perineural estão representados na figura 5.

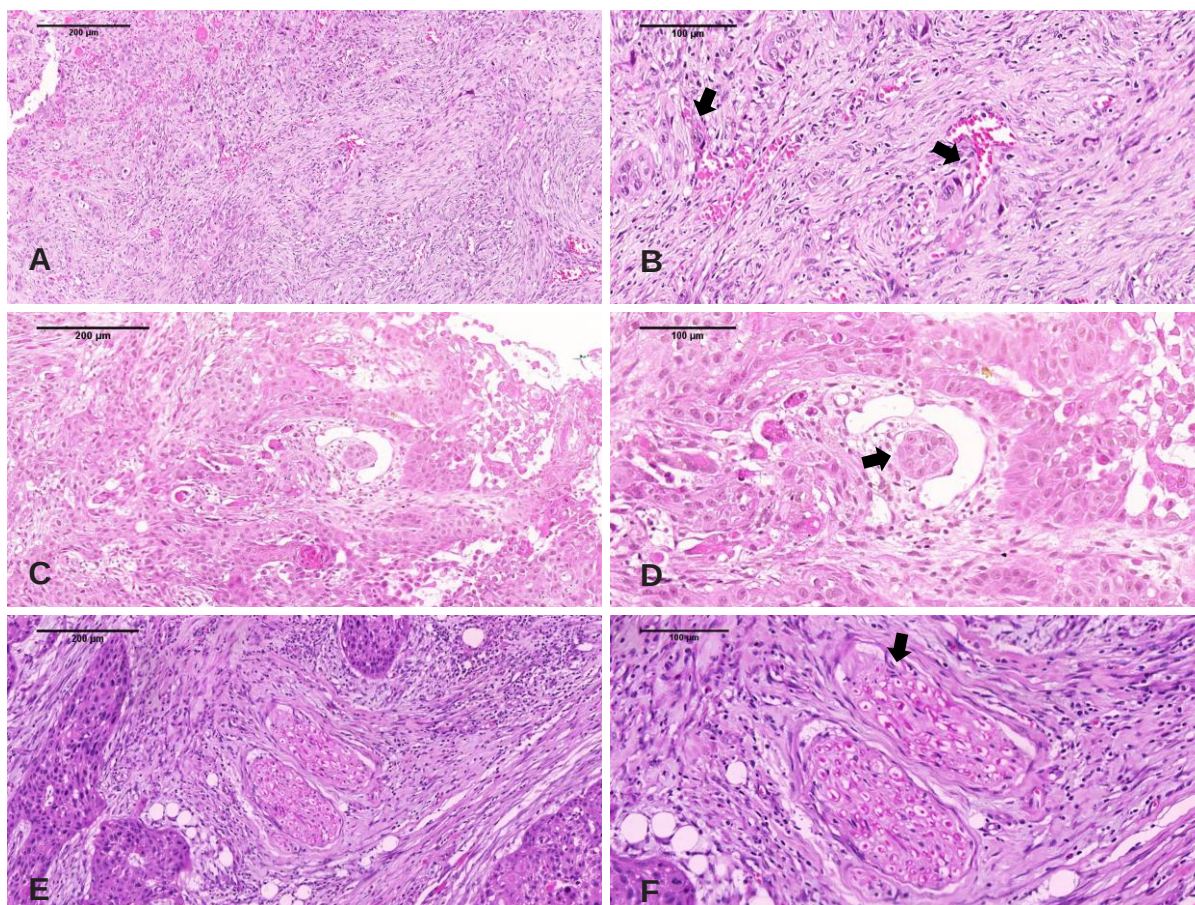


Figura 5 - Fotomicrografias de carcinoma epidermoide oral representativas de invasão vascular (A, B); linfática (C, D) e perineural (E, F). Coloração HE. Magnificação original: 10x e 20x.

4.2 RELAÇÃO NEUTRÓFILO-LINFÓCITO

Para determinar o ponto de corte ideal foi realizada uma curva ROC relacionando os fatores prognósticos aos valores de RNL (tabela 2). A escolha do ponto de corte teve como critério a área sob a curva ROC (AUC) que representa a acurácia do teste, quanto mais próximo de 1, melhor é sua capacidade discriminatória, e, portanto, sua sensibilidade e especificidade (LOPES et al., 2014). Os parâmetros avaliados foram metástase a distância (M0 ou M1), metástase linfonodal (N0 ou N1), recidiva (presente ou ausente), estado vital (vivo ou óbito), estadiamento clínico (agrupados em 1 e 2; 3 e 4) e tamanho do tumor (T1 e T2; T3 e T4). Valores de RNL maiores foram relacionados a pior prognóstico.

Tabela 2 - Área sob a curva ROC de RNL para cada fator prognóstico avaliado

Fator prognóstico	AUC (95% IC)	p
Metástase a distância	0,660 (0,455-0,865)	0,111
Metástase linfonodal	0,580 (0,476-0,685)	0,137
Recidiva	0,473 (0,368-0,577)	0,607
Estado vital	0,577 (0,473-0,680)	0,153
Estadiamento	0,705 (0,594-0,816)	0,001*
Tamanho	0,581 (0,475-0,687)	0,135

*Teste de DeLong

Estabeleceu-se o ponto de corte ideal da RNL $>1,85$ e o desfecho relacionado, o estágio avançado (3 e 4). A área sob a curva ROC foi de 0,705 ($p=0,001$), conforme mostrado no gráfico da figura 6. De acordo com o ponto de corte obtido, os indivíduos foram separados em dois grupos: baixa RNL ($\leq 1,85$) e alta RNL ($>1,85$).

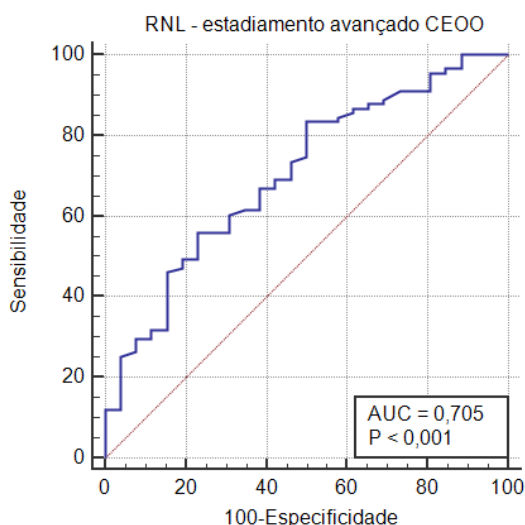


Figura 6 - Curva ROC para RNL em pacientes com CEOO. Ponto de corte: $>1,85$; sensibilidade: 83,52%; especificidade: 50,0%. Índice de Youden J: 0,335. AUC (área sob a curva): 0,705.

A associação entre RNL e as variáveis clínico-patológicas estão apresentadas na tabela 3. Foi observada associação entre alta RNL e os fatores de risco tabagismo ($p=0,039$) e consumo de álcool ($p=0,013$). Associação significativa também foi

observada entre o aumento de RNL e tumores com tamanhos T3 e T4 ($p=0,007$), bem como com doença avançada, estádios 3 e 4 ($p=0,001$).

Tabela 3 - Associações entre RNL e variáveis clínico-patológicas em CEOO (n=118)

Variáveis clínico-patológicas	RNL ≤ 1,85		RNL > 1,85		p*
	n=28	%	n=90	%	
Sexo					
Masculino	21	21,2	78	78,8	0,122
Feminino	7	36,8	12	63,2	
Idade (anos)^a					
≤ 60 anos	15	20,3	59	79,7	0,160
> 60 anos	13	30,2	30	69,8	
Sítio anatômico^a					
Cavidade oral	20	29,0	49	71,0	0,093
Orofaringe	8	16,7	40	83,3	
Tabagismo^a					
Sim e ex-tabagista	16	20,5	62	79,5	0,039
Não	7	46,7	8	53,3	
Etilismo^a					
Sim e ex-etilista	19	21,8	68	78,2	0,013
Não	4	80,0	1	20,0	
Tamanho do tumor^a					
T1/T2	16	39,0	25	61,0	0,007
T3/T4	12	16,2	62	83,8	
Metástase linfonodal^a					
N+	11	19,6	45	80,4	0,191
N0	17	28,3	43	71,7	
Estadiamento^a					
I/II	13	50,0	13	50,0	0,001
III/IV	15	16,5	76	83,5	

^aNão informados: Idade: (n=1); sítio (n=1); tabagismo (n=25); etilismo (n=26); tamanho (n=3); metástase linfonodal (n=2); estadiamento (n=1).

*Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fisher ($p \leq 0,05$)

Não foi observada associação significativa entre RNL e as variáveis histopatológicas analisadas (tabela 4).

Tabela 4 - Associação entre RNL e as variáveis histopatológicas analisadas em CEOO (n=118)

Variáveis clínico-patológicas	RNL≤1,85		RNL >1,85		p*
	n=28	%	n=90	%	
Padrão de invasão ^a					
I	3	42,9	4	57,1	0,825
II	6	31,6	13	68,4	
III	4	23,5	13	76,5	
IV	2	28,6	5	71,4	
Invasão linfática ^a					
Presente	4	26,7	11	73,3	0,457
Ausente	4	36,4	7	63,6	
Invasão vascular ^a					
Presente	11	26,8	30	73,2	0,327
Ausente	3	42,9	4	57,1	
Invasão perineural ^a					
Presente	2	20,0	8	80,0	0,314
Ausente	4	40,0	6	60,0	

^aNão informados: padrão de invasão (n=68); invasão linfática (n=98); invasão vascular (n=70); invasão perineural (n=98).

*Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fisher ($p \leq 0,05$)

4.3 NEUTRÓFILOS ASSOCIADOS AO TUMOR

Cinquenta amostras de CEOO foram avaliadas quanto à presença de neutrófilos associados ao tumor. Os neutrófilos foram quantificados nos compartimentos intratumoral e peritumoral (figura 7).

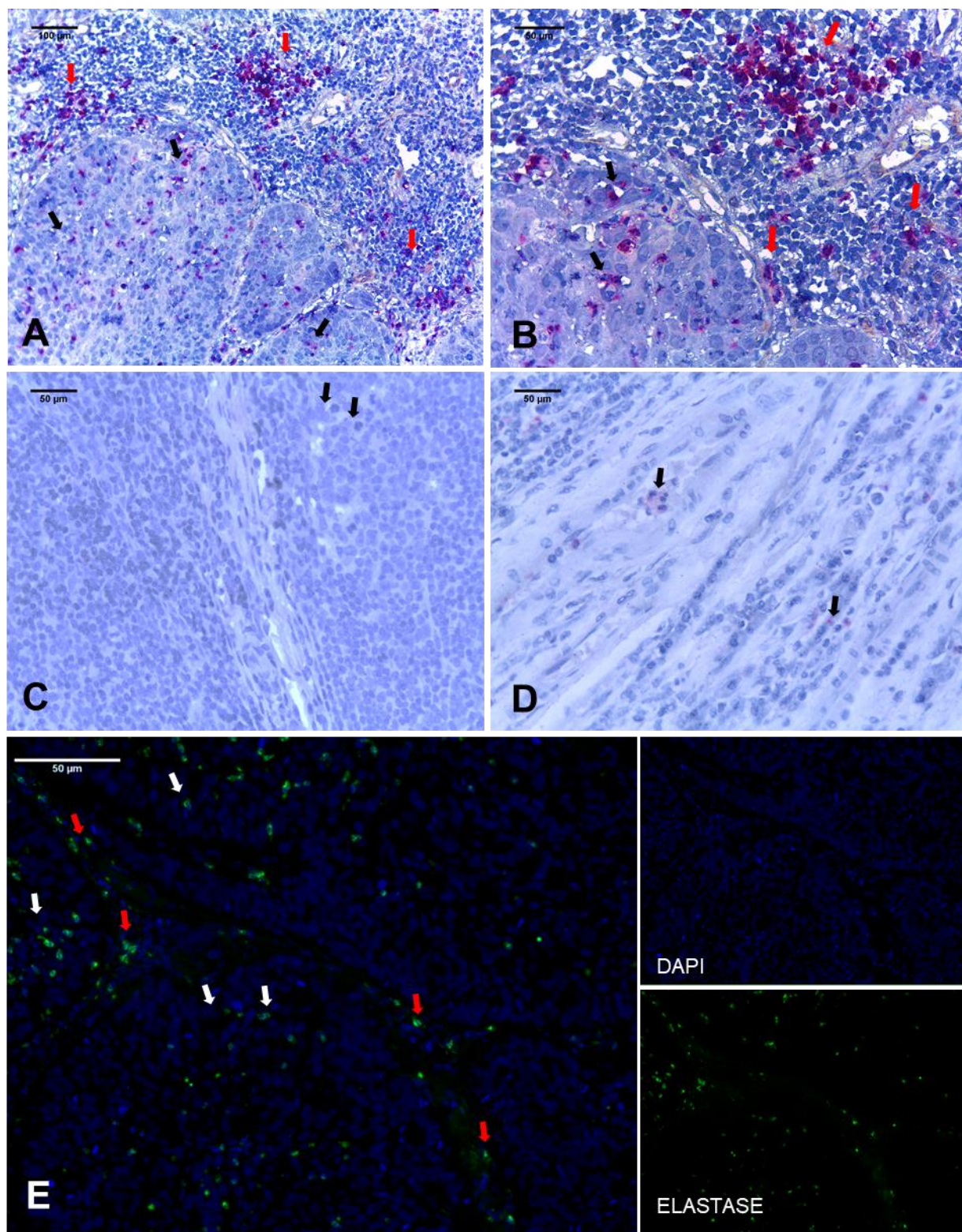


Figura 7 - Neutrófilos associados ao tumor. (A e B) Marcação imuno-histoquímica de neutrófilos intratumorais (setas pretas) e peritumorais (setas vermelhas); (C) controle negativo tonsila: as setas pretas indicam neutrófilos não marcados; (D) controle positivo tonsila: as setas pretas indicam neutrófilos marcados. (E) Neutrófilos intratumorais (setas brancas) e peritumorais (setas vermelhas) marcados por imunofluorescência. Magnificações originais: 200x (A e E) e 400x (B, C e D).

Os neutrófilos foram mais abundantes na região peritumoral (média de 6,43/100 células tumorais). Conforme pode ser observado na figura 8, as médias de neutrófilos, em ambas as regiões, foram comparadas pelo teste t independente, mas não foi encontrada diferença significativa ($p=0,396$).

