



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

JULIANA NUNES IGLESIAS DO REGO

**APLICABILIDADE DE PD-L1 E INFILTRADO
INFLAMATÓRIO COMO BIOMARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DE LARINGE**

VITÓRIA, ES

2022

JULIANA NUNES IGLESIAS DO REGO

**APLICABILIDADE DE PD-L1 E INFILTRADO
INFLAMATÓRIO COMO BIOMARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DE LARINGE**

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

2022

DEDICATÓRIA

À Deus, Autor da vida, por me permitir retomar um sonho e por me sustentar em todo o trajeto. Sem Ele, nada disso seria possível.

Aos meus pais, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Por ingressarem comigo neste desafio que tanto exigiu de vocês. Sem o apoio de vocês eu não chegaria tão longe.

Ao meu filho, Arthur, que mesmo tão pequeno soube compreender os momentos que precisei me ausentar. Pelos abraços, beijos, sorrisos e declarações que foram minha força na fraqueza.

Aos meus irmãos, Junior e Vinicius, pelo apoio e por enxergarem potencial em mim e me incentivarem a explorá-lo.

À minha orientadora, Sandra Ventorin von Zeidler, pelo acolhimento, pelas orientações além da academia, por compreender, ouvir e instruir durante as mais diversas situações que enfrentei durante esta jornada. Por confiar e não desistir de mim, mesmo quando eu mesma não acreditava que era possível.

Ao Laboratório de Patologia Molecular, pela acolhida, pelas vivências e conhecimentos trocados. Por me abraçarem tão calorosamente e não largarem. Pela paciência com minhas limitações. Entrei em um grupo de eternos estudantes e ganhei uma família da qual, mesmo encerrando essa etapa, levarei para a vida. Sou grata à Deus por tê-los conhecido.

À Olivia Rocha Kretli que, em um momento de desabafos, me apresentou e me indicou o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFES. Sem a sua sugestão despretensiosa hoje eu não estaria aqui.

Ao Cristiano Venturim por me incentivar a ir além, mais uma vez. Por assumir o risco pelo meu sonho e pela ciência. Nunca esquecerei tudo o que você já fez por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Sandra 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.

Agradeço à Camila Batista Daniel por todo o suporte e apoio durante a realização dos experimentos e por todo o conhecimento compartilhado.

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

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.

O Hospital Santa Rita de Cássia por ter permitido acesso aos prontuários, às amostras tumorais de arquivo dos pacientes e pela motivação na busca de resultados científicos que irão contribuir para melhor qualidade de vida dos pacientes com câncer.

Ao Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia por me permitir participar e realizar junto à equipe este trabalho a fim de contribuir para uma melhor qualidade de vida dos pacientes com câncer de laringe.

Ao Laboratório Multiusuário de Histotécnicas da UFES pela confecção das lâminas, principalmente à técnica Lucienne Bessoni Oliveira.

Ao professor Daniel Claudio de Oliveira Gomes pela parceria e disponibilidade para o experimento de imuno-histoquímica.

A vocês, minha gratidão!

“ ‘Porque sou Eu que conheço os planos que tenho para vocês’, diz o Senhor, ‘planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro.’ ”

Jeremias 29:11

RESUMO

REGO, J. N. I. **Aplicabilidade de PD-L1 e infiltrado inflamatório como biomarcadores de prognóstico em carcinoma epidermóide de laringe.** 2022. 77p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil

Compreender o microambiente tumoral e os agentes de inflamação envolvidos no processo de iniciação e disseminação do câncer são essenciais para revelar biomarcadores de progressão tumoral, além de esclarecer seu valor prognóstico. Este estudo teve por objetivo avaliar a aplicabilidade de PD-L1 e infiltrado inflamatório como biomarcadores de prognóstico em carcinoma epidermóide de laringe. Dados clínico-patológicos e amostras de tecido tumoral de 30 pacientes com carcinoma epidermóide de laringe foram obtidos e analisados. A relação neutrófilo-linfócito foi estabelecida a partir de resultados de hemograma pré-tratamento. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram analisadas quanto ao padrão de infiltrado linfocitário tumoral. Lâminas foram confeccionadas para imuno-histoquímica de dupla marcação de neutrófilos associados ao tumor e expressão de PD-L1. Análise estatística foi realizada através da associação de variáveis, utilizando o teste de qui-quadrado e exato de Fisher. A relação neutrófilo-linfócito foi dicotomizada de acordo com o ponto de corte, estabelecido por meio de uma curva ROC. Sobrevida global e sobrevida livre de doença foram estimadas usando o método de Kaplan-Meier. Comparação entre as curvas de sobrevida foram realizadas com o teste Log-Rank. Os resultados obtidos evidenciaram relação significativa entre baixa relação neutrófilo-linfócito e sobrevida global em 36 meses ($p=0,005$). Não houve significância nas correlações de sobrevida global com neutrófilos associados ao tumor, infiltrado linfocitário tumoral e PD-L1. Não houve também relação significativa de sobrevida livre de doença com estes biomarcadores. As variáveis clínico-patológicas não apresentaram relação significativa com os biomarcadores. Estes achados sugerem que a relação

neutrófilo-linfócito pode ser considerado um biomarcador de prognóstico em carcinoma epidermóide de laringe e que outros fatores podem estar associados ao prognóstico e novas investigações tornam-se necessárias para elucidação.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide de laringe. PD-L1. Infiltrado inflamatório. Biomarcadores.

ABSTRACT

REGO, J. N. I. **Applicability of PD-L1 and inflammatory infiltrate as prognostic biomarkers in laryngeal squamous cell carcinoma**. 2022. 77p. Dissertation (Master in Biotechnology) – Postgraduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil

Understanding the tumor microenvironment and the inflammatory agents involved in the process of initiation and dissemination of cancer are essential to reveal biomarkers of tumor progression, in addition to clarifying their prognostic value. This study aimed to evaluate the applicability of PD-L1 and inflammatory infiltrate as prognostic biomarkers in laryngeal squamous cell carcinoma. Clinicopathological data and tumor tissue samples from 30 patients with laryngeal squamous cell carcinoma were obtained and analyzed. The neutrophil-lymphocyte ratio was established from pre-treatment blood count results. Slides stained with hematoxylin and eosin were analyzed for the pattern of tumor lymphocytic infiltrate. Slides were prepared for double-labeling immunohistochemistry of tumor-associated neutrophils and PD-L1 expression. Statistical analysis was performed through the association of variables, using the chi-square test and Fisher's exact test. The neutrophil-lymphocyte ratio was dichotomized according to the cut-off point, established by means of an ROC curve. Overall survival and disease-free survival were estimated using the Kaplan-Meier method. Comparisons between survival curves were performed using the Log-Rank test. The results obtained showed a significant relationship between low neutrophil-lymphocyte ratio and overall survival at 36 months ($p=0.005$). There was no significance in the overall survival correlations with tumor-associated neutrophils, tumor lymphocytic infiltrate and PD-L1. There was also no significant relationship of disease-free survival with these biomarkers. The clinicopathological variables did not show a significant relationship with the biomarkers. These findings suggest that the neutrophil-lymphocyte ratio can be considered a prognostic biomarker in laryngeal

squamous cell carcinoma and that other factors may be associated with prognosis and further investigations are necessary for elucidation.

Keywords: Laryngeal squamous cell carcinoma. PD-L1. Inflammatory infiltrate. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número estimado de novos casos de câncer por topografia ao redor do mundo para ambos os sexos e todas as idades em 2020. Fonte: The Global Cancer Observatory, 2020.	20
Figura 2 - Número de óbitos por tipo de neoplasia ao redor do mundo para ambos os sexos e todas as idades em 2020. Fonte: The Global Cancer Observatory, 2020.....	21
Figura 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019.	22
Figura 4 - A anatomia da laringe (THANC GUIDE, 2022).	24
Figura 5 - Sítios anatômicos e subsítios das três regiões da laringe: supraglote, glote e subglote. Os subsítios supraglote (C32.1) incluem epiglote supra-hióidea (i), prega ariepiglótica, aspecto laríngeo (ii), epiglote infra-hióidea (iv) e bandas ventriculares ou falsos cordões (v). Fonte: AJCC, 2018.....	28
Figura 6 - Sítios anatômicos e subsítios da supraglote e da glote. Os subsítios supraglote (C32.1) incluem epiglote supra-hióidea (i), prega ariepiglótica, aspecto laríngeo (ii), aritenóides (iii) e bandas ventriculares ou falsos cordões (v). Os subsítios da glote (C32.0) incluem cordas vocais (i), comissura anterior (ii) e comissura posterior (iii). Fonte: AJCC, 2018.....	28
Figura 7 - Checkpoints co-inibitórios e co-estimuladores na regulação imune das células T. Adaptado de Foster e Devlin (2018).....	42
Figura 8 - Curva ROC para RNL em pacientes com CEL. Ponto de corte >3,64; sensibilidade: 63,64; especificidade: 87,50; Índice de Youden J: 0,511; AUC: 0,812.	53
Figura 9 - Neutrófilos associados ao tumor (TAN). (A) controle positivo apêndice; (B) marcação imuno-histoquímica de neutrófilos peritumoral (setas vermelhas); (C) marcação imuno-histoquímica de neutrófilos intratumorais (setas amarelas). Objetiva 40x.....	54