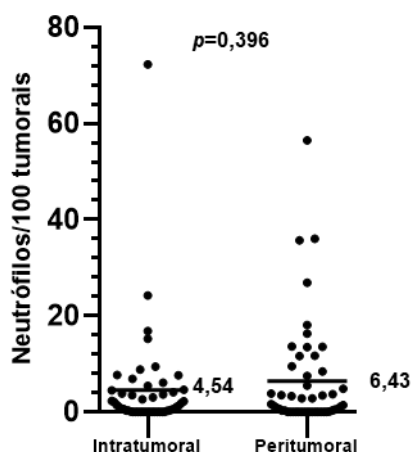


Figura 8 - Comparação das médias dos neutrófilos nos compartimentos intra e peritumoral. Teste T independente ($p=0,396$).

Para análise da associação de TAN com as características clínico-patológicas, os neutrófilos foram categorizados em alto e baixo padrão de infiltração, de acordo com o ponto de corte estabelecido através da curva ROC, relacionando os valores obtidos a fatores prognósticos (tabela 5).

Tabela 5 - Área sob a curva ROC de TAN para cada fator prognóstico avaliado

Fator prognóstico	Neutrófilos intratumorais		Neutrófilos peritumorais	
	AUC (95% IC)	<i>p</i>	AUC (95% IC)	<i>p</i>
Metástase à distância	0,813 (0,678-0,909)	<0,001*	0,822 (0,695-0,950)	<0,001*
Metástase linfonodal	0,580 (0,432-0,718)	0,332	0,561 (0,398-0,723)	0,461
Recidiva	0,597 (0,434-0,745)	0,282	0,678 (0,516-0,839)	0,035
Estado vital	0,564 (0,417-0,704)	0,484	0,512 (0,338-0,686)	0,892
Estadiamento	0,548 (0,400-0,689)	0,644	0,515 (0,317-0,713)	0,884
Tamanho	0,468 (0,304-0,632)	0,719	0,461 (0,295-0,627)	0,664

*Teste de DeLong

Os melhores pontos de corte identificados foram de $>2,2$ para neutrófilos intratumorais e $>3,5$ para os neutrófilos peritumorais, ambos associados à metástase a distância ($p < 0,001$). Na figura 9 estão representadas as curvas ROC dos neutrófilos nos compartimentos intratumoral e peritumoral.

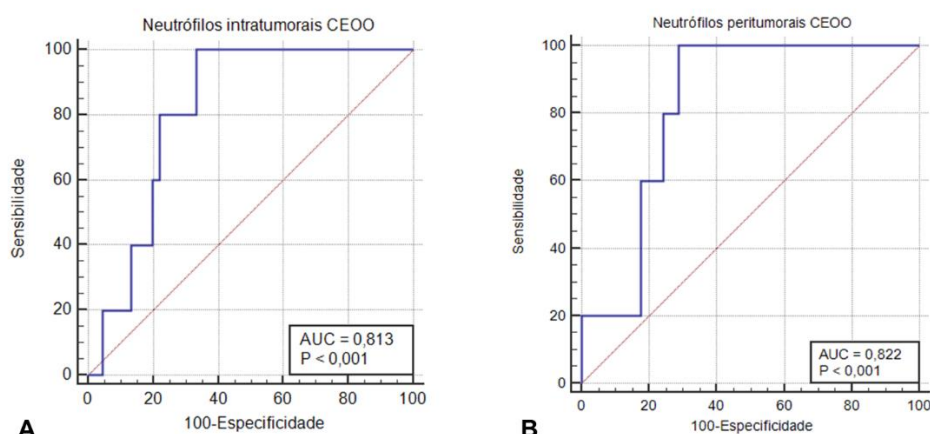


Figura 9 - Curva ROC para neutrófilos intratumorais (A) e peritumorais (B) em pacientes com CEOO. Em (A) ponto de corte: $>2,2$; sensibilidade 100% e especificidade 66,67%. Índice de Youden J: 0,667. AUC (área sob a curva): 0,813. Em (B) ponto de corte: $>3,5$; sensibilidade 100% e especificidade 71,11%. Índice de Youden J: 0,711. AUC (área sob a curva): 0,822.

Associação entre os TAN e as variáveis clínico-patológicas analisadas não foi significativa e estão detalhadas na tabela 6.

Tabela 6 - Associação entre TAN e variáveis clínico-patológicas em CEOO (n=50)

Variáveis clínico-patológicas	Intratumoral					Peritumoral				
	Baixo		Alto		p*	Baixo		Alto		p*
	n=30	%	n=20	%		n=32	%	n=18	%	
Sexo										
Masculino	23	59,0	16	41,0	0,533	23	59,0	16	41,0	0,149
Feminino	7	63,6	4	36,4		9	81,8	2	18,2	
Idade (anos)										
≤ 60 anos	18	62,1	11	37,9	0,475	18	62,1	11	37,9	0,488
> 60 anos	12	57,1	9	42,9		14	66,7	7	33,3	
Sítio										
Cavidade oral	16	50,0	16	50,0	0,050	17	53,1	15	46,9	0,031
Orofaringe	14	77,8	4	22,2		15	83,3	3	16,7	
Tabagismo										
Sim e ex-tabagista	28	60,9	18	39,1	0,528	28	60,9	18	39,1	0,156
Não	2	50,0	2	50,0		4	100	0	0	
Etilismo ^a										
Sim e ex-etilista	27	60,0	18	40,0	0,690	27	60,0	18	40,0	0,095
Não	3	60,0	2	40,0		5	100	0	0	
Tamanho do tumor										
T1/T2	10	66,7	5	33,3	0,380	10	66,7	5	33,3	0,530
T3/T4	20	57,1	15	42,9		22	62,9	13	37,1	
Metástase linfonodal										
N+	14	56,0	11	44,0	0,387	16	64	9	36,0	0,616
N0	16	64,0	9	36,0		16	64	9	36,0	
Estadiamento										
I/II	6	60	4	40	0,635	7	70,0	3	30,0	0,479
III/IV	24	60	16	40		25	62,5	15	37,5	

Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fisher ($p \leq 0,05$)

A correlação entre a presença de TAN e as variáveis histopatológicas está representada na tabela 7. As variáveis descritas não mostraram associação significativa com neutrófilos intra e peritumorais.

Tabela 7 - Associação entre TAN e variáveis histopatológicas em CEOO (n=50)

Variáveis histopatológicas	Intratumoral					p*	Peritumoral					p*
	Baixo		Alto		Baixo		Alto					
	n=30	%	n=20	%	n=32		%	n=18	%			
Padrão de invasão												
I	3	50,0	3	50,0	0,607	3	50,0	3	50,0	0,529		
II	10	66,7	5	33,3		11	73,3	4	26,7			
III	6	42,9	8	57,1		7	50,0	7	50,0			
IV	3	50,0	3	50,0		3	50,0	3	50,0			
Invasão linfática												
Presente	8	61,5	5	38,5	0,273	9	69,2	4	30,8	0,074		
Ausente	4	40,0	6	60,0		3	30,0	7	70,0			
Invasão vascular												
Presente	21	55,3	17	44,7	0,575	23	60,5	15	39,5	0,574		
Ausente	3	50,0	3	50,0		4	66,7	2	33,3			
Invasão perineural												
Presente	6	66,7	3	33,3	0,055	5	55,6	4	44,4	0,286		
Ausente	1	14,3	6	85,7		2	28,6	5	71,4			

^aNão informados: padrão de invasão (n=9); invasão linfática (n=27); invasão vascular (n=6); invasão perineural (n=34).

*Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fisher ($p \leq 0,05$)

O coeficiente de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação de RNL e TAN. Foi encontrada correlação fraca ($r_s=0,137$ $p=0,344$), o que indica que nesta população, o aumento de neutrófilos na corrente sanguínea não reflete o aumento no microambiente tumoral.

4.4 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL

A avaliação do TIL foi realizada em 128 amostras, sendo o padrão moderado de linfócitos infiltrando o tumor encontrado na maioria dos casos (52,3%), seguida de baixo infiltrado linfocitário (31,2%). O padrão do infiltrado linfocitário tumoral foi

classificado como baixo (A e B), moderado (C e D) e alto (E e F) e estão representados na figura 10.

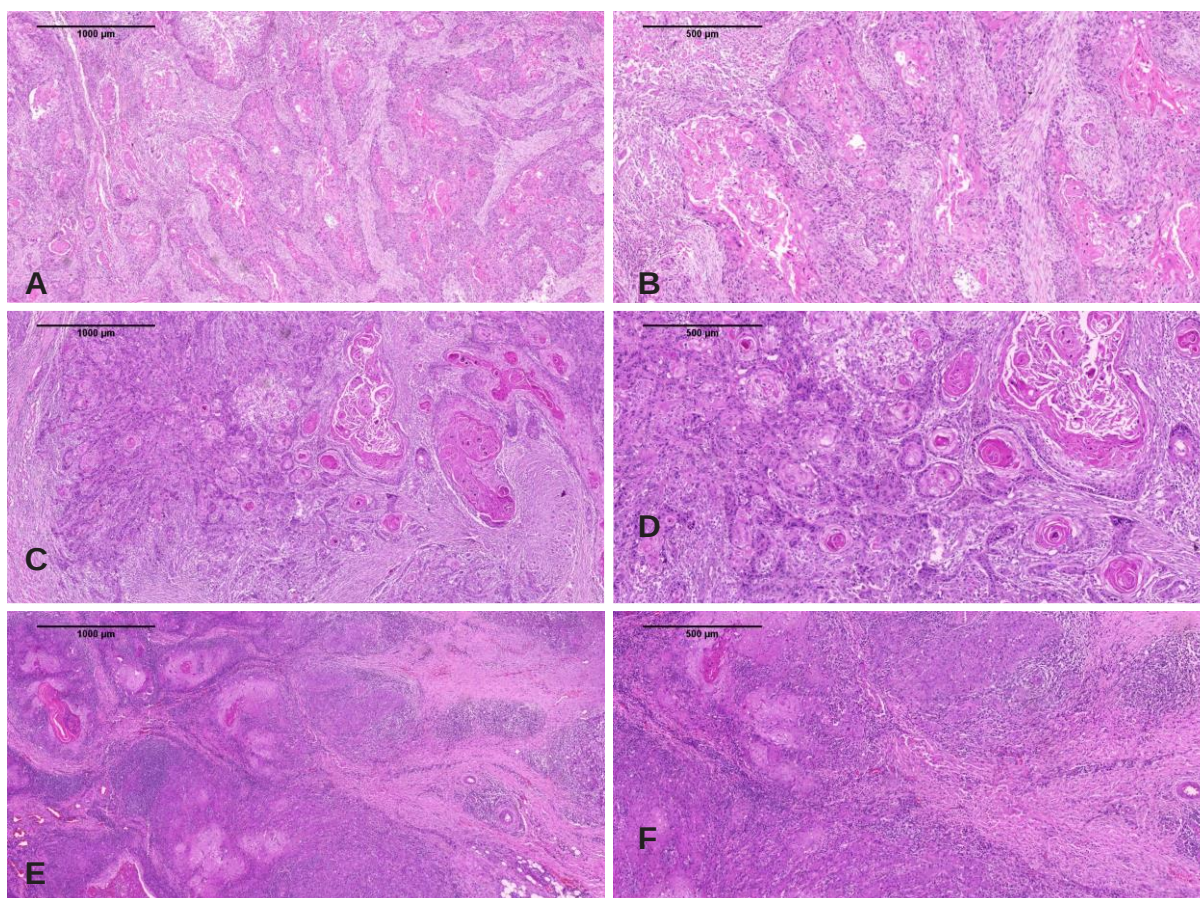


Figura 10 - Fotomicrografia do infiltrado linfocitário tumoral, classificado segundo Marsh et al., 2011. Em A, B padrão de baixo infiltrado linfocitário tumoral; em C e D, moderado em E e F, alto. Coloração HE. Magnificação original: 10x e 20x.

Elevado infiltrado linfocitário tumoral foi correlacionado com idade igual ou superior a 60 anos ($p=0,011$), enquanto baixo infiltrado linfocitário tumoral foi associado a tamanhos de tumor T3 e T4 ($p=0,003$); sítio anatômico de orofaringe ($p<0,001$) e doença avançada ($p=0,001$). A correlação entre o padrão TIL e as variáveis clínico-patológicas está representada na tabela 8.

Tabela 8 - Associações entre TIL e variáveis clínico-patológicas em CEOO (n=128)

Variáveis clínico-patológicas	Baixo		Moderado		Alto		p*
	n=40	%	n=67	%	n=21	%	
Sexo							
Masculino	33	33,3	52	52,5	14	14,1	0,372
Feminino	7	24,1	15	51,7	7	24,1	
Idade (anos)^a							
≤ 60 anos	20	30,3	41	62,1	5	7,6	0,011
> 60 anos	20	32,3	26	41,9	15	25,8	
Sítio anatômico							
Cavidade oral	26	23,6	62	56,9	21	19,3	<0,001
Orofaringe	14	73,7	5	26,3	0	0,0	
Tabagismo^a							
Sim e ex-tabagista	29	39,7	31	42,5	13	17,8	0,089
Não	2	11,8	11	64,7	4	23,5	
Etilismo^a							
Sim e ex-etilista	28	40,0	30	42,9	12	17,1	0,290
Não	2	20,0	7	70,0	1	10,0	
Tamanho do tumor^a							
T1/T2	12	20,0	33	55,0	15	25,0	0,003
T3/T4	26	41,3	33	52,4	4	6,3	
Metástase linfonodal^a							
N+	19	38,0	26	52,0	5	10,0	0,244
N0	18	26,5	37	54,4	13	19,1	
Estadiamento^a							
I/II	6	14,3	24	57,1	12	28,6	0,001
III/IV	31	40,8	39	51,3	6	7,9	

^aNão informados: Idade: (n=1); tabagismo (n=38); etilismo (n=48); tamanho (n=5); metástase linfonodal (n=10); estadiamento (n=10).

*Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fisher ($p \leq 0,05$)

Conforme pode ser observado na tabela 9, a associação entre o padrão de TIL e as características histopatológicas não mostraram associação significativa.