Figura 10 – Fotomicrografia do infiltrado linfocitário tumoral, Em A, padrão de baixo infiltrado linfocitário tumoral; em B e C, moderado em D e E, alto. Coloração HE. Objetiva: 10x.	56
Figura 11 - Expressão de PD-L1. Marcação imuno-histoquímica de PD-L1 nas células tumorais (setas vermelhas) em B e nas células inflamatórias (setas amarelas) em C; (A) controle positivo apêndice. Objetiva 20x.	58
Figura 12 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo estadiamento (A), sítio (B), tamanho do tumor primário (C), metástase linfonodal (D), tabagismo (E) e etilismo (F).....	60
Figura 13 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank, segundo RNL, no período de 36 meses.....	61
Figura 14 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo TAN. Em A neutrófilos peritumorais e em B neutrófilos intratumorais.....	62
Figura 15 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação ao TIL ($p=0,977$).	62
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) ($p=0,738$).	63
Figura 17 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo estadiamento (A), sítio (B), tamanho do tumor primário (C), metástase linfonodal (D), tabagismo (E) e etilismo (F).....	64
Figura 18 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo RNL ($p=0,318$).	65
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 peritumorais e em B neutrófilos intratumorais.	66
Figura 20 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação ao TIL ($p=0,383$).	66
Figura 21 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação à expressão de PD-L1 ($p=0,329$).	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Códigos de Topografia da Laringe segundo CID-O.....	27
Tabela 2 - Divisão da laringe em sítios e subsítios.	29
Tabela 3 - Grupos de estadiamento AJCC 8 ^a ed. para tumores de laringe.	31
Tabela 4 - Características clínico-patológicas dos pacientes com CEL.....	51
Tabela 5 - Associações entre RNL e características clínico-patológicas em CEL (n=20).....	53
Tabela 6 - Associações entre a média de TAN, intra e peritumoral, com as variáveis clínico-patológicas em CEL (n=26).	55
Tabela 7 - Associações entre TIL e as variáveis clínico-patológicas em CEL (n=26).....	57
Tabela 8 - Associação entre PD-L1 e variáveis clínico-patológicas em CEL (n=26).....	58

LISTA DE ABREVIações

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês <i>Antigen Presenting Cells</i>)
AUC	Área Abaixo da Curva (do inglês <i>Area Under Curve</i>)
CEL	Carcinoma Epidermóide de Laringe
CPS	Pontuação Positiva Combinada (do inglês <i>Combined Positive Score</i>)
CTLA-4	Antígeno-4 Linfócito T Citotóxico (do inglês <i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i>)
CTLs	Linfócitos T Citotóxicos (do inglês <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>)
DC	Células Dendríticas (do inglês <i>Dendritic Cells</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial (do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ENE	Extensão Extranodal (do inglês <i>Extranodal Extension</i>)
FasL	Primeiro Ligante do Receptor de Sinal de Apoptose (do inglês <i>First Apoptosis Signal Ligand Receptor</i>)
HE	Hematoxilina-Eosina
HIF-1α	Fator Alfa Induzível por Hipóxia (do inglês <i>Hypoxia-Inducible Factor 1, Alpha subunit</i>)
HIF1β	Fator 1 Beta Induzível por Hipóxia (do inglês <i>Hypoxia-Inducible Factor 1, Beta subunit</i>)

HPV	Papiloma Vírus Humano (do inglês <i>Human Papillomavirus</i>)
HSRC	Hospital Santa Rita de Cássia
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFN-γ	Interferon-gama
IL-10	Interleucina-10
IL-2	Interleucina-2
IL-8	Interleucina-8
IMRT	Radioterapia de Intensidade Modulada (do inglês <i>Intensity Modulated Radiation Therapy</i>)
ITIM	Motivo Inibitório Baseado em Imunorreceptor Tirosina (do inglês <i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif</i>)
ITSM	Motivo de Troca Baseado em Tirosina de Imunorreceptores (do inglês <i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif</i>)
MDSCs	Células Supressoras Derivadas de Mielóides (do inglês <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>)
MEC	Matriz Extracelular
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NK	Do inglês <i>Natural Killer</i>
PD-1	Proteína de Morte Programada 1
PD-L1	Ligante de Proteína de Morte Programada 1
PD-L2	Ligante de Proteína de Morte Programada 2
PET-TC	Tomografia Computadorizada com Emissão de Pósitrons
QT	Quimioterapia

RM	Ressonância Magnética
RNL	Relação Neutrófilo-Linfócito
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor (do inglês <i>Receiver Operating Characteristic</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT	Radioterapia
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
TAN	Neutrófilos Associados ao Tumor (do inglês <i>Tumor-Associated Neutrophils</i>)
TC	Tomografia Computadorizada
TCR	Receptor de Células T (do inglês <i>T Cell Receptor</i>)
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante Beta (do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
Th1	Célula T <i>Helper</i> 1 (do inglês <i>T Helper Cell</i>)
TIL	Infiltrado Linfocitário Tumoral (do inglês <i>Tumor-Infiltrating Lymphocyte</i>)
TIM-3	Domínios de Mucina e Imunoglobulina de Célula T (do inglês <i>T-Cell Immunoglobulin and mucin-domain containing 3</i>)
TME	Microambiente Tumoral (do inglês <i>Tumor Microenvironment</i>)
TNFα	Fator de Necrose Tumoral Humano Alfa (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor-α Human</i>)
TRegs	Células T Reguladoras
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo

UICC União para o Controle Internacional do Câncer (do inglês *Union for International Cancer Control*)

VEGF Fator de Crescimento Endotelial (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	PANORAMA DO CÂNCER DE LARINGE NO BRASIL E NO MUNDO 20	
2.2	LARINGE	23
2.3	DIAGNÓSTICO	24
2.4	ESTADIAMENTO	26
2.5	TRATAMENTO	32
2.6	MICROAMBIENTE TUMORAL E INFILTRADO INFLAMATÓRIO	36
2.7	EXAUSTÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE PD-L1 EM CEL DE LARINGE	41
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	CASUÍSTICA	45
4.2	RELAÇÃO NEUTRÓFILO-LINFÓCITO	46
4.3	ANÁLISE DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL	46
4.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA DE DUPLA MARCAÇÃO	47
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS	51
5.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	51
5.2	RELAÇÃO NEUTRÓFILO-LINFÓCITO	52

5.3	NEUTRÓFILOS ASSOCIADOS AO TUMOR.....	54
5.4	INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL	55
5.5	EXPRESSÃO DE PD-L1	57
5.6	ANÁLISE DE SOBREVIDA	59
5.6.1	SOBREVIDA GLOBAL	59
5.6.2	SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA	63
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

O câncer de laringe é um dos tipos de neoplasia mais comum entre as que acometem a região de cabeça e pescoço e é a 18ª causa de óbitos no mundo por malignidade. Sua maior incidência tem sido observada na população com idade superior a 40 anos e em indivíduos do sexo masculino (STEUER et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019; KOROUKAKIS, 2021) .

O diagnóstico precoce do carcinoma de laringe geralmente está associado a um bom prognóstico e em maiores chances de cura (BACK; SOOD, 2005). A conduta terapêutica geralmente é uma abordagem multidisciplinar desafiadora uma vez que o órgão está envolvido na vocalização, respiração e deglutição, mas também contribui para o paladar e olfato . Em geral, a cirurgia e a radioterapia, isoladas ou em combinação, representam as modalidades de tratamento curativo de preferência. Em casos mais recorrentes, avançados e metastáticos, tratamentos sistêmicos também são realizados. No entanto, novas abordagens na conduta terapêutica são consideradas quando se propõe a controlar a sintomatologia, melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida global e livre de doença (CHAWLA; CARNEY, 2009; STEUER et al., 2017).

Com o avanço da ciência, terapias-alvo foram desenvolvidas, muitas das quais têm por objetivo estimular o sistema imunológico contra o câncer e, com isso objetiva-se uma melhor resposta ao tratamento com consequente ganho nas taxas de sobrevida global e livre de doença (MERCK S/A, 2013).

A inflamação persistente associada ao câncer está relacionada ao comprometimento e deterioração dos processos imunológicos normais, contribuindo para a tumorigênese e para a angiogênese. Por isso, cada vez mais pesquisas vêm sendo realizados a fim de explorar o microambiente tumoral e os agentes envolvidos no processo de iniciação e disseminação da doença (ZHANG; VEERAMACHANENI, 2022; ELMUSRATI; WANG; WANG, 2021; SADEGHI RAD et al., 2021).

A relação neutrófilo/linfócito (RNL) é estudada em diferentes grupos de câncer e tem sido relacionada com prognóstico e sobrevida (DUZLU et al., 2015).

A infiltração de células imunes no tecido tumoral e tem aumento significativo de leucócitos, sendo os neutrófilos os tipos de leucócitos que sofrem maior recrutamento para tumores e desempenham papel fundamental nas respostas inflamatórias. Os linfócitos T são os componentes centrais da resposta antitumoral, regulando a resposta imuno adaptativa e induzindo a resposta citotóxica aos tumores. Quando em constante exposição a antígenos e estimulação persistente, as células T ficam desreguladas, afetando diretamente a sua função e reatividade, levando-as à disfunção e, conseqüente, exaustão celular (CURRY et al., 2014; SADEGHI RAD et al., 2021).

Evidências científicas têm demonstrado que as moléculas de *checkpoint* co-inibitórias desempenham um papel crucial na exaustão de células T, sendo a via PD-1 – PD-L1 amplamente estudada devido seu comprovado valor como alvo terapêutico em inúmeras neoplasias (WANG et al., 2018).

Sendo assim, a compreensão da imunologia do câncer configura objeto importante de estudo quando pretende-se avaliar potenciais biomarcadores e sua aplicação para fins prognósticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PANORAMA DO CÂNCER DE LARINGE NO BRASIL E NO MUNDO

O câncer de laringe representa um terço de todos os cânceres de cabeça e pescoço. Mundialmente, entre todos os tipos de câncer, as doenças malignas da laringe são listadas como o 22º em termos de incidência (0,89% de todos os cânceres), o 18º em termos de prevalência (1,44% de todos os cânceres), o 18º em termos de incapacidade [ajustada por ano de vida] (1,50% de todas as neoplasias) e mortalidade (1,39% de todas as mortes por câncer) (KOROULAKIS, 2021).

A cada ano cerca de 13.000 pessoas são diagnosticadas com câncer de laringe nos Estados Unidos (KOROULAKIS, 2021). Mundialmente, foram estimados 184.615 novos casos e 99.840 óbitos pela doença para o ano de 2020 (Figuras 1 e 2) (SUNG et al., 2021).

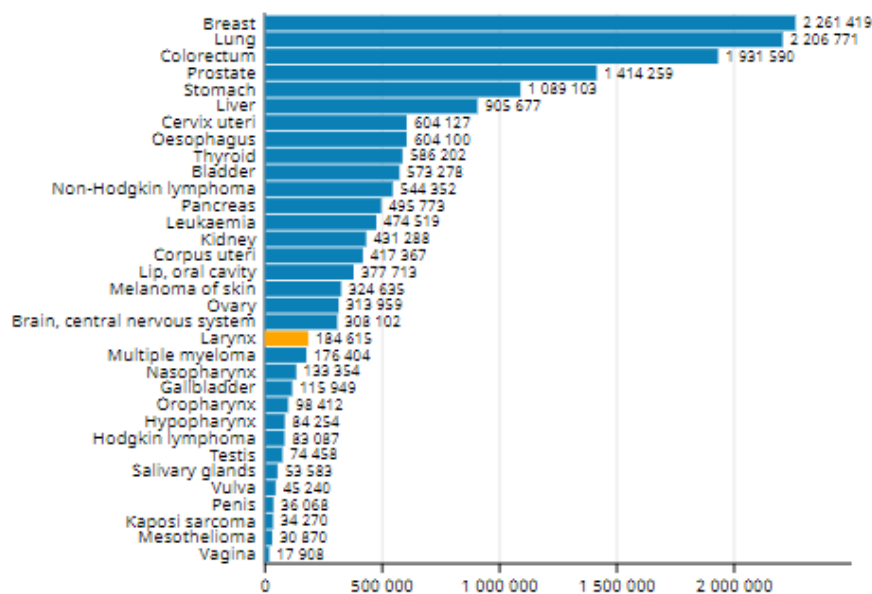


Figura 1 - Número estimado de novos casos de câncer por topografia ao redor do mundo para ambos os sexos e todas as idades em 2020. Fonte: The Global Cancer Observatory, 2020.

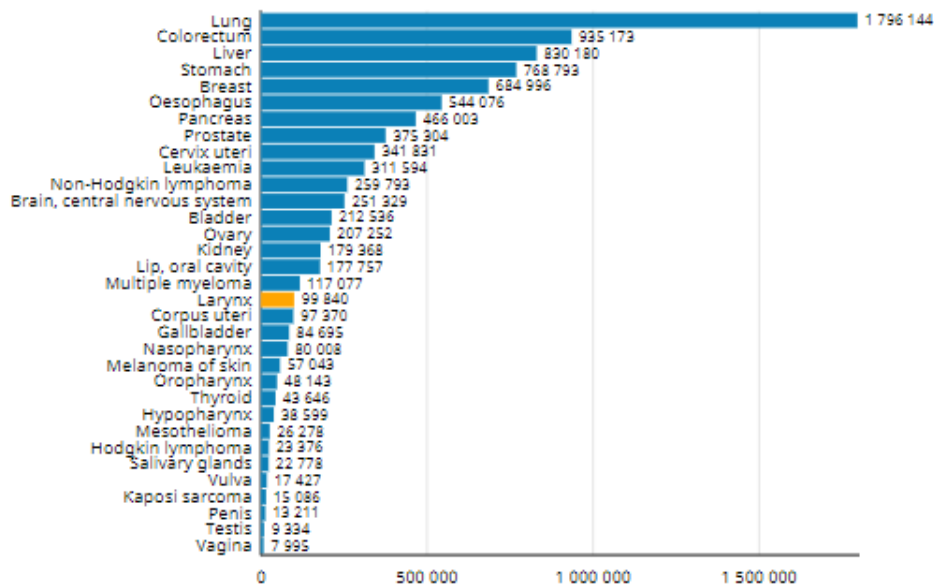


Figura 2 - Número de óbitos por tipo de neoplasia ao redor do mundo para ambos os sexos e todas as idades em 2020. Fonte: The Global Cancer Observatory, 2020.

Para o Brasil, são esperados 6.470 novos casos em homens e 1.180 novos casos em mulheres para o período de 2020 a 2022, sendo o risco estimado de 6,20 casos novos a cada 100 mil homens e de 1,06 casos novos a cada 100 mil mulheres. Para a população masculina brasileira, a neoplasia de laringe ocupa o 9º lugar na distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidente estimados para 2020 (Figura 3). No estado do Espírito Santo, para o ano de 2020, a incidência em homens foi estimada em 110 novos casos a cada 100 mil habitantes. Para mulheres o número de casos estimado foi menor que 20 a cada 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019.

O tipo histológico mais comum é o escamoso, representando 85-90% dos tumores malignos de laringe (BACK; SOOD, 2005). Aproximadamente 60% dos pacientes apresentam doença avançada (estágios III e IV) ao diagnóstico e, infelizmente, a taxa de sobrevida de 5 anos tem diminuído nos últimos 40 anos (STEUER et al., 2017a).

Os fatores de risco mais frequentemente associados ao desenvolvimento de câncer de laringe incluem o consumo de tabaco e o consumo de bebidas alcólicas, sendo demonstrado um efeito sinérgico quando ambos os fatores se encontram presentes. A exposição a vários outros fatores, tais como asbestos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e poeira têxtil, podem potencialmente aumentar as chances de desenvolver câncer de laringe. Fatores dietéticos também têm sido descritos como envolvidos no risco de câncer de laringe, tais como o consumo de carne vermelha, podem aumentar o risco, enquanto a ingestão de frutas e verduras é descrita como capaz de exercer potencial efeito protetivo (STEUER et al., 2017a).

Segundo dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), o câncer de laringe é a 18ª causa de óbitos por malignidade no mundo, considerando ambos os sexos (site IARC, 2021). Em virtude de sua importância, é crescente o número de

ensaios clínicos ocorrendo ao redor do mundo, seja envolvendo técnicas de diagnóstico, desenvolvimento e/ou aprimoramento de abordagens terapêuticas, estilo e qualidade de vida, e reabilitação do órgão. De acordo com o site www.clinicaltrials.gov, na atualidade há o registro de 51 estudos em câncer de laringe ativos e/ou recrutando ao redor do mundo.

Além dos clínicos, estudos translacionais e epidemiológicos também têm sido realizados com o intuito de contribuir para melhor compreensão e definição de condutas no cenário de neoplasias de cabeça e pescoço, incluindo a laringe. Como exemplo, podemos citar o interCHANGE, um estudo coordenado pelo IARC e conduzido em países da América Latina, incluindo o Brasil, o qual a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) contribui como centro participante. O objetivo deste estudo é poder compreender melhor o papel do HPV, da genética, do consumo de bebidas alcoólicas e do uso de tabaco na etiologia e nos desfechos clínicos das neoplasias de cabeça e pescoço. Além disso, espera-se identificar biomarcadores preditivos de recidiva e da ocorrência de um segundo tumor primário (INTERCHANGE, 2022).

2.2 LARINGE

Anatomicamente, a laringe é composta pelas cartilagens da tireóide, aritenoide e cricóide e está subdividida em três sítios, supraglote, glote e subglote. A supraglote consiste na epiglote, cordas vocais falsas, superfícies lateral e superior dos ventrículos, pregas ariepiglóticas e aritenóides. A glote inclui as cordas vocais verdadeiras e a comissura anterior. A subglote tem 2 cm de comprimento e se estende de 10 mm abaixo do ápice ventricular até a margem inferior da cartilagem cricóide (Figura 4) (DEVITA JR; LAWRENCE; ROSENBERG, 2019; STEUER et al., 2017b).