Tabela 9 - Associações entre TIL e variáveis histopatológicas em CEOO (n=128)

Variáveis histopatológicas	Baixo		Moderado		Alto		p*
	n=40	%	n=67	%	n=21	%	
Padrão de invasão							
I	2	12,5	10	62,5	4	25,0	0,130
II	13	32,5	22	55,0	5	12,5	
III	12	25,0	29	60,4	7	14,6	
IV	7	43,8	4	25,0	5	31,3	
Invasão linfática							
Presente	9	24,3	22	59,5	6	16,2	0,641
Ausente	9	20,0	25	55,6	11	24,4	
Invasão vascular							
Presente	27	27,8	50	51,5	20	20,6	0,315
Ausente	6	33,3	11	61,1	1	5,6	
Invasão perineural							
Presente	7	21,2	16	48,5	10	30,3	0,866
Ausente	5	27,8	9	50,0	4	22,2	

^aNão informados: padrão de invasão (n=8); invasão linfática (n=46); invasão vascular (n=13); invasão perineural (n=77).

*Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fisher ($p \leq 0,05$)

4.5 EXPRESSÃO DE PD-L1

Para avaliação da expressão de PD-L1, o padrão de marcação considerado foi membranar e citoplasmático. As células tumorais e inflamatórias (macrófagos e linfócitos) foram contadas para mensuração do CPS. Ao todo, 50 amostras foram analisadas e o valor médio de CPS foi de 18,7. Entre as amostras analisadas, 21 (42%) tinham marcação positiva nas células tumorais e 35 (70%) nas células inflamatórias. A figura 11 representa a expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias.

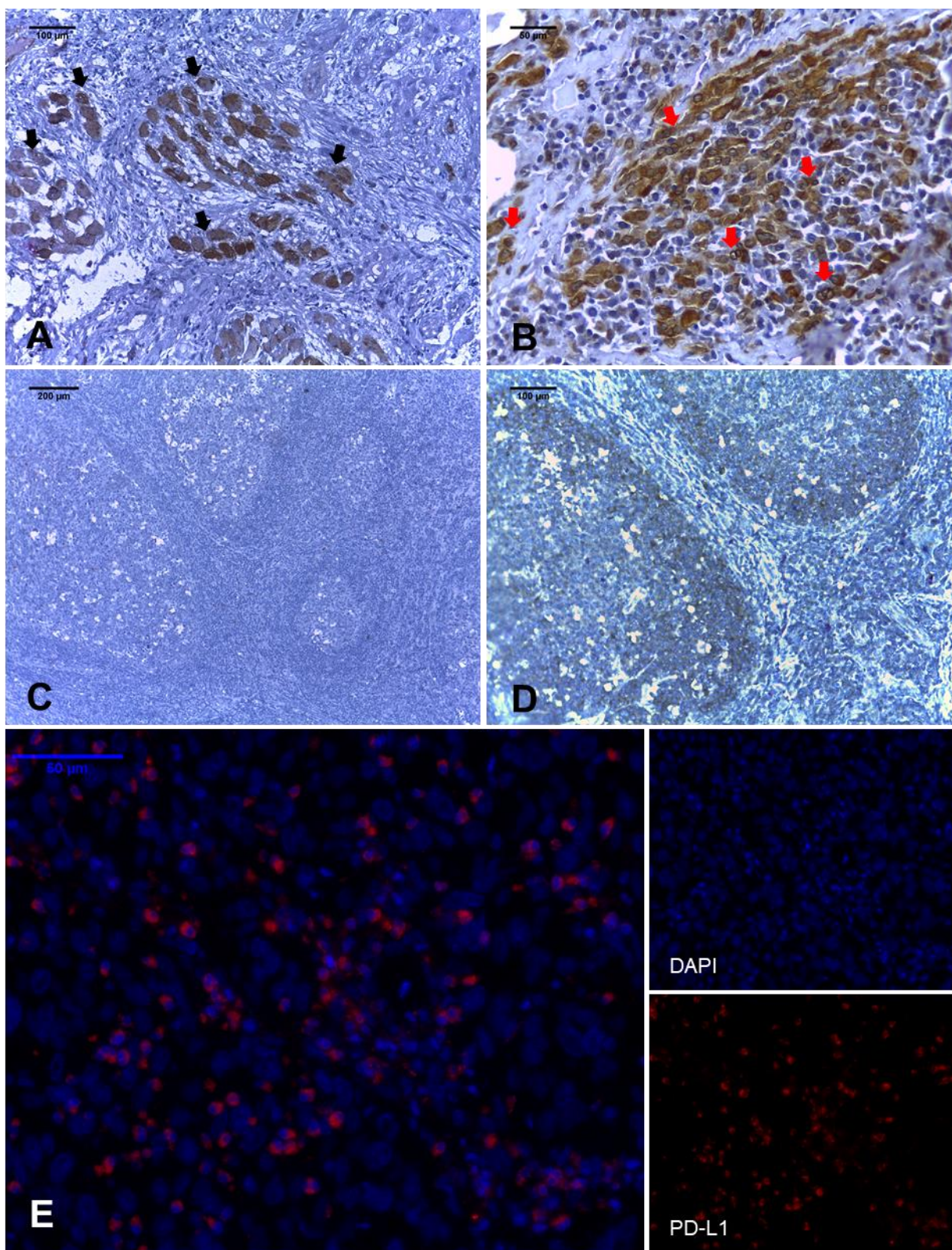


Figura 11 - Expressão de PD-L1. Marcação imuno-histoquímica de PD-L1 nas células tumorais (setas pretas) em A e células inflamatórias (setas vermelhas) em B; (C) controle negativo tonsila; (D) controle positivo tonsila. (E) Células inflamatórias PD-L1 positivas marcadas por imunofluorescência. Magnificações originais: 200x (C) e 400x (A, B, D e E).

Não foi observada associação significativa entre as variáveis clínico-patológicas e a expressão de PD-L1 no tumor e nas células inflamatórias, conforme pode ser observado na tabela 10.

Tabela 10 - Associação entre a expressão de PD-L1 e variáveis clínico-patológicas em CEOO (n=50)

Variáveis clínico-patológicas	<1		1-20		>20		p*
	n=16	%	n=18	%	n=16	%	
Sexo							
Masculino	12	30,8	14	35,9	13	33,3	1,000
Feminino	4	36,4	4	36,4	3	27,3	
Idade (anos)							
≤ 60 anos	8	27,6	11	37,9	10	34,5	0,732
> 60 anos	8	38,1	7	33,3	6	28,6	
Sítio anatômico							
Cavidade oral	13	40,6	10	31,3	9	28,1	0,219
Orofaringe	3	16,7	8	44,4	7	38,9	
Tabagismo							
Sim e ex-tabagista	16	34,8	15	32,6	15	32,6	0,308
Não	0	0,0	3	75,0	1	25,0	
Etilismo							
Sim e ex-etilista	15	33,3	15	33,3	15	33,3	0,600
Não	1	20,0	3	60,0	1	20,0	
Tamanho do tumor							
T1/T2	4	26,7	4	26,7	7	46,7	0,400
T3/T4	12	34,3	14	40,0	9	25,7	
Metástase linfonodal							
N+	8	32,0	8	32,0	9	36,0	0,790
N0	8	32,0	10	40,0	7	28,0	
Estadiamento							
I/II	2	20,0	4	40,0	4	40,0	0,745
III/IV	14	35,0	14	35,0	12	30,0	

*Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fisher ($p \leq 0,05$)

Na tabela 11 estão representadas as análises de associação entre a expressão de PD-L1 e variáveis histopatológicas, no entanto, conforme observado, não foi encontrada associação significativa.

Tabela 11 - Associação entre a expressão de PD-L1 e variáveis histopatológicas em CEOO (n=50)

Variáveis histopatológicas	<1		1-20		>20		p*
	n=16	%	n=18	%	n=16	%	
Padrão de invasão ^a							
I	0	0,0	2	33,3	4	66,7	0,529
II	6	40,0	6	40,0	3	20,0	
III	5	35,7	4	28,6	5	35,7	
IV	2	33,3	2	33,3	2	33,3	
Invasão linfática ^a							
Presente	6	46,2	3	23,1	4	30,8	0,865
Ausente	3	30,0	4	40,0	3	30,0	
Invasão vascular ^a							
Presente	12	31,6	14	36,8	12	31,6	0,863
Ausente	2	33,3	3	50,0	1	16,7	
Invasão perineural ^a							
Presente	3	33,3	2	22,2	4	44,4	0,816
Ausente	1	14,3	3	42,9	3	42,9	

^aNão informados: padrão de invasão (n=9); invasão linfática (n=27); invasão vascular (n=6); invasão perineural (n=34).

*Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fisher ($p \leq 0,05$)

4.6 MICROAMBIENTE INFLAMADO E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

Com a finalidade de estabelecer uma relação entre o infiltrado inflamatório no microambiente tumoral e a inflamação sistêmica, definida pela análise de RNL, os casos foram dicotomizados em: microambiente inflamado e não-inflamado, de acordo com os resultados da expressão de PD-L1 e infiltrado de neutrófilos e linfócitos intra e peritumorais. Para esta categorização foi elaborado um sistema de pontuação, no qual CPS>1, TAN alto e TIL baixo foram considerados 1 ponto cada, e os demais, considerados 0. Os valores foram combinados para determinar a pontuação que variou de 0 a 3. Amostras tumorais com score 0 e 1 foram categorizadas como “não-inflamado” e aquelas com scores 2 e 3 como “inflamados”. O esquema de pontuação está ilustrado no quadro 2.

Quadro 1: Esquema de pontuação para categorização do microambiente inflamado e não-inflamado.

Parâmetros analisados			Score	Grupos
TIL baixo	TAN alto	CPS>1		
1	1	1	3	Microambiente tumoral inflamado
1	1	0	2	
1	0	0	1	Microambiente tumoral não-inflamado
0	0	0	0	

Correlação fraca ($r_s = 0,069$ $p=0,632$) foi observada entre a inflamação sistêmica, representada pela RNL alta, e o microambiente tumoral inflamado.

4.7 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

4.7.1 Sobrevida Global

Ao término do estudo, 92 participantes (46,2%) foram a óbito por CEOO, 5 (2,5%) por outras causas identificadas e 34 (17%) foram censurados. Considerando-se óbito como desfecho final, não houve diferença significativa entre as curvas de sobrevida comparando os sítios cavidade oral e orofaringe (figura 11A), utilizando teste de Long Rank, $p=0,570$.

A presença de metástase linfonodal (N+), tumores T3/T4 e doença avançada (estádios III/IV) foram significativamente associados a pior sobrevida. Pacientes etilistas apresentaram pior prognóstico, com sobrevida global menor, quando comparados aos ex-etilistas e não-etilistas ($p=0,012$). O hábito de fumar também se relacionou a pior sobrevida ($p<0,001$). As curvas de sobrevida segundo metástase linfonodal, tamanho do tumor, estágio clínico, etilismo e tabagismo estão representadas na figura 12.

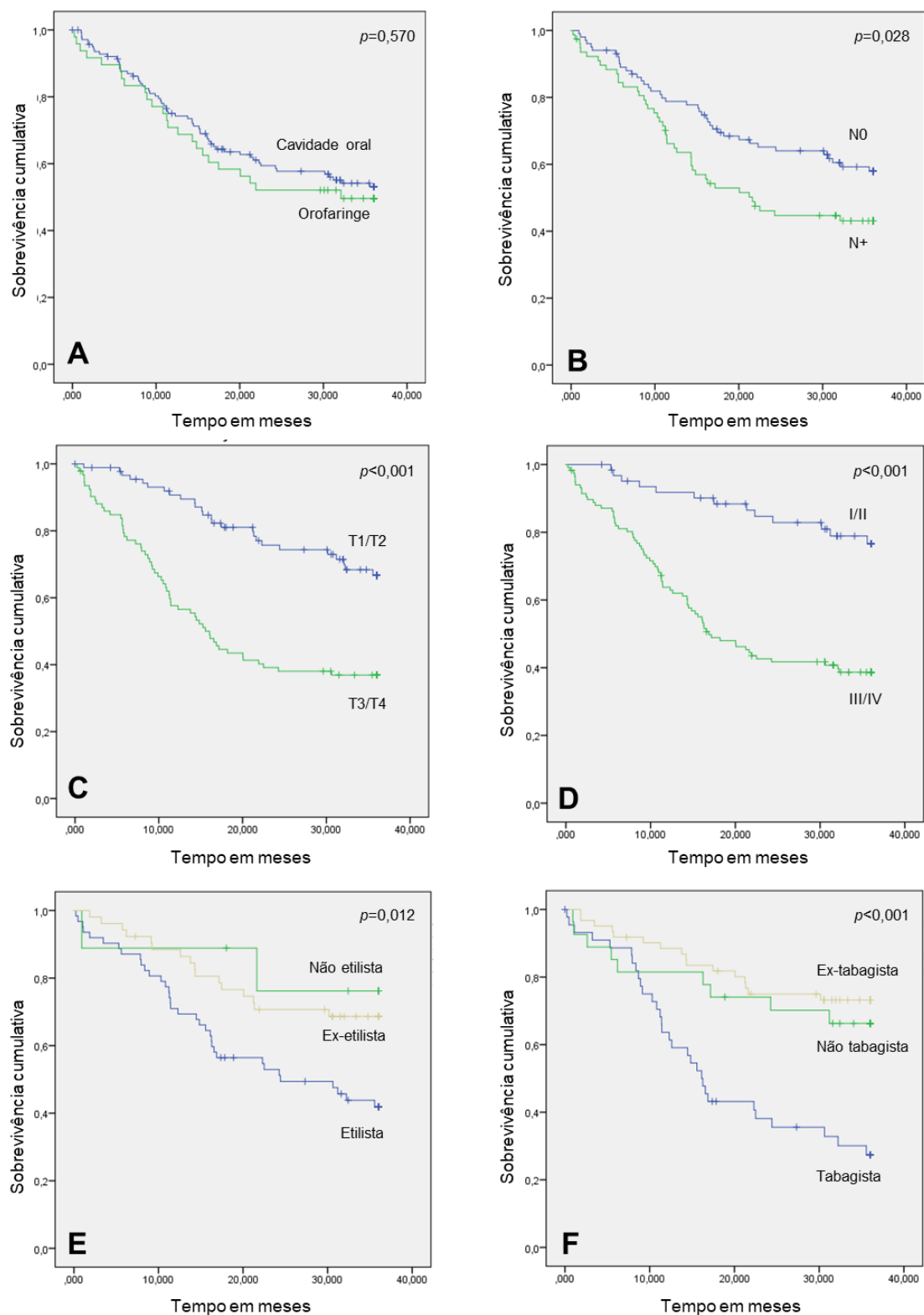


Figura 12 - Curva de Sobrevivência Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo sítio anatômico (A); metástase linfonodal (B); tamanho do tumor primário (C); estágio clínico (D); etilismo (E) e tabagismo (F). N0: ausência de metástase linfonodal; N+: presença de metástase linfonodal; T: tamanho do tumor primário.