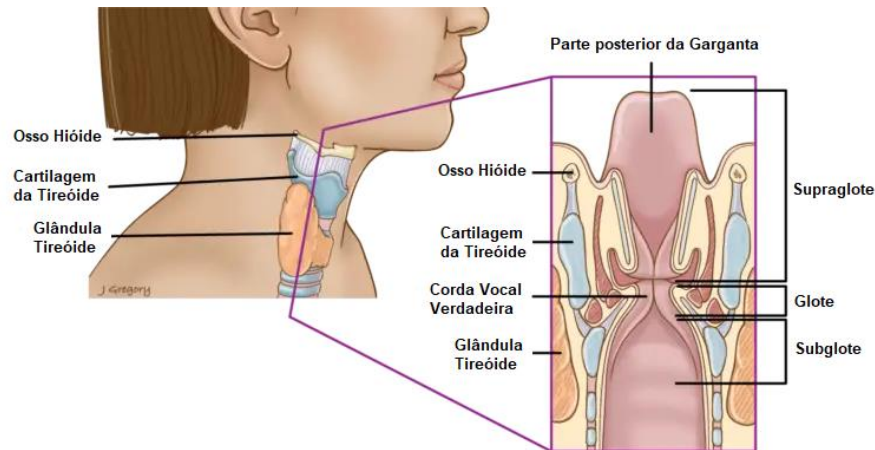


Figura 4 - A anatomia da laringe (THANC GUIDE, 2022).

Fisiológica e primariamente, a laringe é responsável pela manutenção das vias aéreas, durante a deglutição e respiração. Posteriormente, foi elucidada a sua relação com a fonação. Denk et al (1998) descrevem a função da laringe durante a deglutição como protetora da via aérea através do reflexo do processo de deglutição que induz ao fechamento laríngeo em três níveis e um movimento anterossuperior da laringe e do osso hióide, fazendo com que o alimento não seja direcionado para o pulmão, comprometendo a via aérea laríngea. Por sua vez, a via aérea laríngea é mantida pela circunferência da cartilagem cricóide. Já a fonação pode ser explicada pela teoria mioelástica-aerodinâmica. Essa teoria é baseada no efeito Bernoulli que diz que a pressão do ar proveniente dos pulmões, ao passar pela laringe, distancia as pregas vocais e, em seguida, com a diminuição dessa pressão as pregas vocais voltam a reaproximar-se. Esse ciclo se repete a cada novo curso de ar (BEHLAUL, 2001).

2.3 DIAGNÓSTICO

Considerando a função fisiológica da laringe, vários sintomas comuns devem ser avaliados numa investigação clínica, tais como rouquidão, disfonia,

dispneia e dificuldade de deglutição. Esses sintomas podem variar de acordo com o sítio acometido. As queixas iniciais dos pacientes são rouquidão e dor à deglutição. Em tumores mais avançados os principais sintomas incluem disfagia, perda de peso, mau hálito, aspiração e obstrução das vias aéreas. Ao exame físico, uma massa cervical pode ser o primeiro sinal de um câncer supraglótico (DEVITA JR; LAWRENCE; ROSENBERG, 2019).

Como a sintomatologia do câncer de laringe não é específica faz-se necessária uma avaliação inicial que inclua uma história detalhada do início dos sintomas e um exame físico específico para averiguar os fatores de risco e a severidade dos sintomas. Essa avaliação clínica geralmente é acompanhada de uma laringoscopia com biópsia para conclusão do diagnóstico. Avaliações de imagem por tomografia computadorizada, ressonância magnética e tomografia com emissão de pósitrons (PET-TC) também são requeridas para obter maiores detalhes quanto ao local, extensão e acometimento em estruturas adjacentes ou à distância dos tumores de laringe (STEUER et al., 2017).

O diagnóstico precoce do carcinoma de laringe geralmente está associado a um bom prognóstico e em maiores chances de cura (BACK; SOOD, 2005). A conduta terapêutica geralmente é uma abordagem multidisciplinar desafiadora uma vez que o órgão está envolvido na vocalização, respiração e deglutição, mas também contribui para o paladar e olfato.

A existência de outros tumores primários sincrônicos é comum, portanto, uma varredura de outras malignidades primárias do trato aerodigestivo superior deve ser realizada. Exames por imagens, como a tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM), ambas com uso de contraste, permitem uma excelente avaliação do tumor primário e dos locais de drenagem nodal. Mais recentemente, a tomografia por emissão de pósitrons (PET-TC) também vem sendo utilizada para estadiamento, avaliação do tratamento e vigilância e apresenta vantagem na detecção de um tumor primário clinicamente oculto. Os exames de imagem tornam-se ferramentas importantes para avaliação de outras áreas pelo tumor, principalmente nos estágios mais avançados, onde é difícil identificar todos os critérios apenas com o uso da laringoscopia e no

exame clínico por apalpação (AJCC CANCER STAGING MANUAL, 2018; STEUER et al., 2017).

O tipo histológico predominante é o carcinoma de epidermóide, também chamado de carcinoma epitelial ou escamoso. As diretrizes de estadiamento são aplicáveis a todas as formas de carcinoma epitelial (AJCC CANCER STAGING MANUAL, 2018). A avaliação histológica é realizada por meio de análise histopatológica, bem como a definição do grau de diferenciação celular.

2.4 ESTADIAMENTO

O estadiamento é a principal ferramenta de classificação utilizada para pacientes com câncer, pois fornece referências capazes de auxiliar na definição do prognóstico e da melhor abordagem terapêutica. A *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) foi fundada em 1959 nos Estados Unidos e em colaboração com a *Union for International Cancer Control* (UICC) mantêm o sistema que é utilizado em todo o mundo, a classificação TNM. Esta classificação fundamenta-se na extensão da doença (T) com base no tumor primário, no comprometimento dos linfonodos regionais (N) e na presença ou ausência de metástases à distância (M) (AJCC, 2017).

A AJCC organiza as diretrizes do estadiamento clínico e publicou o seu primeiro manual em 1977. Em sua versão mais recente, a 8ª edição publicada em 2017 e atualmente em vigor, trouxe como uma das principais modificações para todos os cânceres de cabeça e pescoço a inclusão do extravasamento capsular na classificação de todos os tumores HPV negativos para o estadiamento linfonodal (ANTONIO et al., 2019). O extravasamento capsular ou extensão extranodal nos cânceres de cabeça e pescoço não causados pelo HPV foi considerado importante característica prognóstica e fator crítico durante a revisão do estadiamento.

De acordo com a Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O, ou *International Classification of Disease for Oncology – ICD-O*) a laringe é classificada em 6 categorias considerando sua topografia, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Códigos de Topografia da Laringe segundo CID-O.

Código	Descrição
C10.1	Superfície anterior (lingual) da epiglote
C32.0	Glote
C32.1	Supraglote (superfície laríngea)
C32.2	Subglote
C32.8	Lesão sobreposta da laringe (Estágio pela localização do volume do tumor ou epicentro)
C32.9	Laringe, não especificada (Estágio pela localização do volume do tumor ou epicentro)

Fonte: AJCC, 8ª edição

Para fins de estadiamento clínico, a laringe é dividida em três regiões: supraglote, glote e subglote. A supraglote é composta pela epiglote (porções supra e infra-hióideas), pregas ariepiglóticas, aritenoides e bandas ventriculares (falsas cordas) (Figura 5). A glote é composta pelas superfícies superior e inferior das cordas vocais verdadeiras, incluindo as comissuras anterior e posterior (Figura 6). A subglote é a região que se estende desde o limite inferior da glote até a margem inferior da cartilagem cricóide (AJCC CANCER STAGING MANUAL, 2018).

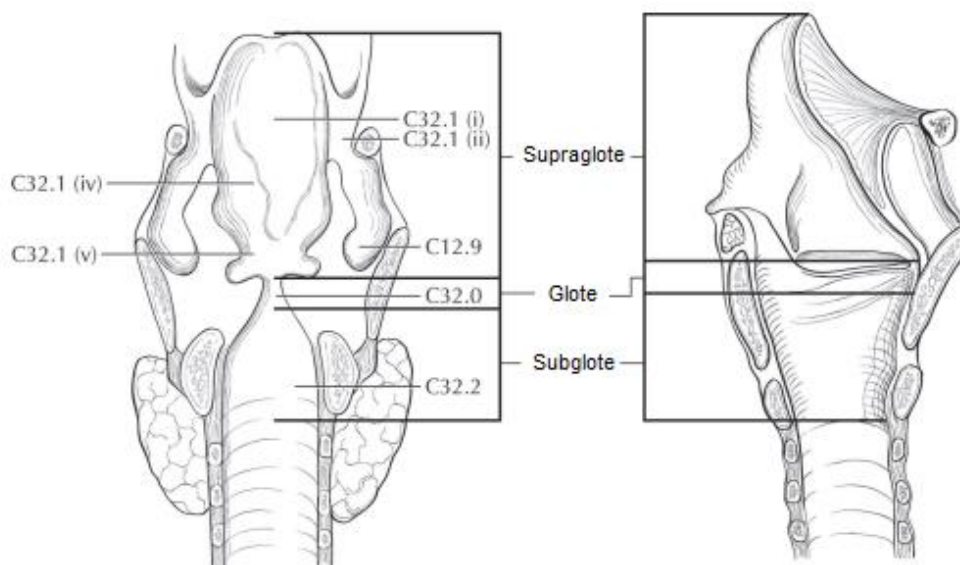


Figura 5 - Sítios anatômicos e subsítios das três regiões da laringe: supraglote, glote e subglote. Os subsítios supraglote (C32.1) incluem epiglote supra-hióidea (i), prega ariepiglótica, aspecto laríngeo (ii), epiglote infra-hióidea (iv) e bandas ventriculares ou falsos cordões (v). Fonte: AJCC, 2018.



Figura 6 - Sítios anatômicos e subsítios da supraglote e da glote. Os subsítios supraglote (C32.1) incluem epiglote supra-hióidea (i), prega ariepiglótica, aspecto laríngeo (ii), aritenóides (iii) e bandas ventriculares ou falsos cordões (v). Os subsítios da glote (C32.0) incluem cordas vocais (i), comissura anterior (ii) e comissura osterior (iii). Fonte: AJCC, 2018

Em resumo, a divisão da laringe entre sítios e subsítios é feita conforme a tabela 2:

Tabela 2 - Divisão da laringe em sítios e subsítios.

Sítio	Subsítio
Supraglote	Epiglote supra-hióide
	Epiglote infra-hióide
	Pregas ariepiglóticas; aritenoides
	Bandas ventriculares
Glote	Cordas vocais verdadeiras, incluindo as comissuras anterior e posterior
Subglote	Subglote

Fonte: AJCC, 2017.

O sistema TNM para tumores de laringe estabelece critérios específicos para definição de T considerando o sítio de acometimento primário.

O acometimento nodal cervical do câncer de laringe varia de acordo com o local de origem e a categoria T do tumor primário. As cordas vocais verdadeiras possuem poucos vasos linfáticos e os tumores que estão limitados à glote raramente se espalham para os linfonodos regionais. No entanto, os tumores avançados de glote podem se disseminar para tecidos moles adjacentes, para linfonodos pré-laríngeos, pré-traqueais, paralaríngeos e paratraqueais, entre outros. A supraglote possui uma rede linfática abundante e interconectada bilateralmente de maneira que os tumores supraglóticos primários usualmente vêm acompanhados por disseminação linfonodal regional, geralmente acometendo linfonodos jugulares superiores e médios, linfonodos submentuais e submandibulares de maneira menos comum e, casualmente linfonodos retrofaríngeos. Os raros tumores primários subglóticos se espalham inicialmente para os tecidos moles adjacentes e linfonodos pré-laríngeos, pré-traqueais, paralaríngeos e paratraqueais, depois para os linfonodos jugulares médios e inferiores. Qualquer manipulação anterior no pescoço, por meio de cirurgia ou radiação, pode alterar os padrões normais de drenagem linfática, resultando em distribuição incomum da disseminação regional da doença para os linfonodos cervicais (AJCC CANCER STAGING MANUAL, 2018).

Em pacientes com linfadenopatia regional volumosa é comum a ocorrência de metástases à distância. Nesses casos, os sítios mais comuns de implantes secundários são os pulmões, seguidos dos esqueléticos ou hepáticos (AJCC CANCER STAGING MANUAL, 2018).

O estadiamento clínico dos tumores de laringe é essencial e sua avaliação usualmente inicia-se com um exame clínico direcionado e laringoscopia. Durante a avaliação clínica do pescoço as massas nodais devem ter seu tamanho mensurado. Para a laringe, há três categorias de linfonodos clinicamente envolvidos, classificados como N1, N2 e N3. Faz-se necessário avaliar os linfonodos regionais quanto ao nível do pescoço envolvido. Além disso, a evidência inequívoca de extensão extranodal (ENE), também chamada de extravasamento capsular macro é indício suficiente para classificar o caso como ENE clínico (ENEc) ou ENE (+) para a definição clínica de N. A ENE envolve a invasão de pele, infiltração da musculatura, fixação a estruturas adjacentes pelo exame clínico ou invasão do nervo craniano, plexo braquial, tronco simpático ou nervo frênico com disfunção. Exames de imagem evidenciando margens espiculadas amorfas de linfonodos ou envolvimento de gordura internodal resultando em alteração do formato oval a redondo normal sugerem disseminação extranodal. Todavia, esses achados isolados não são suficientes para documentar o ENE (+) sem qualquer evidência ao exame físico. Nestes casos, o exame patológico é essencial para averiguar a extensão da doença (AJCC CANCER STAGING MANUAL, 2018; DEVITA JR; LAWRENCE; ROSENBERG, 2019).

O estadiamento patológico utiliza-se das informações obtidas no estadiamento clínico e do estudo histológico a amostra tumoral. A análise anatomopatológica da ressecção completa do sítio primário e/ou de dissecções nodais regionais permite a definição de pT e/ou pN. Para carcinomas escamosos a classificação histopatológica é recomendada, bem como a definição do grau do tumor. Também é aconselhável determinar, quando possível, a profundidade de invasão do tumor primário e a presença ou ausência de invasão vascular e invasão perineural (AJCC CANCER STAGING MANUAL, 2018).

Na linfadenectomia a descrição patológica deve detalhar sobre o tamanho, número, localização dos linfonodos envolvidos e a presença/ausência de ENE. Em casos de linfonodos metastáticos cirurgicamente ressecados também se deve investigar sobre a presença/ausência de ENE. O exame anatomopatológico é instrumento fundamental para documentar a extensão da doença. Se houver detecção de ENE em um exame histopatológico, este será chamado de ENE_{mi}, se $\leq 2\text{mm}$, ou de ENE_{ma}, se $> 2\text{mm}$. Em ambos os casos a classificação será de ENE (+) para determinação de pN (AJCC CANCER STAGING MANUAL, 2018).

Contudo, apesar de apresentar informações importantes, o estadiamento patológico não sobrepuja o estadiamento clínico, mas ambos compõem a propedêutica que definirá o diagnóstico e norteará quanto ao tratamento.

De acordo com 8ª edição do AJCC (2018), a definição de M é única para o órgão e classifica-se pela presença ou ausência de metástase à distância.

Em síntese, os critérios prognósticos previamente descritos são identificados e agregados em grupos de estadiamento, conforme tabela 3.

Tabela 3 - Grupos de estadiamento AJCC 8ª ed. para tumores de laringe.

Quando T for	e N for	e M for	então o Grupo será
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	I
T2	N0	M0	II
T3	N0	M0	III
T1, T2, T3	N1	M0	III
T4a	N0, N1	M0	IVa
T1, T2, T3, T4a	N2	M0	IVa
Qualquer T	N3	M0	IVb
T4b	Qualquer N	M0	IVb
Qualquer T	Qualquer N	M1	IVc

Fonte: AJCC, 2017.

É recomendado ainda o registro e acompanhamento de outros dados que atualmente já apresentam evidências de atuarem como fatores prognósticos, tais como a presença/ausência de ENE; comorbidades e seus impactos no *status* geral do paciente; e hábitos de vida, como o consumo de bebidas alcóolicas, tabaco, estado nutricional e histórico de depressão. Essas informações irão contribuir para o modelo de avaliação de risco e poderão ser utilizadas no futuro para aprimorar ainda mais a capacidade preditiva do sistema de estadiamento (AJCC CANCER STAGING MANUAL, 2018).

2.5 TRATAMENTO

Tradicionalmente, o tratamento para câncer de laringe se resumia a laringectomia total e radioterapia, tanto de modo combinado como isolado. No entanto, com o avanço das tecnologias nos campos da radioterapia e das técnicas cirúrgicas, além do entendimento da importância da modalidade de tratamento escolhida na qualidade de vida e nos eventos adversos, atualmente o tratamento considera alternativas que visam preservar o órgão e suas funcionalidades (CHAWLA; CARNEY, 2009).

Independente do sítio primário, o tratamento da doença inicial (estágios I e II) geralmente é realizado por cirurgia conservadora ou radioterapia (RT). Dentre as técnicas existentes destacam-se as abordagens cirúrgicas abertas, tais como a laringectomia parcial vertical, laringectomia supraglótica e laringectomia supracricoidea, e as técnicas endoscópicas como a microcirurgia transoral a laser, ablação por radiofrequência e a cirurgia robótica transoral (ANTONIO et al., 2019).

A laringectomia parcial vertical ou aberta é realizada para tumores glóticos T1 extensos e T2 com extensão mínima para supraglote ou subglote, tumores glóticos iniciais de difícil visualização endoscópica e cirurgia de resgate. Para os casos em que há envolvimento da cartilagem tireóidea, da junção

cricoaritenóide e envolvimento de mais de 1/3 da corda vocal contralateral, esta abordagem é contraindicada. Apesar desta técnica produzir taxas de cura comparáveis para lesões de cordas vocais T1 ou T2 selecionadas, a RT geralmente é preferida porque é menos onerosa e a qualidade da voz é superior (ANTONIO et al., 2019; DEVITA JR; LAWRENCE; ROSENBERG, 2019).