Pacientes com RNL alta tiveram sobrevida reduzida quando comparados aos pacientes com RNL baixa. A média de sobrevida de indivíduos com RNL alta foi de 24,21 meses, enquanto que a de indivíduos com RNL baixa foi 27,35. No entanto, esta diferença não foi significativa (figura 13).

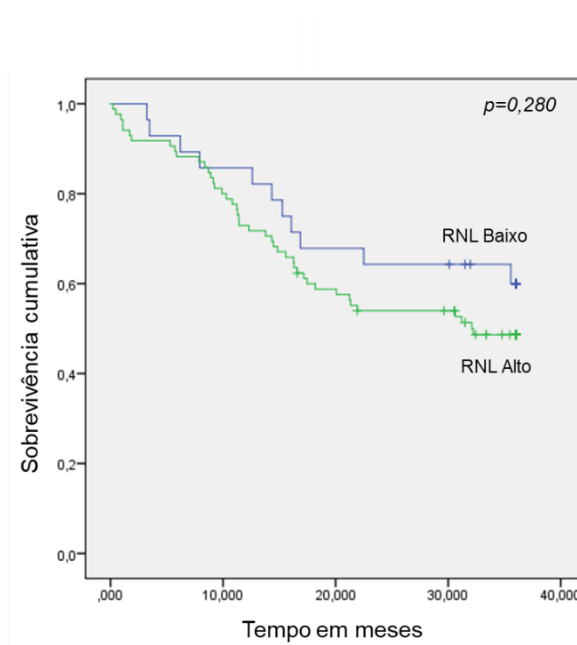


Figura 13 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank, segundo RNL, no período de 36 meses

A SG de indivíduos que apresentaram alta quantidade de neutrófilos no compartimento peritumoral foi um pouco maior (média de 21,17 meses) do que a dos indivíduos com baixa quantidade (média de 19,92 meses) (figura 14A). Em contraste, indivíduos com elevada infiltração de neutrófilos na região intratumoral tiveram sobrevida menor, porém com pouca diferença na média (20,77 x 19,74 meses) (figura 14B). Em ambos os casos, não houve diferença significativa.

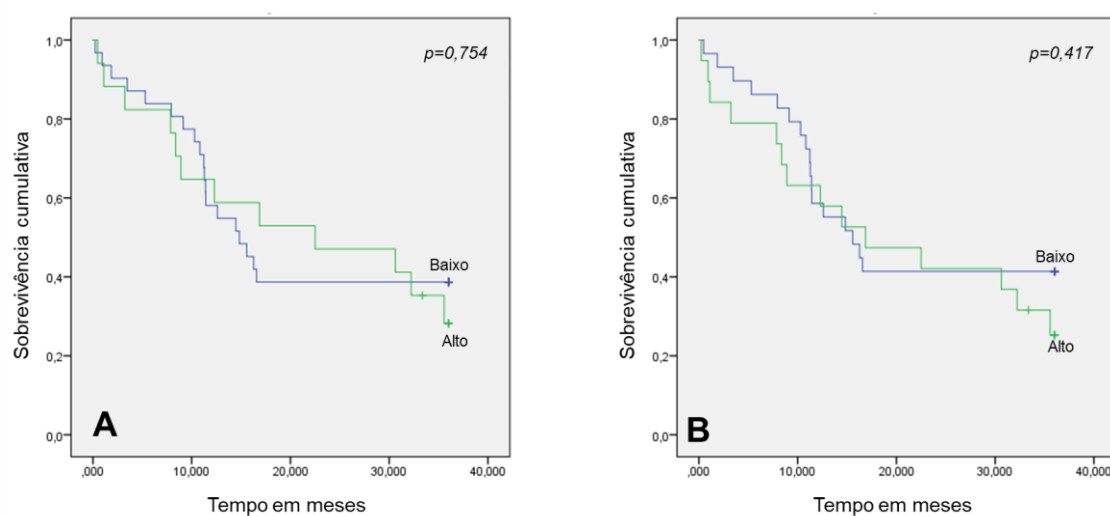


Figura 14 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo TAN. Em A neutrófilos intratumorais e em B neutrófilos peritumorais.

O padrão de infiltração linfocitária não se mostrou significante com os índices de sobrevida, conforme ilustrado na figura 15 ($p=0,183$).

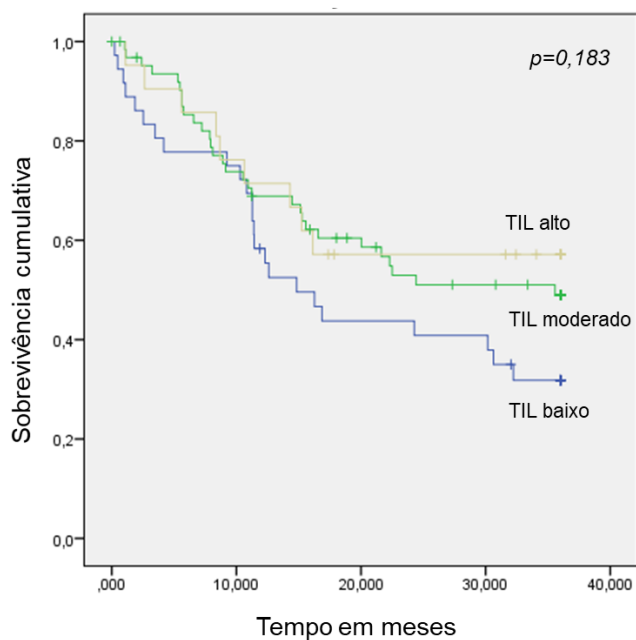


Figura 15 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação ao TIL.

Apesar de a expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias não ter sido associada à sobrevida, conforme observado na figura 16A, quando consideramos o microambiente tumoral, a SG de pacientes com microambiente inflamado foi menor ($p=0,016$), conforme apresentado na figura 16B.

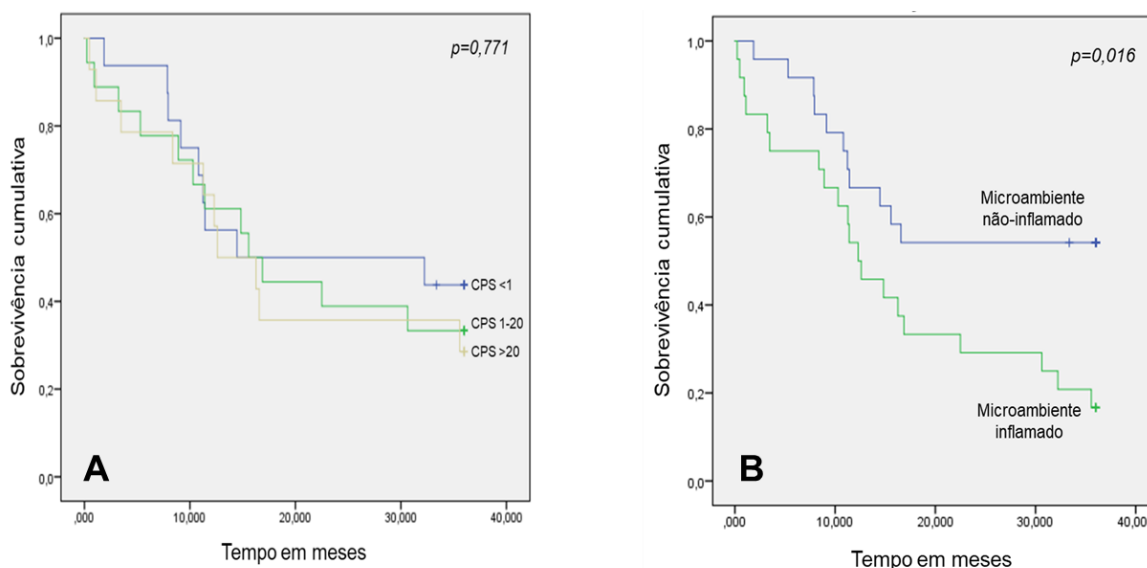


Figura 16 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias (CPS), em (A) e em função do microambiente tumoral, em (B).

4.7.2 Sobrevida Livre de Doença

Para o cálculo da sobrevida livre de doença foram considerados recidiva local, regional ou à distância como desfecho final. Setenta e oito casos (44,3%) evoluíram com recorrência da doença.

A recorrência da doença foi associada à presença de comprometimento linfonodal ($p=0,036$), estadiamento avançado ($p<0,001$) e tamanho T3/T4 ($p=0,003$) ao diagnóstico e também ao consumo de álcool no passado ($p=0,016$). Não foi observada diferença nas curvas de sobrevida livre de doença comparando os sítios anatômicos e o hábito de fumar. A figura 17 ilustra a SLD em função dos fatores de prognóstico descritos.

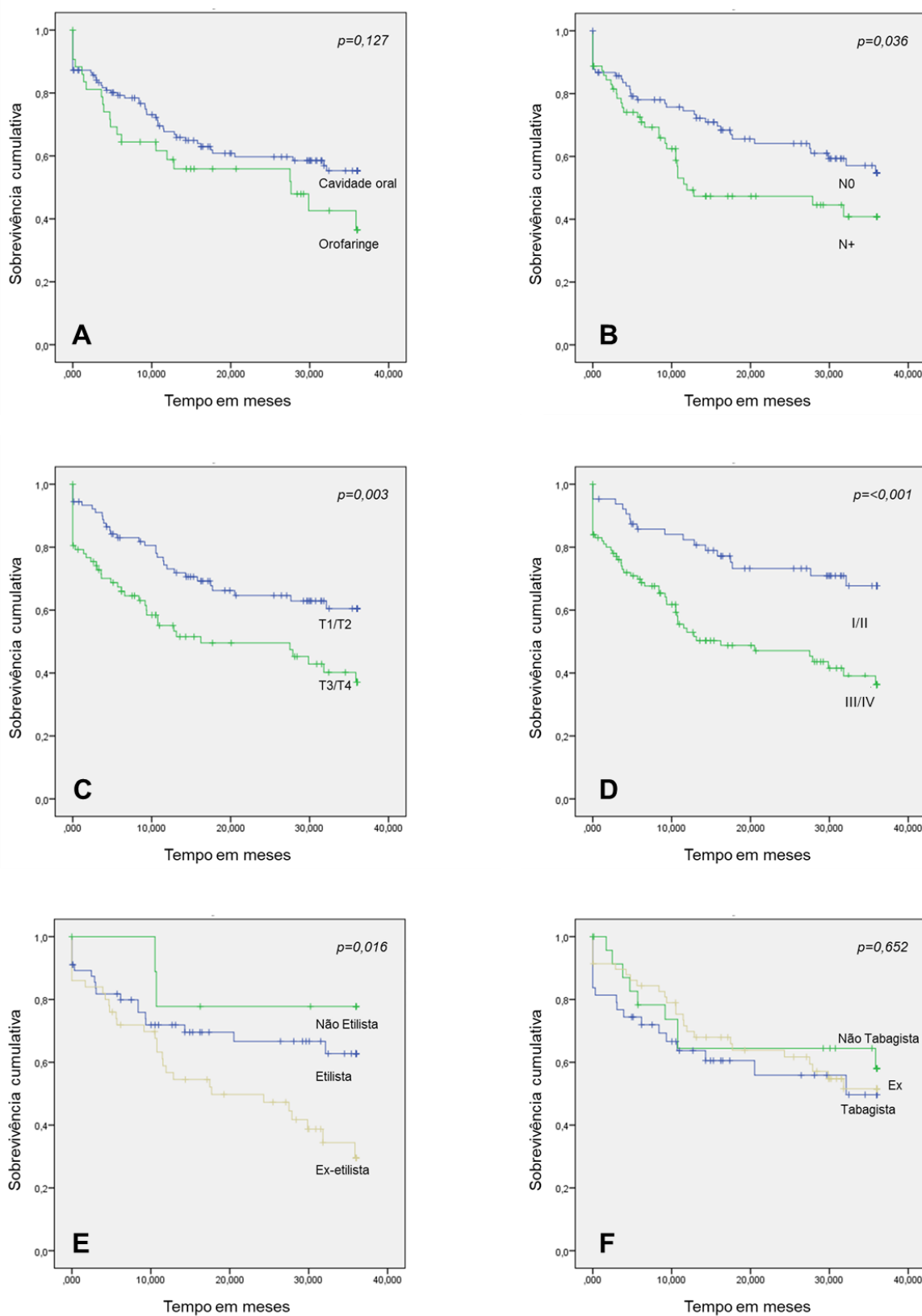


Figura 17 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo sítio anatômico (A); comprometimento linfonodal (B); tamanho do tumor (C); estágio clínico (D); etilismo (E) e tabagismo (F). N0: ausência de metástase linfonodal; N+: presença de metástase linfonodal; T: tamanho do tumor primário.

Não foi observada diferença significativa entre as curvas de SLD de indivíduos com baixa e alta RNL ($p=0,857$), conforme mostrado na figura 18.

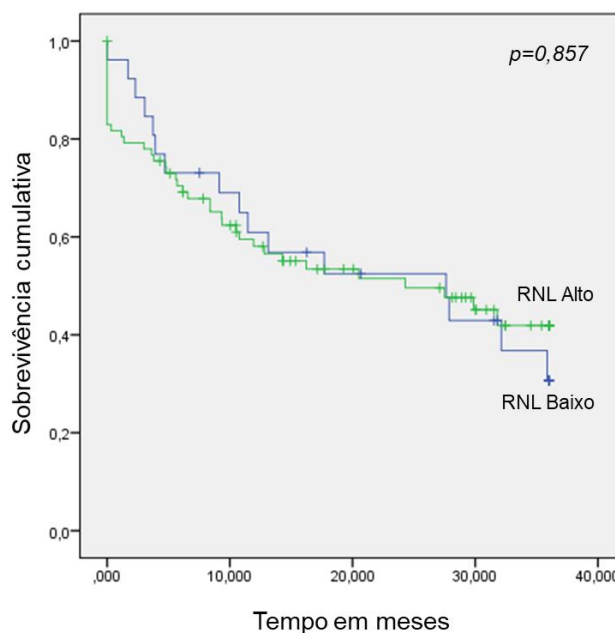


Figura 18 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo RNL.