A laringectomia supraglótica é indicada para tumores supraglóticos T1 e T2 e para pacientes com lesão anatomicamente viável, doença cervical ressecável e reserva pulmonar adequada para suportar aspiração temporária. As restrições anatômicas representam um desafio por apresentarem associação com espaço pré-epiglótico e paraglótico, rica drenagem linfática com maior risco de metástase linfática, limites anatômicos distintos decorrentes da origem embriológica da membrana bucofaríngea. A RT é recomendada para pacientes que não têm indicação cirúrgica ou também como combinação para controlar a doença do pescoço (ANTONIO et al., 2019; DEVITA JR; LAWRENCE; ROSENBERG, 2019).

Para tumores glóticos, transglóticos e supraglóticos T1, T2 e T3, alguns casos específicos de tumores T4 com invasão exclusiva da lâmina interna da cartilagem tireóidea é indicada a laringectomia supraticóidea. No entanto, quando há envolvimento do espaço inter-aritenóideo, comissura posterior, de ambas aritenóides, fixação de aritenóide, extensão subglótica, extensão extralaringea, invasão do osso hioide e invasão do espaço pré-epiglótico, essa técnica não é indicada (ANTONIO et al., 2019).

Outra técnica utilizada é a laringectomia *near* total que, ao contrário das anteriores, exige o uso definitivo da cânula de traqueostomia. Ela também permite a criação de *shunt* estreito que comunica a traqueia e a faringe, e com isso possibilita a emissão de sons com vibração da aritenóide remanescente. Geralmente esta técnica é aplicada às lesões glóticas T3 que não apresentam envolvimento de ambas aritenóides, de maior parte do espaço inter-aritenóideo ou envolvimento da área pós-cricóide (ANTONIO et al., 2019).

A laringectomia total é indicada para tumores T3, quando as abordagens parciais não se aplicam ou quando as condições clínicas do paciente não permitem, e para tumores T4. Geralmente ela é associada ao esvaziamento cervical (níveis II, III e IV). No entanto, para cirurgias de resgate o esvaziamento cervical não é realizado (ANTONIO et al., 2019).

Em muitos centros oncológicos a RT é o tratamento inicial e a cirurgia é indicada para resgate de falhas à RT. Alguns estudos retrospectivos mostraram taxas de controle local variando de 81% a 95% em tumores T1 e de 70% a 80% em tumores T2 de laringe, valores semelhantes aos adquiridos com a cirurgia. A técnica padrão utilizada é a RT conformacional ou 3D. A IMRT também é utilizada, porém há indícios de que essa técnica possa estar associada à diminuição da sobrevida global (SG) (ANTONIO et al., 2019; DEVITA JR; LAWRENCE; ROSENBERG, 2019).

Para o tratamento de doença localmente avançada ressecável (T3 e T4a) é importante avaliar a preservação do órgão funcional. Para tumores T3 com indicação de laringectomia total a sugestão de tratamento é RT associada à quimioterapia. Para tumores T4 a conduta terapêutica habitual é laringectomia total seguida de RT ou de radioquimioterapia adjuvante. Quimioterapia concomitante ou prévia à RT é utilizada no tratamento de doença localmente avançada irressecável (ANTONIO et al., 2019).

Quando houver recidiva local ou regional o tratamento de escolha é a cirurgia de resgate. No entanto, se a doença for irressecável, a terapêutica deve ser personalizada, podendo-se optar por reirradiação, quimioterapia paliativa ou cuidados paliativos. Para doença metastática o tratamento é sistêmico e a quimioterapia é escolhida considerando parâmetros como o *performance status*, idade, comorbidades, tratamentos prévios e preferência do paciente. Neste caso, os objetivos principais são controlar a sintomatologia, melhorar a qualidade de vida e aumentar a SG e a sobrevida livre de doença (SLD) (ANTONIO et al., 2019).

Os medicamentos utilizados nos tratamentos sistêmicos para a doença localmente avançada ou metastática de laringe variam de acordo com o

protocolo. As quimioterapias (QT) mais utilizadas são: a cisplatina, um agente alquilante que ao ligar-se ao DNA promove a inibição da transcrição e replicação, induzindo a apoptose celular; o fluorouracil, um análogo de pirimidina, inibe a enzima timidilato sintase que atua na formação de componentes que são adicionados à fita de DNA e, ao fazer isso impede a duplicação do DNA e das células; e o docetaxel, um taxano com ação antimetabólica que atua nos microtúbulos de tubulinas, estabilizando-os e, conseqüentemente, alterando o equilíbrio celular, resultando em apoptose. Para o protocolo de indução de doença volumosa (T ou N) são realizados 03 ciclos de cisplatina, fluorouracil e docetaxel seguido de cisplatina isolada com RT. De forma geral, o protocolo padrão é realizado com cisplatina isolada, semanalmente na dose de 40mg/m², ou a cada 21 dias na dose de 100mg/m². Estas medicações atuam em nível de DNA celular, tanto das células tumorais quanto das células saudáveis, o que explica o alto grau de toxicidade.

Com o avanço da ciência, terapias-alvo foram desenvolvidas, muitas das quais têm por objetivo estimular o sistema imunológico contra o câncer, chamadas de imunoterapia, e algumas são utilizadas no tratamento do carcinoma epidermóide de laringe (CEL). Dentre elas podemos citar o cetuximabe, um anticorpo monoclonal que se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*) O EGFR atua na via de sinalização que envolve a progressão do ciclo celular, angiogênese, migração e invasão celular e está presente na superfície de células tumorais humanas. A ligação cetuximabe-EGFR tem maior afinidade do que o ligante endógeno e, por isso inibe a função do receptor, resultando na inibição da proliferação e indução da apoptose das células tumorais que expressam EGFR (MERCK S/A, 2013). O cetuximabe é uma alternativa terapêutica para CEL de laringe, mas por provocar radiodermite não é amplamente utilizada.

A imunoterapia contra o câncer vem sendo desenvolvida arduamente com o objetivo de desenvolver tratamentos eficazes e mais específicos, capazes de estimular o sistema imunológico contra o câncer. A proteína 1 de morte celular programada (PD-1) é um inibidor das respostas imunes adaptativas e inatas e é altamente expresso e células T específicas do tumor (HU et al., 2020).

O nivolumabe e o pembrolizumabe, são anticorpos monoclonais que se ligam ao receptor de morte programada 1 (PD-1) e inibem a interação com seus ligantes, PD-L1 e PD-L2. Como o receptor PD-1 é um *checkpoint* que limita a atividade das células T, ao bloquear a ligação de PD-1 com seus ligantes, estas medicações são capazes de reativar os linfócitos T citotóxicos específicos do tumor no microambiente tumoral e a imunidade antitumoral. Para CEL de laringe, ambas as medicações são utilizadas, sendo que o nivolumabe é preferencialmente prescrito em casos paliativos. Pembrolizumabe é prescrito em combinação com quimioterapia (cisplatina e flurouracil) como tratamento de 1ª linha para pacientes com doença metastática ou quando houver recidiva e o paciente não for elegível para nova ressecção ou tratamento bimodal com QT + RT. Pembrolizumabe também pode ser prescrito como monoterapia para doença metastática ou recidivada, porém, Burtiness et al (2019) demonstraram taxas de sobrevida global superiores quando utilizado em combinação com quimioterapia em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, incluindo laringe.

2.6 MICROAMBIENTE TUMORAL E INFILTRADO INFLAMATÓRIO

O microambiente tumoral (TME, do inglês *tumor microenvironment*) é considerado parte importante no processo de iniciação e disseminação das neoplasias malignas e vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de descrever melhor o papel do microambiente tumoral na progressão do tumor e os mecanismos envolvidos. Acredita-se que sua melhor compreensão possa contribuir na identificação de biomarcadores preditivos de resposta que possam influenciar no resultado terapêutico (ELMUSRATI; WANG; WANG, 2021; SADEGHI RAD et al., 2021).

O microambiente tumoral possui características importantes que desempenham papel fundamental no metabolismo do câncer, tais como as condições de pH ácido, hipóxia, peróxido de hidrogênio endógeno e a

expressão alterada de proteínas da matriz extracelular (MEC). O pH ácido aumenta a expressão de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial A (VEGFA) e interleucina-8 (IL-8), importantes para a migração e invasão das células tumorais. As células do centro da massa tumoral são privadas de oxigênio pela distância dos vasos sanguíneos e precisam regular os fatores angiogênicos induzíveis de hipóxia, como o VEGF. Todavia, a neovascularização promove vasos sanguíneos funcional e fenotipicamente diferentes dos vasos normais, pois os vasos associados ao tumor são rimbos e mal perfundidos. Além disso, as células endoteliais dos vasos associados ao tumor possuem fluxo não laminar e têm múltiplas lacunas que contribuem para o vazamento vascular, promovendo coagulação sanguínea e edema no tecido local. Não obstante, a superexpressão do fator alfa induzível por hipóxia (HIF- α) e do fator 1-beta induzível por hipóxia (HIF1 β), principais mediadores da via de resposta hipóxica, mostrou estar relacionada ao crescimento tumoral, uma vez que são capazes de se conectarem a elementos de resposta de hipóxia de genes envolvidos na sobrevivência tumoral e angiogênese (CURRY et al., 2014; SADEGHI RAD et al., 2021; WANG et al., 2021).

A inflamação persistente associada ao câncer está relacionada ao comprometimento e deterioração dos processos imunológicos normais, contribuindo para a tumorigênese, para a angiogênese e produção de ROS (ZHANG; VEERAMACHANENI, 2022).

As espécies reativas de óxidos (ROS), em particular o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), demonstraram exercer ação crítica em diversos processos fisiológicos. A concentração intracelular de H₂O₂ em condições fisiológicas é necessária para a harmonia de diferentes processos em células e órgãos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, migração e angiogênese. Entretanto, em condições fisiopatológicas, ocorre a oxidação inespecífica de proteínas e danos reversíveis e irreversíveis de outras macromoléculas intracelulares, interferindo em suas funções. As células tumorais utilizam a produção de ROS para modular vias de sinalização e transcrição, aumentar a taxa de proliferação, mediar o metabolismo celular e se adaptar a condições hipóxicas

(ELMUSRATI; WANG; WANG, 2021; SADEGHI RAD et al., 2021; WANG et al., 2021).

As células imunes no TME desempenham inúmeras funções que podem mudar à medida que o tumor progride, como é o caso dos neutrófilos que passam de um fenótipo inflamatório para um imunossupressor. Papéis opostos no câncer, tanto supressores quanto promotores de tumores, foram descritos também para células T CD4+, T CD8+, natural *killer* (NK) e macrófagos. As células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) respondem a citocinas no ambiente, adotando um fenótipo tolerogênico e secreção de citocinas inflamatórias. As células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs - *myeloid-derived suppressor cells*) também contribuem para a imunossupressão e aumentam o potencial metastático das células cancerígenas. Os macrófagos associados ao tumor são heterogêneos e desempenham diferentes papéis na invasão tumoral e na angiogênese baseados em seu fenótipo, podendo ser inflamatório (M1) ou imunossupressor (M2, promotor de tumor). A proporção de macrófagos M2 é maior que a de M1 no microambiente tumoral e geralmente está associada a mau prognóstico. A inflamação induzida por vários estímulos, incluindo terapia, modula o microambiente e pode promover o crescimento e progressão do tumor.

A inflamação sistêmica refletida pela relação neutrófilo/linfócito (RNL) é estudada em diferentes processos inflamatórios, mostrando-se como biomarcador útil na diferenciação de lesões benignas e malignas. No cenário oncológico, já foi estudada em diversos grupos de câncer e foi relacionada com prognóstico e sobrevida (DUZLU et al., 2015).

Durante o desenvolvimento do tumor, ocorre a diminuição dos níveis de expressão das proteínas da MEC que estão envolvidas na ligação célula-célula. Há na tumorigênese a indução da expressão de proteínas matrissômicas que são responsáveis pela migração celular e invasão tumoral, incluindo fibronectina, proteína de matriz oligomérica de cartilagem, catepsina B e cadeia de colágeno alfa-1. Ocorre ainda alteração da composição celular das células vizinhas. No tecido normal a infiltração de células imunes é

limitada, enquanto que no tecido tumoral há intensa inflamação associada ao tumor e aumento significativo de leucócitos (SADEGHI RAD et al., 2021).

Os neutrófilos são os leucócitos circulatórios que mais são recrutados para os tumores e desempenham papel fundamental nas respostas inflamatórias. Foi descoberto que no contexto da tumorigênese os neutrófilos liberam fatores de crescimento e citocinas no microambiente tumoral, o que irá afetar diretamente o crescimento do tumor. Foi descrito que o VEGF, um fator de crescimento derivado de neutrófilos, promove o crescimento do tumor regulando a angiogênese. Em contrapartida, o interferon-gama (IFN- γ) demonstrou suprimir o desenvolvimento do tumor por recrutamento e ativação de células imunes adaptativas e inatas. Ainda foi relatado que os neutrófilos associados ao tumor (TANs) secretam metaloproteases de matriz (MMPs), promovendo a reorganização da MEC (SADEGHI RAD et al., 2021).

Os linfócitos T são os componentes centrais da resposta antitumoral, regulando a resposta imuno adaptativa e induzindo a resposta citotóxica aos tumores. As células T CD4⁺ são células imunes linfoides envolvidas na resposta imune adaptativa e atuam através da secreção de várias quimiocinas. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) de classe II apresenta os antígenos expressos na superfície das células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T CD4⁺ que, por sua vez, irão modular o estado e função de outras células imunes. A depender da diferenciação das células CD4⁺, elas podem exercer função imunoativadora, ao inibir o crescimento das células tumorais, ou imunossupressora, promovendo o crescimento das células neoplásicas. Vários mecanismos foram demonstrados para descrever a ação mediadora da resposta antitumoral das células T CD4⁺. As células T *helper* tipo 1 (Th1), uma das populações CD4⁺ mais estudadas, são responsáveis pela imunidade contra patógenos intracelulares, aumentando a resposta de células T CD8⁺ e ativando macrófagos para fagocitar estes patógenos. Contudo, no ambiente tumoral as células Th1 induzem a resposta de células T CD8⁺ aumentando a capacidade estimuladora das células dendríticas (DCs). Por conseguinte, as DCs podem atrair, reestimular e expandir as células T CD8⁺ específicas do tumor. As

células Th1 também secretam citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , capazes de aumentar a diferenciação de células T CD8+ e também de deter o crescimento de células tumorais, induzindo a senescência. Além disso, as células T CD4+ também podem se diferenciar em células T reguladoras (Tregs) que expressam o marcador de proteína P3 (FoxP3), um repressor transcricional necessário para a maturação e funcionalidade imunossupressora e, com isso promover a imunidade antitumoral. As Tregs também contribuem para a prevenção da resposta imune exacerbada contra patógenos e inibição de doenças autoimunes. Vários estudos demonstraram que as Tregs promovem a progressão do câncer, impedindo a imunidade efetiva. Com isso, descobriu-se que as Tregs infiltrantes de tumor expressam uma grande quantidade de moléculas de superfície celular envolvidas na inibição das células T CD8+, como por exemplo os ligantes de morte programada 1 e 2 (PD-L1 e PD-L2). Quando expressos em Tregs, o PD-L1 e PD-L2 ligam-se aos receptores de morte programada (PD-1) das células T CD8+, resultando na inibição da sinalização do receptor de células T (TCR) e, conseqüentemente, impedindo a ação das células T CD8+. As Tregs ainda secretam interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β) a fim de inibir a infiltração e a atividade das células T tumor-específicas e, com isso, silenciar a imunidade antitumoral. Estudos foram realizados a fim de avaliar os mecanismos envolvidos na interação entre anticorpos anti-CDLA-4 e anti-PD-1 e o infiltrado linfocitário tumoral (TIL – *tumor-infiltrating lymphocytes*) CD4+ e CD8+ e os resultados evidenciaram um aumento das células T após o tratamento com esses inibidores de checkpoint imunológico, sugerindo uma indução da resposta imune efetiva nos tumores (CURRY et al., 2014; SADEGHI RAD et al., 2021).

Os principais componentes da resposta imune adaptativa são as células T CD8+ que reconhecem os peptídeos antigênicos através da interação com os TCRs. Após exposição aos peptídeos antigênicos, as células T naíve são ativadas e realizam expansão clonal e se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs – *cytotoxic T-lymphocytes*). Os CTLs derribam as células-alvo ao liberar grânulos citotóxicos ou por induzir a apoptose mediada pelo primeiro ligante do

receptor de sinal de apoptose (FasL – *first apoptosis signal ligand receptor*) (CURRY et al., 2014; SADEGHI RAD et al., 2021).

Consta que os linfócitos T possuem a capacidade de assumir três estados funcionais distintos nos tumores humanos, a saber: naïve, citotóxico e disfuncional. Estudos mostraram que as células T naïve expressam principalmente proteínas que atuam no direcionamento e na adesão destas células às células endoteliais do linfonodo, na autorrenovação e diferenciação. As células T citotóxicas expressam indutores de morte de células-alvo, enquanto que os linfócitos T disfuncionais são caracterizados pela expressão aumentada de proteínas responsáveis pela exaustão e inativação das células T, como por exemplo, PD-1. Seu ligante, o ligante-1 do receptor de morte programada (PD-L1), é uma proteína de superfície que bloqueia a função dos linfócitos T e é expressa em células malignas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e também em fibroblastos associados ao câncer (CAFs – *cancer-associated fibroblasts*). (CURRY et al., 2014; SADEGHI RAD et al., 2021).

2.7 EXAUSTÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE PD-L1 EM CEL DE LARINGE

Moléculas de *checkpoint* imunológico atuam como fatores de proteção para o sistema imunológico do corpo, pois o regulam a uma intensidade adequada para evitar respostas autoimunes causadas por células imunes exacerbadamente ativadas. Porém, quando superexpressas ou superativadas, ocorre a inibição da função imune (WU et al., 2021).