A elevada infiltração de neutrófilos no compartimento peritumoral se relacionou à menor SLD ($p=0,011$). Indivíduos com neutrófilos peritumorais baixos tiveram SLD média de 25,54 meses, enquanto em indivíduos com quantidade elevada a média foi de 15 meses.

A SLD de indivíduos com alta quantidade de neutrófilos intratumorais também foi menor (média de 18,34 meses), quando comparada com baixa quantidade (média 23,66), no entanto, não foi observado diferença significativa. A figura 19 ilustra as curvas SLD em função dos neutrófilos intratumorais (19A) e peritumorais (19B).

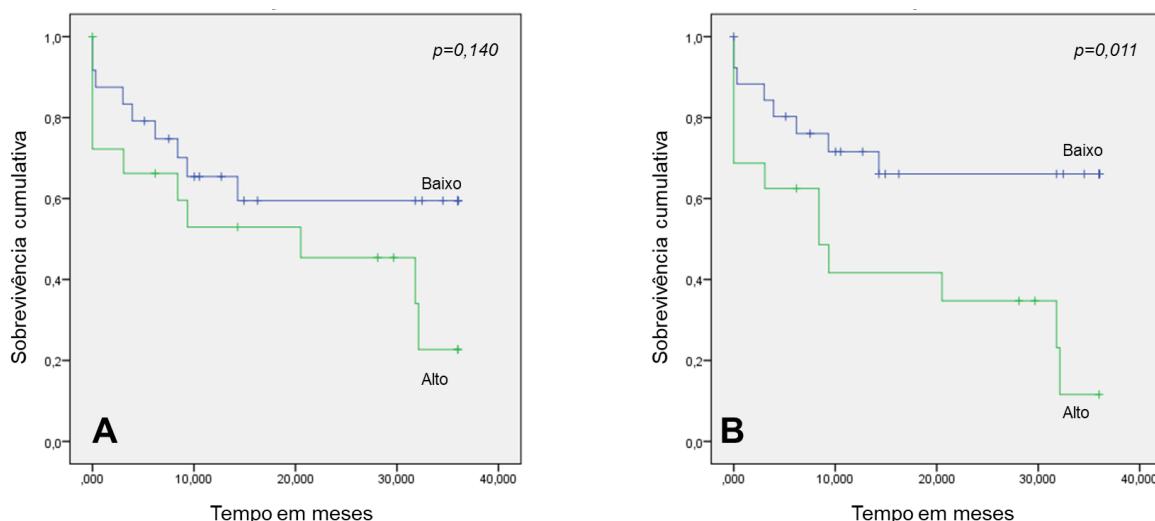


Figura 19 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo neutrófilos associados ao tumor. Em A neutrófilos intratumorais e em B neutrófilos peritumorais.

Não foi observada associação significativa entre o padrão do infiltrado linfocitário (figura 20A) e expressão de PD-L1 (figura 20B) com os índices de SLD ($p=0,269$ e $p=0,449$, respectivamente).

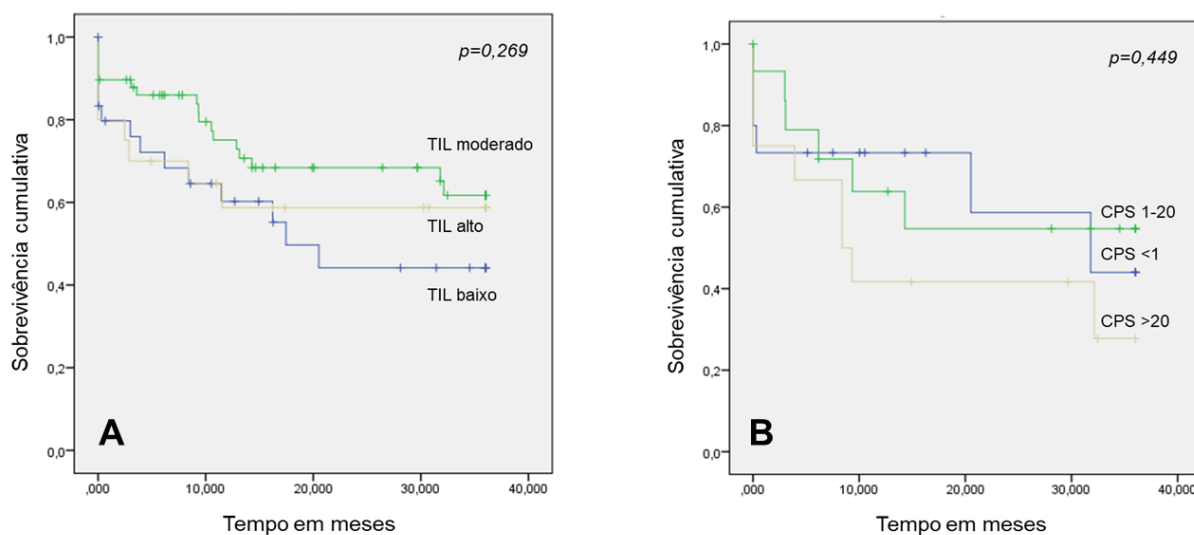


Figura 20 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação ao infiltrado linfocitário tumoral (TIL) (A) e expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias (CPS) (B).

Indivíduos com microambiente inflamado tiveram SLD média de 17 meses, enquanto que o não-inflamado apresentou média de 25 meses, no entanto, esta diferença não foi significativa (figura 21).

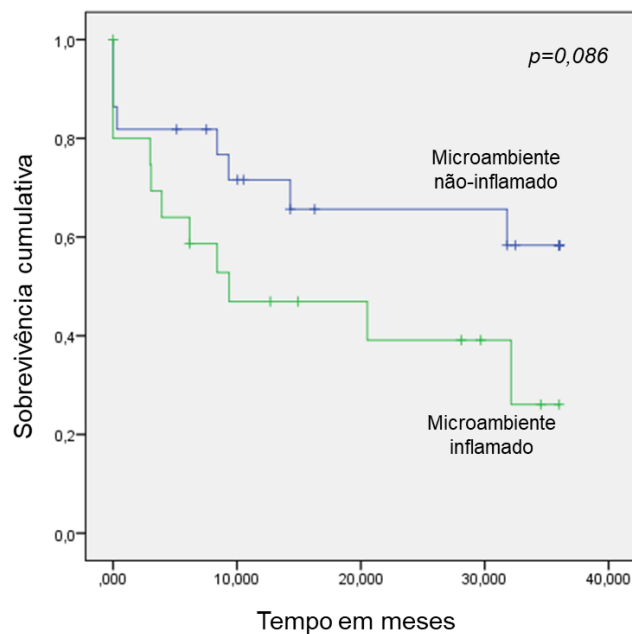


Figura 21 - Curva de Sobrevivência Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo características do microambiente tumoral.

5 DISCUSSÃO

O CEOO é uma doença que atinge mais frequentemente homens com idade avançada, em nosso estudo, no entanto, observamos uma frequência maior de indivíduos mais jovens (com idade inferior a 60 anos). Embora a idade avançada seja considerada um fator de risco para CEOO, tem sido observado um aumento na incidência desses tumores em indivíduos mais jovens (PATEL et al., 2011; CHANDRA et al., 2013).

O tabagismo e etilismo são hábitos frequentes nos pacientes acometidos por CEOO, neste estudo 79,7% dos indivíduos eram tabagistas ou ex-tabagistas e apenas 8% dos indivíduos nunca haviam consumido álcool. A etiologia do CEOO é multifatorial e a exposição ao álcool e tabaco é um dos fatores de risco mais importantes para o seu desenvolvimento. Nossos resultados mostraram que indivíduos tabagistas e etilistas tiveram SG e SLD reduzidas, o que está em concordância com o que é documentado na literatura (MAYNE et al., 2009; KUMAR et al., 2016).

No presente estudo, 51,1% dos casos selecionados foram diagnosticados com estadio avançado. Tamanho do tumor (T3/T4), comprometimento linfonodal e estadio clínico avançado diminuíram significativamente a SG e SLD. O prognóstico destes tumores em estádios iniciais é bom, no entanto, a grande maioria é diagnosticada em estadio avançado e necessita de intervenções terapêuticas mais intensificadas que podem não ser efetivas (CADONI et al., 2017). Isto reforça a importância do sistema TNM de estadiamento clínico como sendo o melhor indicador de prognóstico em CCP no momento, apresentando também relevância clínica para direcionar a conduta terapêutica. No entanto, o sistema TNM apresenta algumas limitações em determinar a resposta ao tratamento, tendo o CCP uma baixa sobrevida devido à resistência ao tratamento, às recidivas e metástases à distância (MARCU et al., 2018). Desta forma, o estudo de marcadores que possam prever essas ocorrências têm sido cada vez mais explorados.

Com este intuito, neste estudo investigamos o potencial prognóstico de marcadores da resposta inflamatória em CEOO. Estudos têm mostrado que a inflamação sistêmica afeta negativamente o prognóstico de pacientes com câncer. Isto deve-se em parte

ao aumento de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, que produzem citocinas pró-inflamatórias, fatores angiogênicos e de crescimento que contribuem para o crescimento tumoral, invasão e metástase (COUSSENS; WERB, 2002; MULTHOFF et al., 2012; KORNILUK et al., 2017). O estado inflamatório também debilita o organismo, levando à fadiga, perda de peso e desnutrição, fatores que comprometem a qualidade de vida e reduzem a sobrevida (MOORE et al., 2010; ZHOU, T. et al., 2019). Ademais, a inflamação sistêmica crônica pode levar à exaustão celular um dos mecanismos de evasão da resposta imunológica (CHARLES et al., 2016).

Neste estudo, investigamos o potencial prognóstico da RNL, um marcador inflamatório sistêmico. A RNL tem sido utilizada para mensurar a resposta inflamatória sistêmica e indicar a relação entre a resposta imune inata e adaptativa. O aumento da RNL indica neutrofilia e linfocitopenia relativa e está comumente associado a pior prognóstico e sobrevida reduzida em diversos tipos de câncer. Nossos resultados mostraram que o aumento da RNL não impactou significativamente na sobrevida em pacientes com CEOO. No entanto, foi associado a tumores com tamanhos maiores e estadios avançados, o que também foi observado em outros estudos (NAKASHIMA et al., 2016; MALIK et al., 2019).

A RNL aumentada pode refletir no comportamento tumoral uma vez que a resposta inflamatória sistêmica aumentada pode estabelecer um microambiente tumoral mais inflamado que suprime a ação citotóxica dos linfócitos T e favorece um comportamento mais agressivo do tumor (GUTHRIE et al., 2013; NAKASHIMA et al., 2016; PHULARI et al., 2019). Os neutrófilos inibem a proliferação de linfócitos T através da liberação de arginase e pela via de sinalização PD-1/PD-L1, estando o grau de supressão diretamente associado à quantidade dessas células. Além disso, os neutrófilos secretam fatores de crescimento, citocinas, proteases e metaloproteinases que remodelam a matriz extracelular, favorecendo a migração de células endoteliais e dissociação de células tumorais (NAKASHIMA et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Além disso, tumores maiores frequentemente apresentam lesões ulceradas e grandes regiões com área central necrótica e infecções bacterianas concomitantes, o que pode levar ao aumento dos níveis de neutrófilos circulantes (PIRES et al., 2013).

consumo de álcool e tabaco o que corrobora com outros estudos que demonstraram que exposição a ambos fatores de risco promovem um fenótipo imunossupressor, característica marcante do CCP (SHARP et al., 2014; SHIELS et al., 2014; BAI et al., 2019).

Em tumores de orofaringe, além do álcool e tabaco, o HPV pode participar da carcinogênese e o prognóstico dos pacientes HPV-positivos é diferente dos demais. Em geral, esses tumores respondem melhor ao tratamento radioquimioterápico e os pacientes apresentam maior sobrevida comparados àqueles com tumores HPV-negativos. Assim como a patogênese, o perfil imunológico dos tumores de orofaringe HPV-positivo é diferente. Tem sido mostrado que o valor prognóstico da RNL pode diferir de acordo com *status* HPV nos tumores de orofaringe. No estudo de Huang e colaboradores (2015), a RNL foi significativamente menor em pacientes com tumores de orofaringe HPV-positivos, enquanto Rachid e cols. (2016) identificaram que a RNL perdeu o significado prognóstico na análise multivariada, quando o *status* HPV foi adicionado.

Embora a resposta sistêmica possa influenciar no microambiente tumoral, no presente estudo o aumento da RNL não se relacionou ao aumento de neutrófilos associados ao tumor e ao microambiente inflamado, conforme observado na análise de correlação de Spearman. A inflamação sistêmica pode estimular a formação de um microambiente tumoral inflamado e imunossuprimido, no entanto, os níveis de citocinas, fatores de crescimento e células inflamatórias no sangue periférico não necessariamente refletem a concentração do infiltrado inflamatório no tumor (ASTRADSSON et al., 2019).

Quando avaliamos a distribuição do infiltrado de neutrófilos nos compartimentos intra e peritumoral, observamos que a quantidade de neutrófilos em ambas as regiões não diferiu significativamente, embora a infiltração de neutrófilos tenha sido maior no compartimento peritumoral. Este achado corrobora com os resultados encontrados por Li et al (2019), embora a infiltração neutrofílica no espaço intratumoral seja relatada mais frequentemente (WANG, N. et al., 2014; CALDEIRA et al., 2015).

Em nosso estudo os TAN não se relacionaram com as variáveis clínico-patológicas avaliadas, no entanto, comparando os sítios anatômicos, observamos que a cavidade

bucal apresentou maior infiltração de TAN em ambos os compartimentos. A cavidade bucal apresenta naturalmente elevada população de neutrófilos, que são de suma importância para manutenção da saúde bucal. O biofilme induz o recrutamento constante de neutrófilos para a cavidade bucal, onde atuam na vigilância imunológica, isto pode justificar o aumento de neutrófilos identificados neste sítio (URIARTE et al., 2016).

Ademais, estudos mostram que pacientes com carcinoma epidermoide oral apresentam má condição bucal, com baixa frequência de visitas ao dentista e baixa frequência de escovação. Deste modo, é comum que a maioria dos pacientes apresente alguma afecção bucal, como gengivite, periodontite, cáries extensas, dentre outros (REZENDE et al., 2008; LEMOS JUNIOR et al., 2013), o que também pode explicar a maior infiltração de neutrófilos encontrada nesse sítio.

Nossos resultados mostraram que o aumento de TAN na região peritumoral está relacionada com menor sobrevida global em pacientes com CEOO. Em grande parte dos estudos, os neutrófilos intratumorais têm sido mais frequentemente associados a pior sobrevida, quando comparados aos neutrófilos peritumorais (SHEN et al., 2014). Tem sido demonstrado que o fenótipo e função dos neutrófilos são heterogêneos no tumor, e podem diferir de acordo com o compartimento tumoral no qual estão localizados (HE et al., 2015).

Mishalian e colaboradores (2013) demonstraram que em tumores de pulmão induzidos em modelo animal, nos estágios iniciais os neutrófilos peritumorais exibem um fenótipo anti-tumorigênico (N1). À medida que o tumor cresce, essas células tornam-se pró-tumorigênicas (N2) e migram para o compartimento intratumoral. Esta polarização do fenótipo N1 para N2 já foi observada em outros tumores sólidos (FRIDLENDER et al., 2009; SAGIV et al., 2015), no entanto, em CEOO este processo, bem como sua relação com a localização nos compartimentos tumorais, tem sido pouco explorado.

Em outros tipos de câncer foi demonstrado que neutrófilos que infiltram o espaço peritumoral podem exibir um fenótipo ativado e estarem relacionados a um pior prognóstico. No estudo de Kuang et cols. (2011) neutrófilos peritumorais foram a principal fonte de MMP9, sendo mais participativos nos processos de invasão e

angiogênese dos que os neutrófilos intratumorais. Já He et al. (2015) identificaram neutrófilos peritumorais com elevada expressão de PD-L1 sugerindo sua participação na imunossupressão do microambiente tumoral mediada pela via PD-1/PD-L1 em carcinoma hepatocelular.

Ainda existem poucos estudos sobre o fenótipo de neutrófilos associados ao tumor em CEOO. Estudos mais recentes mostraram que os neutrófilos periféricos associados ao tumor tendem a exibir um comportamento pró-tumorigênico (CALDEIRA et al., 2017), embora não haja nenhum estudo demonstrando diferenças nesses fenótipos em diferentes compartimentos tumorais. Em outros estudos, elevada infiltração de neutrófilos tem sido associada a desfechos ruins em CEOO. Trellakis e colaboradores (2011) demonstraram que TAN está associada a menor sobrevida em CCP. Caldeira et al. (2015) mostraram que tumores avançados (T3/T4) exibem maior infiltração de neutrófilos em carcinoma epidermoide oral. Já no estudo de Wang e cols. (2014) TAN foi associado a doença avançada, metástase e maiores chances de recorrência em tumores de língua. Achados semelhantes são descritos por Li et al., (2019) em carcinoma epidermoide oral. No entanto, neste estudo, TAN também estava associada a RNL aumentada e ao *status* HPV, com tumores HPV-negativos apresentando maior infiltração de neutrófilos, possivelmente pela secreção aumentada de IL-8.

A infiltração de linfócitos no tumor, por outro lado, está associada a melhores desfechos. Pacientes com tumores em estadios precoces e sem histórico de tabagismo têm elevada infiltração de linfócitos e maior SG e SLD. Em contrapartida, tumores com baixo TIL são mais agressivos e comumente estão associados a estadios avançados e comprometimento linfonodal (ZANCOPE et al., 2010; DE MEULENAERE et al., 2017).

No presente estudo, utilizamos a classificação proposta por Marsh e colaboradores (2011) que categoriza o TIL em alto, moderado e baixo. Nesta classificação não é realizada a distinção entre os subtipos de linfócitos. Ward e colaboradores (2014) demonstraram que a quantificação das subpopulações de linfócitos por imuno-histoquímica não superou o método de classificação proposto por Marsh e cols. para prever a sobrevida em pacientes com tumores da orofaringe, o que sugere que esta

avaliação semi-quantitativa pode ser facilmente aplicada como um biomarcador de prognóstico com baixo custo e facilmente acessível para inclusão na rotina clínica.

Em nossas análises, TIL baixo foi associado a tumores maiores e doença avançada. Achados semelhantes foram encontrados em CEOO por Wolf et cols. (2015) e Cho et al., (2011). Um elevado infiltrado linfocitário em tumores menores (T1/T2) sugere que o papel supressor dos linfócitos pode ser mais importante no crescimento inicial do câncer (WOLF et al., 2015).

O TIL participa do controle do crescimento de tumores através das células T citotóxicas. No entanto, a interação entre os linfócitos T e as células tumorais pode levar ao processo de imunoeedição, que constitui um importante mecanismo de evasão à resposta imunológica e permite o crescimento tumoral até um estágio clinicamente detectável (EEROLA et al., 2000; TORREZINI; ATHANAZIO, 2008; BREMNES et al., 2016).

Em nosso estudo foi observado que o padrão do TIL diferiu significativamente entre os sítios anatômicos ($p < 0,001$), tendo os tumores de orofaringe apresentado predominantemente TIL baixo. O número de linfócitos infiltrando o tumor, bem como sua função e localização no microambiente tumoral, difere de acordo com a extensão e localização do tumor. Em geral tumores de orofaringe exibem elevada infiltração de linfócitos devido à proximidade dos tecidos linfoides normais e à participação do HPV na carcinogênese (WANSOM et al., 2012; GREEN et al., 2013; WARD et al., 2014; NGUYEN et al., 2016).

Os tumores de orofaringe selecionados em nosso estudo, no entanto, além de não terem o status HPV disponível, são provenientes de indivíduos predominantemente mais jovens (abaixo de 60 anos) e tabagistas. Ambos fatores se correlacionam com baixos níveis de TIL, o que pode justificar esse achado. Portanto, a ausência do *status* HPV nas amostras de orofaringe é uma limitação deste estudo, uma vez que a análise de marcadores inflamatórios tem diferido entre os grupos HPV-positivos e negativos. Sugere-se que novas análises devem ser realizadas neste grupo, considerando o *status* HPV.

Embora o hábito de fumar não tenha se associado a baixos níveis de TIL em nossas análises, estudos mostraram que em pacientes HPV-positivos, menor infiltração de linfócitos e tabagismo foram bons preditores de mortalidade (WARD et al., 2014).

Em nossas análises de sobrevivência, o tempo de SG e SLD de indivíduos com diferentes níveis de TIL não diferiram significativamente. Em outros estudos, no entanto, elevada infiltração de linfócitos no tumor foi associada a maior tempo de sobrevida (WARD et al., 2014; WOLF et al., 2015; BROOKS et al., 2019). Foi demonstrado que pacientes com alto nível de TIL respondem melhor à quimio e radioterapia (BALERMPAS et al., 2014).

Embora o TIL se correlacione a um prognóstico favorável em diversos tipos de tumores, as células tumorais e o próprio microambiente podem induzir defeitos funcionais nos TIL. A expressão de moléculas imunossupressoras, como o PD-L1 é um dos principais mecanismos destas alterações (CHO et al., 2011).

A elevada expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias tem sido correlacionada a pior sobrevida e comprometimento linfonodal em CEOO (LI, J. et al., 2017; MÜLLER et al., 2017; STRATI et al., 2017; MARUSE et al., 2018). No entanto, alguns estudos relataram um valor prognóstico favorável da alta expressão de PD-L1. Hanna e colaboradores (2018) mostraram que maior expressão de PD-L1 foi associada a maior sobrevida em mulheres jovens com carcinoma epidermoide oral. Kim e cols. (2016), por sua vez, também relataram que a expressão de PD-L1 nas células inflamatórias foi associada a maior sobrevida. Estudos prévios realizados por nosso grupo mostraram que a expressão de PD-L1 foi associada a melhor prognóstico, principalmente quando avaliada nas células tumorais e inflamatórias de forma combinada (BROOKS et al., 2019).

No grupo amostral analisado em nosso estudo, a expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias não mostrou impacto prognóstico. Em outros estudos a expressão de PD-L1 não foi associada às características clínico-patológicas analisadas. Os resultados conflitantes refletem a complexidade das interações entre as células tumorais e o sistema imunológico. Kim et al. (2016) também atribuem os resultados inconsistentes à falta de padronização analítica, como variabilidade do observador, emprego de anticorpos não padronizados e valores de corte diferentes.

No presente estudo, optamos por adotar o CPS e os valores de corte de 1% e 20%. Estes pontos de corte foram definidos a partir do ensaio clínico KEYNOTE 048, o qual avalia a aplicação de pembrolizumabe isolado ou associado à quimioterapia para tratamento de primeira linha de CCP metastático (RISCHIN et al., 2019). A expressão de PD-L1 tem sido reportada nas células tumorais e inflamatórias pelo método de *H-score*, pela porcentagem de células tumorais marcadas (TPS) e pela combinação de células tumorais e inflamatórias marcadas (CPS). Devido ao aumento de imunoterápicos disponíveis, o método de leitura bem como o valor de corte para avaliar a expressão de PD-L1 tem sido amplamente estudado e ainda não há um consenso. A análise da expressão de PD-L1 pode produzir resultados diferentes devido às técnicas analíticas aplicadas, a qualidade do material e ainda, a heterogeneidade intratumoral podendo variar de acordo com a região do tumor (RASMUSSEN et al., 2019).

O CPS mostrou-se superior ao TPS na predição pacientes responsivos às terapias de bloqueio de check-points imunológicos em diversos tipos de câncer. Em tumores de cabeça e pescoço, pembrolizumabe e nivolumabe foram aprovados em 2016 para uso como terapia de segunda linha em câncer metastático ou recorrente e, em 2019, o pembrolizumabe foi aprovado para uso como terapia de primeira linha. A decisão terapêutica, nesse caso, tem sido guiada pelo nível de expressão de PD-L1 representado pelo CPS. No ensaio clínico KEYNOTE 048, indivíduos CCP metastático que apresentam $CPS \geq 20$ têm melhores resultados com o uso de pembrolizumabe isolado como tratamento de primeira linha, enquanto os que apresentam $CPS \geq 1$ podem se beneficiar mais com seu uso associado à quimioterapia (KULANGARA et al., 2018; PAINTAL; BROCKSTEIN, 2019; RISCHIN et al., 2019).

Em nosso estudo, 32% dos indivíduos apresentaram $CPS < 1\%$, no entanto, grande parte das amostras foram obtidas por biópsia incisional e tem sido recomendado que a avaliação de PD-L1 seja realizada em fragmentos de peça cirúrgica.

Paintal e Brockstein (2019) compararam a pontuação de CPS obtida em biópsias incisionais e excisionais e demonstraram que o ponto de corte de 1% apresentou elevada quantidade de falsos negativos. Estes resultados sugerem que tumores PD-L1 negativos obtidos em pequenos fragmentos de biópsia devem ser repetidos em

blocos ou amostras maiores, para os casos em que a imunoterapia isolada for considerada.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados indicam que a inflamação sistêmica e o microambiente tumoral inflamado podem ser considerados como biomarcadores de prognóstico em CEOO. Entretanto, a RNL aumentada não se correlacionou com um microambiente inflamado, o que sugere a participação de outros fatores no recrutamento dessas células para o tumor.

A contagem de TAN foi maior no compartimento peritumoral e se associou à pior SLD em CEOO, o que indica sua aplicabilidade como biomarcador de prognóstico. Embora os neutrófilos intratumorais frequentemente associados à menor sobrevida, nosso estudo demonstrou que os neutrófilos peritumorais também podem exibir fenótipo ativado, contribuindo para pior prognóstico.

O padrão do infiltrado linfocitário tumoral foi predominantemente moderado nas amostras analisadas e a baixa infiltração esteve associada a maior tamanho tumoral e doença avançada. Embora, as curvas de sobrevida não tenham diferido com significância estatística, pode-se concluir que o TIL influencia o comportamento tumoral, uma vez que afeta o tamanho do tumor e estadiamento, sendo, portanto, um importante fator prognóstico em CEOO.

Alta RNL esteve associada a piores indicadores de prognóstico como tamanho tumoral e estadiamento avançado.

A expressão de PD-L1 foi mais frequente nas células inflamatórias do que nas células tumorais. A expressão no tumor e estroma não mostrou associação significativa com as características clínico-patológicas e indicadores de prognósticos analisados, o que indica seu baixo potencial prognóstico na população estudada.

REFERÊNCIAS

- AL-HAIDARI, A. A. et al. Neutrophil extracellular traps promote peritoneal metastasis of colon cancer cells. **Oncotarget**, v. 10, n. 12, p. 1238, 2019.
- ALSAAB, H. O. et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 561, 2017.
- ALSIBAI, K. D.; MESEURE, D. Significance of Tumor Microenvironment Scoring and Immune Biomarkers in Patient Stratification and Cancer Outcomes. **Histopathology: An Update**, p. 11, 2018.
- ASTRADSSON, T. et al. **Systemic Inflammatory Reaction in Patients With Head and Neck Cancer—An Explorative Study**. **Frontiers in Oncology**. [S.l: s.n.], 2019
- BAI, S. et al. Bioinformatic Analysis Reveals an Immune/Inflammatory-Related Risk Signature for Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Oncology**, v. 2019, p. 3865279, 2019.
- BALERMPAS, P. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 2, p. 501–509, 2014.
- BALKHI, M. Y. et al. T cell exhaustion and Interleukin 2 downregulation. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 339–347, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466614006073>>.
- BEKES, E. M. et al. Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. **The American journal of pathology**, v. 179, n. 3, p. 1455–1470, 2011.
- BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. [S.l.]: Guanabara-Koogan, 2016.
- BOING, A. F.; PERES, M. A.; ANTUNES, J. L. F. Mortality from oral and pharyngeal cancer in Brazil: trends and regional patterns, 1979-2002. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 20, p. 1–8, 2006.
- BONOMI, M. et al. The Role of Inflammation in Head and Neck Cancer. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 816 ed. Basel: Springer, 2014. p. 107–127.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BREMNES, R. M. et al. The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non–Small Cell Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 11, n. 6, p. 789–800, 1 jun. 2016.

BROOKS, J. M. et al. Development and validation of a combined hypoxia and immune prognostic classifier for head and neck cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 17, p. 5315–5328, 2019.

BRYNE, M. et al. Malignancy Grading of the Deep Invasive Margins of Oral Squamous Cell Carcinomas Has High Prognostic Value. **The Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 375–381, abr. 1992.

CADONI, G. et al. Prognostic Factors in Head and Neck Cancer: A 10-Year Retrospective Analysis in a Single-Institution in Italy TT - Fattori Prognostici Del Tumore Testa-Collo: Un'analisi Retrospettiva Monocentrica Di 10 Anni. **Acta Otorhinolaryngologica Italica : Organo Ufficiale Della Societa Italiana Di Otorinolaringologia e Chirurgia Cervico-Facciale**, v. 37, n. 6, p. 458–466, dez. 2017.

CALDEIRA, P. C. et al. Immunophenotype of neutrophils in oral squamous cell carcinoma patients. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 9, p. 703–709, 2017.

CALDEIRA, P. C.; DE ANDRADE SOUSA, A.; DE AGUIAR, M. C. F. Differential Infiltration of Neutrophils in T1-T2 versus T3-T4 Oral Squamous Cell Carcinomas: A Preliminary Study. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 569, 14 out. 2015.

CHANDRA, A. et al. Oral squamous cell carcinomas in age distinct population: A comparison of p53 immunoexpression. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, n. 4 UL-<http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973-1482;year=2013;volume=9;issue=4;spage=587;epage=591;aulast=Chandra;t=5>, p. 587 OP-591 VO–9, 2013.

CHARLES, K. A. et al. Systemic Inflammation Is an Independent Predictive Marker of Clinical Outcomes in Mucosal Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck in Oropharyngeal and Non-Oropharyngeal Patients. **BMC Cancer**, v. 16, p. 124, 18 fev. 2016.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1–10, 2013.

CHEN, W.-Y. et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with operable tongue cancer. **Radiation Oncology**, v. 13, n. 1, p. 157, 2018.

CHINAI, J. M. et al. New Immunotherapies Targeting the PD-1 Pathway. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 9, p. 587–595, set. 2015.

CHO, Y.-A. et al. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 47, n. 12, p. 1148–1153, 2011.

CONCIATORI, F. et al. Role of MTOR Signaling in Tumor Microenvironment: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2453, ago. 2018.

COUSSENS, L.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v. 420, p. 860–867, 19

dez. 2002.

DE MEULENAERE, A. et al. TILs in head and neck cancer: ready for clinical implementation and why (not)? **Head and neck pathology**, v. 11, n. 3, p. 354–363, 2017.

DENARDO, D. G. et al. CD4+ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer cell**, v. 16, n. 2, p. 91–102, 2009.

DIZDAROGLU, M. et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1102–1115, 2002.

DURGEAU, A. et al. Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 14, 2018.

EEROLA, A.-K.; SOINI, Y.; PÄÄKKÖ, P. A High Number of Tumor-infiltrating Lymphocytes Are Associated with a Small Tumor Size, Low Tumor Stage, and a Favorable Prognosis in Operated Small Cell Lung Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 5, p. 1875 LP – 1881, 1 maio 2000.

ELREFAEY, S. et al. HPV in Oropharyngeal Cancer: The Basics to Know in Clinical Practice. **Acta Otorhinolaryngologica Italica : Organo Ufficiale Della Società Italiana Di Otorinolaringologia e Chirurgia Cervico-Facciale**, v. 34, n. 5, p. 299–309, out. 2014.

EREZ, N. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner. **Cancer Cell**, v. 17, n. 2, p. 135–147, 17 fev. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.041>>.

FARKONA, S.; DIAMANDIS, E. P.; BLASUTIG, I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? **BMC medicine**, v. 14, n. 1, p. 73, 2016.

FARUQI, A.; ROUS, B. Standards and datasets for reporting cancers Dataset for histopathological reporting of vulval carcinomas January 2018. **The Royal College of Pathologist, London**, v. 4, n. G070, p. 1–37, 2018.

FELIPPU, A. W. D. et al. Impact of delay in the diagnosis and treatment of head and neck cancer. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 82, n. 2, p. 140–143, 2016.

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. **Cancer cell**, v. 16, n. 3, p. 183–194, 2009.

GALON, J. et al. Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. **The Journal of pathology**, v. 232, n. 2, p. 199–209, 2014.

GOEL, M. K.; KHANNA, P.; KISHORE, J. Understanding Survival Analysis: Kaplan-Meier Estimate. **International Journal of Ayurveda Research**, v. 1, n. 4, p. 274–278, out. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455458>>.

GREEN, V. L. et al. Increased prevalence of tumour infiltrating immune cells in oropharyngeal tumours in comparison to other subsites: relationship to peripheral immunity. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 62, n. 5, p. 863–873, 2013.

GULER, R. et al. Targeting Batf2 for infectious diseases and cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 26575, 2015.

GUTHRIE, G. J. K. et al. The systemic inflammation-based neutrophil–lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 88, n. 1, p. 218–230, 2013.

HADRUP, S.; DONIA, M.; THOR STRATEN, P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. **Cancer Microenvironment**, v. 6, n. 2, p. 123–133, 2013.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANNA, G. J. et al. Tumor PD-L1 expression is associated with improved survival and lower recurrence risk in young women with oral cavity squamous cell carcinoma. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 47, n. 5, p. 568–577, 2018.

HE, G. et al. Peritumoural neutrophils negatively regulate adaptive immunity via the PD-L1/PD-1 signalling pathway in hepatocellular carcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 1, p. 141, 2015.

HINSHAW, D. C.; SHEVDE, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. **Cancer research**, v. 79, n. 18, p. 4557–4566, 2019.

HIRAI, M. et al. Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment. **International journal of oncology**, v. 50, n. 1, p. 41–48, 2017.

HUANG, H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: Recent advances. **Sensors**, v. 18, n. 10, p. 3249, 2018.

HUANG, S. H. et al. Prognostic value of pretreatment circulating neutrophils, monocytes, and lymphocytes in oropharyngeal cancer stratified by human papillomavirus status. **Cancer**, v. 121, n. 4, p. 545–555, 2015.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. [S.l.: s.n.], 2018.

KIM; CHANG, D. K. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 29, p. 9872, 2014.

KIM, H. R. et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36956, 2016.

KIM, J. M.; CHEN, D. S. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to

success (or failure). **Annals of Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1492–1504, 2016.

KORNILUK, A. et al. From Inflammation to Cancer. **Irish Journal of Medical Science**, v. 186, n. 1, p. 57–62, fev. 2017.

KOWANETZ, M. et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G⁺ Ly6C⁺ granulocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 50, p. 21248–21255, 2010.

KUANG, D.-M. et al. Peritumoral Neutrophils Link Inflammatory Response to Disease Progression by Fostering Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 5, p. 948–955, maio 2011.

KULANGARA, K. et al. Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 143, n. 3, p. 330–337, 2018.

KUMAR, M. et al. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 458, 2016.

KURODA, S. et al. Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) regulates epigenetically and energetically effector CD8 T-cell differentiation via Sirt1 expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 36, p. 14885–14889, 2011.

KYTHREOTOU, A. et al. PD-L1. **Journal of clinical pathology**, v. 71, n. 3, p. 189–194, 2018.

LE CAMPION, A. C. O. V. et al. Caracterização do atraso no diagnóstico do câncer de boca e orofaringe em dois centros de referência. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 178–184, 2016.

LE, X.; HANNA, E. Y. Optimal Regimen of Cisplatin in Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck yet to Be Determined. **Annals of Translational Medicine**, v. 6, n. 11, p. 229, jun. 2018.

LEE, J.; TANEJA, V.; VASSALLO, R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. **Journal of dental research**, v. 91, n. 2, p. 142–149, 2012.

LEI, Y. et al. Telltale tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in oral, head & neck cancer. **Oral oncology**, v. 61, p. 159–165, 2016.

LE MOS JUNIOR, C. A. et al. Câncer de boca baseado em evidências científicas. **Revista da Associação Paulista de Cirurgões Dentistas**, v. 67, n. 3, p. 178–186, 2013.

LI, C. et al. Neutrophils infiltration and its correlation with human papillomavirus status in the oral squamous cell carcinoma. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 5171, 2019.

LI, J.; WANG, P.; XU, Y. Prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in patients with head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179536, 12 jun. 2017.

LI, T.-J. et al. Interleukin-17–producing neutrophils link inflammatory stimuli to disease progression by promoting angiogenesis in gastric cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 6, p. 1575–1585, 2017.

LIN, W. et al. Crosstalk between PD-1/PD-L1 blockade and its combinatorial therapies in tumor immune microenvironment: a focus on HNSCC. **Frontiers in oncology**, v. 8, 2018.

LOPES, B. et al. Bioestatísticas: conceitos fundamentais e aplicações práticas. **Revista brasileira de oftalmologia**, v. 73, n. 1, p. 16–22, 2014.

MAGALHAES, M. A. O.; GLOGAUER, J. E.; GLOGAUER, M. Neutrophils and oral squamous cell carcinoma: lessons learned and future directions. **Journal of leukocyte biology**, v. 96, n. 5, p. 695–702, 2014.

MALIK, A. et al. Role of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio as prognostic markers in oral cavity cancers. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v. 40, n. 1, p. 94, 2019.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 8, p. 519, 2011.

MARCU, L. G.; REID, P.; BEZAK, E. The Promise of Novel Biomarkers for Head and Neck Cancer from an Imaging Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2511, 24 ago. 2018.

MARSH, D. et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 4, p. 470–481, 2011.

MARUSE, Y. et al. Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 7, p. 836–845, 1 jul. 2018.

MAYNE, S. T. et al. Alcohol and Tobacco Use Prediagnosis and Postdiagnosis, and Survival in a Cohort of Patients with Early Stage Cancers of the Oral Cavity, Pharynx, and Larynx. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 18, n. 12, p. 3368–3374, dez. 2009.

MISHALIAN, I. et al. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. **Cancer immunology, immunotherapy**, v. 62, n. 11, p. 1745–1756, 2013.

MOORE, M. M. et al. Inflammation and cancer: causes and consequences. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 4, p. 504–508, 2010.

MORSE, D. E. et al. Smoking and Drinking in Relation to Oral Cancer and Oral

Epithelial Dysplasia. **Cancer Causes & Control : CCC**, v. 18, n. 9, p. 919–929, nov. 2007.

MÜLLER, T. et al. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 32, p. 52889, 2017.

MULTHOFF, G.; MOLLS, M.; RADONS, J. Chronic inflammation in cancer development. **Frontiers in immunology**, v. 2, p. 98, 2012.

MURATA, M. Inflammation and cancer. **Environmental health and preventive medicine**, v. 23, n. 1, p. 50, 20 out. 2018.

NAKASHIMA, H. et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio predicts the chemoradiotherapy outcome and survival in patients with oral squamous cell carcinoma: a retrospective study. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 41, 2016.

NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. **Cancer science**, v. 98, n. 10, p. 1505–1511, 2007.

NGUYEN, N. et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Head & neck**, v. 38, n. 7, p. 1074–1084, 2016.

NOWICKI, T. S.; HU-LIESKOVAN, S.; RIBAS, A. Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade. **Cancer journal (Sudbury, Mass.)**, v. 24, n. 1, p. 47–53, 2018.

NOZAWA, H.; CHIU, C.; HANAHAN, D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 33, p. 12493–12498, 2006.

O'HIGGINS, C.; WARD, F. J.; EID, R. A. Deciphering the Role of Regulatory CD4 T Cells in Oral and Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. **Frontiers in oncology**, v. 8, 2018.

OGDEN, G. R. Alcohol and oral cancer. **Alcohol**, v. 35, n. 3, p. 169–173, 2005.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1 SE-Artigos Médicos, mar. 2010.

PAINTAL, A. S.; BROCKSTEIN, B. E. PD-L1 CPS Scoring Accuracy in Small Biopsies and Aspirate Cell Blocks from Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Head and Neck Pathology**, 2019.

PARK, J. et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. **Science translational medicine**, v. 8, n. 361, p. 361ra138–361ra138, 2016.

PATEL, S. C. et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 11, p. 1488–1494, 2011.

PEMBERTON, M. N. Oral cancer and tobacco: developments in harm reduction.

British dental journal, v. 225, n. 9, p. 822, 2018.

PEREA, L. M. E. et al. Trend of oral and pharyngeal cancer mortality in Brazil in the period of 2002 to 2013. **Revista de saude publica**, v. 52, p. 10, 2018.

PHULARI, R. G. S. et al. Neutrophil: Lymphocyte ratio and oral squamous cell carcinoma: A preliminary study. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 23, n. 1, p. 78, 2019.

PIRES, F. R. et al. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 5, p. 460–467, 2013.

POWELL, D. R.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophils in the tumor microenvironment. **Trends in immunology**, v. 37, n. 1, p. 41–52, 2016.

QU, X.; TANG, Y.; HUA, S. Immunological approaches towards cancer and inflammation: a cross talk. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 563, 2018.

QUIGLEY, M. et al. **Integrative Genomic Analysis of HIV-Specific CD8+ T Cells Reveals That PD-1 Inhibits T Cell Function by Upregulating the AP-1 Transcription Factor BATF**. . [S.l.]: Am Soc Hematology. , 2009

RACHIDI, S. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and overall survival in all sites of head and neck squamous cell carcinoma. **Head & neck**, v. 38, n. S1, p. E1068–E1074, 2016.

RASMUSSEN, J. H. et al. Intratumor heterogeneity of PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma. **British journal of cancer**, v. 120, n. 10, p. 1003, 2019.

REZENDE, C. P. de et al. Alterações da saúde bucal em portadores de câncer da boca e orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 4, p. 596–600, 2008.

RISCHIN, D. et al. **Protocol-specified final analysis of the phase 3 KEYNOTE-048 trial of pembrolizumab (pembro) as first-line therapy for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC)**. . [S.l.]: American Society of Clinical Oncology. , 2019

SAGIV, J. Y. et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. **Cell reports**, v. 10, n. 4, p. 562–573, 2015.

SCHNEIDER, S. et al. PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis–impact on clinical outcome. **Histopathology**, v. 73, n. 4, p. 573–584, 2018.

SEOANE-ROMERO, J.-M. et al. Factors Related to Late Stage Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 17, n. 1, p. e35–e40, 1 jan. 2012.

SHARP, L. et al. Smoking at diagnosis is an independent prognostic factor for

cancer-specific survival in head and neck cancer: findings from a large, population-based study. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 11, p. 2579–2590, 2014.

SHARPE, A. H.; PAUKEN, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 3, p. 153, 2018.

SHEN, M. et al. Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98259, 2014.

SHEPPARD, K.-A. et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ . **FEBS letters**, v. 574, n. 1–3, p. 37–41, 2004.

SHIELS, M. S. et al. Cigarette Smoking and Variations in Systemic Immune and Inflammation Markers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 11, nov. 2014.

SILVA, R. N. F. et al. Immunohistochemical analysis of neutrophils, interleukin-17, matrix metalloproteinase-9, and neoformed vessels in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 9, p. 856–863, 2018.

STRATI, A. et al. Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 8, p. 1923–1933, 4 jul. 2017.

SUN, C.; MEZZADRA, R.; SCHUMACHER, T. N. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. **Immunity**, v. 48, n. 3, p. 434–452, 2018.

TAZZYMAN, S.; LEWIS, C. E.; MURDOCH, C. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. **International journal of experimental pathology**, v. 90, n. 3, p. 222–231, 2009.

TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 508, 2014.

TENG, T.-S. et al. Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.

TOGASHI, Y.; SHITARA, K.; NISHIKAWA, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression—implications for anticancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, p. 1, 2019.

TORRES-PEREIRA, C. C. et al. Abordagem do câncer da boca: uma estratégia para os níveis primário e secundário de atenção em saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, p. s30–s39, 2012.

TORREZINI, T.; ATHANAZIO, D. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: implicações clínicas e potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 63–77, 2008.

URIARTE, S. M.; EDMISSON, J. S.; JIMENEZ-FLORES, E. Human Neutrophils and

Oral Microbiota: A Constant Tug-of-War between a Harmonious and a Discordant Coexistence. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 282–298, set. 2016.

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Neutrophils in cancer: two sides of the same coin. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.

VAN DER LOOS, C. **User protocol: practical guide to multiple staining**. [S.l.]: Cambridge Research & Instrumentation, Inc. , 2008

WANG, J. et al. T cell exhaustion in cancer: mechanisms and clinical implications. **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 6, p. 4279–4286, 2018.

WANG, N. et al. Neutrophils infiltration in the tongue squamous cell carcinoma and its correlation with CEACAM1 expression on tumor cells. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e89991, 2014.

WANSOM, D. et al. Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16–associated oropharyngeal cancer. **The Laryngoscope**, v. 122, n. 1, p. 121–127, 2012.

WARD, M. J. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. **British journal of cancer**, v. 110, n. 2, p. 489, 2014.

WCULEK, S. K.; MALANCHI, I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. **Nature**, v. 528, n. 7582, p. 413, 2015.

WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and Cellular Insights into T Cell Exhaustion. **Nature Reviews. Immunology**, v. 15, n. 8, p. 486–499, ago. 2015.

WOLF, G. T. et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study. **Oral oncology**, v. 51, n. 1, p. 90–95, 2015.

WROBLEWSKI, L. E.; PEEK, R. M.; WILSON, K. T. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 4, p. 713–739, 2010.

YARCHOAN, M. et al. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 4, p. 209, 2017.

YE, H. et al. Tumor-associated macrophages promote progression and the Warburg effect via CCL18/NF-κB/VCAM-1 pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 5, p. 453, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0486-0>>.

ZANCOPE, E. et al. Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 2, p. 162–167, 2010.

ZHANG, X. et al. Neutrophils in cancer development and progression: roles, mechanisms, and implications. **International journal of oncology**, v. 49, n. 3, p. 857–867, 2016.

ZHOU, J. et al. Soluble PD-L1 as a biomarker in malignant melanoma treated with checkpoint blockade. **Cancer immunology research**, v. 5, n. 6, p. 480–492, 2017.

ZHOU, T. et al. Comparison of the Prognostic Value of Systemic Inflammation Response Markers in Small Cell Lung Cancer Patients. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 7, p. 1685–1692, 2019.

ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE
Unimed Vitória

Vitória, 27 de junho de 2011.

Projeto No: 318/2011

Parecer: 21/2011 ☐ Inicial ☒ Conclusão

Título: **Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil**

Instituição: **Hospital Santa Rita de Cássia**

Pesquisador: **José Roberto V de Podestá**

Grupo e Área Temática Especial: **IA**

Prezado Pesquisador

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.

Parecer do CEP: pendência atendida

2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.

Parecer do CEP: Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.

3. Justificar ausência do cálculo amostral

Parecer do CEP: Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.

4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pede-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.

Parecer do CEP: pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sobe nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.





Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

Parecer do CEP: pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

Parecer do CEP: pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

Parecer do CEP: pendência atendida

CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

APROVADO

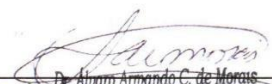
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,


Dr. Alvaro Armando C. de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do CIAS

ANEXO B – PARECER DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



**CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA**

PARECER N.º. 681/2011

Registro CONEP 16525 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – Não há CAAE ou nº de Folha de Rosto **Processo nº** 25000.098091/2011-05
Projeto de Pesquisa: *"Estudo de Câncer de cabeça e pescoço no Brasil"*. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de 10/04/2011.
Pesquisador Responsável: José Carlos de Oliveira
Instituição: ACCG/Instituto Ensino e Pesquisa/Hospital Araújo Jorge (**1º CENTRO BRASILEIRO**)
CEP de origem: CEP - ACCG - Instituto de Ensino e Pesquisa/GO
Área Temática Especial: Genética humana
Patrocinador: Não informado.

Sumário geral do protocolo

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo de neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe e laringe. É o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, representando cerca de 6% dos casos de câncer. Em todo o mundo, mais de 500.000 novos casos e 300.000 óbitos por câncer de cabeça e pescoço são estimados para ocorrer a cada ano. Este meio milhão de casos inclui 262.700 cânceres da cavidade oral, 117.200 cânceres de faringe e 169.600 cânceres da laringe. As taxas de incidência padronizadas são 15,3 e 4,5 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente. As taxas de incidência no Brasil são cerca de 22,1/100.000 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

O tratamento primário varia de acordo com a localização anatômica e estágio da doença. Para a maioria dos tipos de câncer diagnosticados em estádios iniciais, a ressecção cirúrgica é a principal modalidade de tratamento. No entanto, para certos sítios anatômicos, como as amígdalas, a base da língua e o assoalho da boca, bem como para todos os cânceres localmente avançados, radioterapia é usada, isolada ou combinada com cirurgia. A quimioterapia pode ser utilizada em associação com a radioterapia. No entanto, no Brasil, a taxa de sobrevida em 5 anos ainda é inferior a 50%.

Publicações recentes sugerem um papel para infecção por HPV na sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (ver abaixo seção sobre HPV). Os Polimorfismos genéticos nos genes de reparo do DNA, os genes do ciclo celular, o metabolismo carcinogênico, e vias de genes do fator de crescimento foram analisados em relação à progressão e sobrevida de pacientes com câncer de vias aerodigestivas superiores (VADS). Polimorfismos nos genes XRCC1, FGFR e CCND1 foram associados com a sobrevida em pacientes com cânceres das VADS em pelo menos 2 estudos. No entanto, Hopkins *et al* criticou que esses estudos eram pequenos (<300 casos), muitas vezes tinham descrições inadequadas da população em estudo, não consideraram as comparações múltiplas de forma apropriada e podiam estar sujeitos a viés de publicação. Assim, não existem no momento estudos de seguimento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, que permitam a avaliação simultânea do papel do fumo, álcool, HPV, genética e tratamento

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

OBS: No Brasil, além do centro em tela, está prevista a participação dos seguintes centros: Hospital do Câncer de Barretos/SP (Dr. André Lopes Carvalho/CEP do Hospital Câncer Barretos); Hospital Erasto Gaertner/PR (Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos e Dra. Paola Pedruzzi/CEP do Hospital Erasto Gaertner); Hospital A C Camargo/SP (Dr. Luiz Paulo Kowalski e Dr. Mauro Kasuo Ikeda/CEP do Hospital do Câncer - A C Camargo/SP); Associação de Combate ao Câncer em Goiás/Hospital Araújo Jorge/GO (Dr. José Carlos de Oliveira e Drª. Maria Paula Curado/Comitê de Ética do Hospital Araújo); Departamento de Otorrinolaringologia UFGO Goiânia/GO (Dr. Claudinei Cândido Costa/CEP do HC da UFG); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Dra. Jossi Ledo Kanda/CEP NÃO INFORMADO); Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer/RN (Dr. Ricardo José Curioso da Silva e Dr. Luis Eduardo Barbalho de Melo /CEP da Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer); Instituto do Câncer do Ceará/CE (Dr. Eric Fernandes de Souza/CEP NÃO INFORMADO); FCECON - Fundação Centro Controle de Oncologia/AM (Dr. Marco Antonio Cruz Rocha e Dr. Jeferson Moreira de Medeiros/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Heliópolis/SP (Dr. Carlos Neutzling Lehn/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Santa Rita/AFEC - Associação Feminina de Educação e Combate ao Câncer/ES (Dr. Jose Roberto Vasconcelos de Podesta/Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS); Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (Dr. José Francisco de Sales Chagas e Dr. Maria Beatriz Nogueira Pascoal/CEP da PUC Campinas); Hospital Universitário/UnB (Dr. Luiz Augusto Nascimento e Dr. Juliano de Padua Nakashima/Comitê de ética em Pesquisa - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde); Instituto Nacional do Câncer – INCA/RJ (Dr. Fernando Luiz Dias, Dr. Roberto Araujo Lima e Dra. Isabella Costa Santos/Comitê de Ética e Pesquisa do INCA); Instituto Brasileiro de Controle do Câncer/SP (Dra. Adriana Sonderman, Dr. André Bandiera de Oliveira Santos e Dr. Fabio Roberto Pinto/CEP do BCC - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer); Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP/SP (Dr. Lenine Garcia Brandão/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Amaral Carvalho FUNDAÇÃO AMARAL CARVALHO/SP (José Getulio Segalla/Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hospital Amaral Carvalho) e Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/SP (Prof. Dr. Marcos B. Paiva/Comitê de Ética em Pesquisa).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: *Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:*

- 1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou/ particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";
- 2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;
- 3) vínculos do pesquisador;
- 4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 25 de outubro de 2011.

ANEXO C – PARECER DO NATIONAL RESEARCH ETHICS SERVICE



National Research Ethics Service

Coventry Research Ethics Committee

2nd floor West Wing
University Hospital
Clifford Bridge Road
Coventry
CV2 2DX

24 February 2010

Telephone: 024 7696 7529
Facsimile: 024 7696 5033

Professor Hisham Mehanna
Institute of Head & Neck Studies & Education
University Hospital
3rd floor opposite Ward 32
Clifford Bridge Road
Coventry CV2 2DX

Dear Professor Mehanna

Study Title:	Improving treatment selection using Predictive Classifiers of Treatment Response for Head and Neck Cancers and dysplasia.
REC reference number:	10/H1210/9
Protocol number:	Version 1.0

The Research Ethics Committee reviewed the above application at the meeting held on 16 February 2010. Thank you for attending to discuss the study.

Ethical opinion

You advised the Committee you were aiming to develop treatment response classification to help predict response to treatment for two types of patients; first patients who have laryngeal voice box or mouth and throat cancer; second patients with laryngeal and mouth dysplasia. Through using the formula you would be able to predict whether a patient with cancer with these characteristics would be best receiving surgery rather than chemotherapy similarly whether patients with oral dysplasia would better respond to surgery rather than a 'wait and see' approach thus individualising treatment for those patients. By linking a series of chemotherapy and genetic tests on the samples and responses to treatment in relevant cohort of patients you have target diseases or cancers by correlating biomarkers. This was a well known protocol for developing biomarkers and classifications in UK, i.e. biomarker road map.

According to the pilot study out of 100 patients 80 could not now be traced so the Committee wanted to know how you would know how the patients had progressed if you could not contact 80%. You explained that patients had been treated and biopsied in the local hospital then followed up, some died some didn't and you would follow up the local ones. You would ask the local team for patients' tissue and pseudo anonymised outcome data; i.e. link anonymised you had no way of tracking the code.

The local centres were responsible for consenting patients via the operating consent form so the Committee wondered if there was a possibility of tissue from someone who did not consent being included in the study. You stated that where there was agreement they would be included but before September 2006 patients' samples could be used without their express consent provided they were anonymised. Under

This Research Ethics Committee is an advisory committee to West Midlands Strategic Health Authority

The National Research Ethics Service (NRES) represents the NRES Directorate within the National Patient Safety Agency and Research Ethics Committees in England

Statement of compliance

The Committee is constituted in accordance with the Governance Arrangements for Research Ethics Committees (July 2001) and complies fully with the Standard Operating Procedures for Research Ethics Committees in the UK.

After ethical review

Now that you have completed the application process please visit the National Research Ethics Service website > After Review

You are invited to give your view of the service that you have received from the National Research Ethics Service and the application procedure. If you wish to make your views known please use the feedback form available on the website.

The attached document "After ethical review – guidance for researchers" gives detailed guidance on reporting requirements for studies with a favourable opinion, including:

- Notifying substantial amendments
- Adding new sites and investigators
- Progress and safety reports
- Notifying the end of the study

The NRES website also provides guidance on these topics, which is updated in the light of changes in reporting requirements or procedures.

We would also like to inform you that we consult regularly with stakeholders to improve our service. If you would like to join our Reference Group please email referencegroup@nres.npsa.nhs.uk.

10/H1210/9

Please quote this number on all correspondence

With the Committee's best wishes for the success of this project

Yours sincerely



Mr Stephen Keay
Chairman

Email: pauline.pittaway@uhcw.nhs.uk

Enclosures: List of names and professions of members who were present at the meeting and those who submitted written comments

"After ethical review – guidance for researchers SL-AR2"

Copy to: Mrs Ceri Jones, R&D, UHC&W NHS Trust