Os linfócitos T funcionam reconhecendo e destruindo as células aberrantes, infectadas por patógenos e células tumorais. O reconhecimento de tais células acontece através da ligação do receptor de células T (TCR – *T Cell Receptor*) em células T ao peptídeo do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) de células alvo. O resultado dessa

interação é controlado por uma variedade de receptores co-estimuladores e co-inibitórios e seus ligantes, também denominados como *checkpoints* imunológicos. Essas vias de *checkpoints* desempenham papel crítico na limitação do dano tecidual e na manutenção da autotolerância ao regular a quantidade e a atividade funcional das células T antígeno-específicas (SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018).

Quando em constante exposição a antígenos e estimulação persistente, as células T ficam desreguladas, afetando diretamente a sua função e reatividade, levando ao que chamamos de exaustão celular. Essa disfunção das células T pode acarretar aumento da expressão de receptores inibitórios, tais como do antígeno-4 linfócito T citotóxico (CTLA-4, do inglês *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*), dos domínios de mucina e imunoglobulina de célula T (TIM-3, do inglês *T-Cell Immunoglobulin and mucin-domain containing 3*) e PD-L1, e a diminuição da produção de citocinas, como do fator de necrose tumoral humano α (TNF α – *Tumor Necrosis Factor- α Human*), do interferon-gama (IFN- γ) ou interleucina 2 (IL-2) (Figura 7) (WANG et al., 2018)

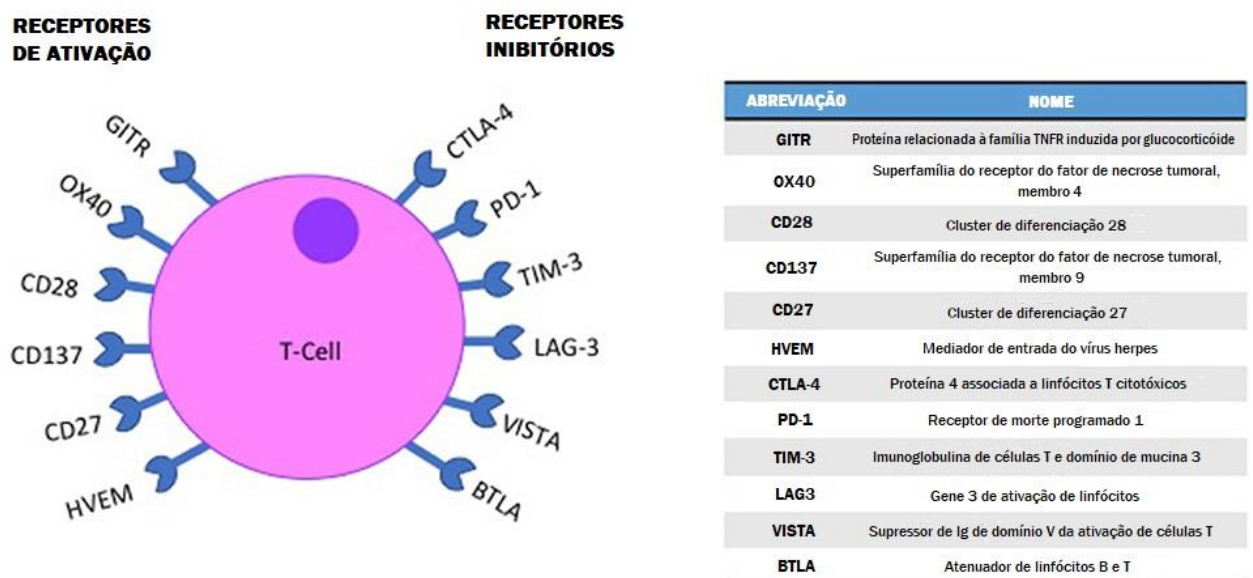


Figura 7 - Checkpoints co-inibitórios e co-estimuladores na regulação imune das células T. Adaptado de Foster e Devlin (2018).

Inúmeras evidências científicas têm demonstrado que as moléculas de *checkpoint* co-inibitórias desempenham um papel crucial na exaustão de células T. Devido seu comprovado valor como alvo terapêutico em inúmeras neoplasias, a via PD-L1 – PD-1 tem se destacado dos demais *checkpoints* imunológicos (SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018).

A proteína PD-1 é uma proteína transmembranar do tipo I composta por um domínio extracelular, região transmembranar hidrofóbica e região intracelular. Os resíduos de aminoácidos C-terminal e N-terminal da região intracelular de PD-1 têm dois sítios de fosforilação independentes: o motivo inibitório baseado em imunorreceptor tirosina (ITIM) e o motivo de troca baseado em tirosina de imunorreceptores (ITSM). Quando o PD-1 se liga ao PD-L1, a região ITSM será fosforilada para ativar uma série de vias de sinalização intracelular e alcançar uma inibição imunológica eficiente. O receptor de PD-1 é um regulador negativo da atividade das células T, que demonstra estar envolvido no controle das respostas imunológicas das células T. As células tumorais ativam constatemente a via de sinalização PD1/PD-L1 superexpressando PD-L1 para desencadear vários mecanismos de supressão imunológica. A ligação do PD-1 com os ligantes PD-L1 e PD-L2, que são expressos nas células apresentadoras de antígenos (APC) e são expressos por tumores ou outras células no microambiente tumoral, resulta na inibição da ativação dos linfócitos T, aumentando a tolerância imunológica das células tumorais e também promovem a apoptose dos linfócitos (JIANG et al., 2019; WU et al., 2021).

As imunoterapias baseadas na via PD-1/PD-L1 demonstraram uma eficácia sem precedentes no tratamento de um conjunto expressivo de cânceres humanos. Todavia, apenas uma pequena parte de pacientes apresentam respostas objetivas ao tratamento e uma fração ainda menor apresenta resposta completa (JIANG et al., 2019).

Neste contexto, o uso de PD-L1 como biomarcador associado à melhor compreensão do infiltrado inflamatório e à relação neutrófilo-linfócito podem contribuir para uma análise prognóstica mais completa e auxiliar na seleção mais precisa de pacientes que poderão se beneficiar potencialmente do tratamento com imunoterapia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de PD-L1 em células neoplásicas e inflamatórias em amostras tumorais de carcinoma espinocelular de laringe.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de neutrófilos e linfócitos associados ao tumor no microambiente tumoral;
- Determinar a RNL em amostra de sangue periférico pré-tratamento;
- Verificar a correlação entre o TIL no microambiente tumoral e as características clinico-patológicas;
- Avaliar a aplicação de TAN, RNL, TIL e PD-L1 como biomarcadores de prognóstico em carcinoma epidermóide de laringe.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Este trabalho foi realizado a partir de amostras tumorais e dados clínicos de pacientes atendidos no serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (HSRC) no período de 2011 a 2015 e recrutados em estudo multicêntrico internacional de caráter observacional longitudinal prospectivo e analítico cujo título é *Study of Head and Neck Cancer in South America* (InterCHANGE). Este estudo é coordenado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS/UFES), processo nº 318/2011 e parecer nº 21/2011.

Para a seleção dos casos foram adotados os seguintes critérios de inclusão: pacientes de ambos os gêneros, de todos os grupos étnicos e faixas etárias, com diagnóstico conclusivo de carcinoma de células epidermóide de laringe (CIDs C32.0, C32.1, C32.2, C32.8 e C38.9). Blocos de parafina contendo tecido tumoral obtidos por biópsia ou ressecção cirúrgica antes do início do tratamento foram disponibilizados pelos pacientes participantes do estudo e submetidos à revisão histopatológica realizada por um patologista. Lâminas e blocos em bom estado de conservação, apresentando tecido tumoral íntegro em mais de 75% da área tecidual total foram incluídos no estudo.

Como critérios de exclusão foram considerados os casos com lâminas e blocos defeituosos ou com menos de 75% de tecido tumoral, os quais impossibilitaram a análise; material tumoral indisponível; recidivas e casos submetidos a tratamentos prévios (cirurgia, quimioterapia e radioterapia).

As variáveis clínicas analisadas foram: idade, gênero, estadiamento clínico (TNM, 8ª edição) e histórico de consumo bebidas alcoólicas e tabaco, obtidos por meio de entrevista, consulta médica e revisão de prontuários. Foram considerados ex-etilistas e ex-tabagistas indivíduos que não relataram uso das

substâncias por no mínimo 12 meses. Também foram coletadas as informações sobre recorrência e óbito.

4.2 RELAÇÃO NEUTRÓFILO-LINFÓCITO

Hemogramas realizados após o diagnóstico e antes do início do tratamento antineoplásico foram avaliados e as contagens absolutas de neutrófilos e linfócitos foram obtidas.

A RNL foi determinada pela razão entre o número de neutrófilos e linfócitos. A partir dos resultados obtidos foi estabelecido um ponto de corte considerando os valores de sensibilidade e especificidade do teste e a relação foi classificada como alta ou baixa. Para identificação do ponto de corte, uma curva ROC foi plotada relacionando os valores de RNL com diferentes prognósticos.

4.3 ANÁLISE DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL

O tecido tumoral incorporado em parafina foi obtido dos repositórios do estudo interCHANGE e dos arquivos do laboratório de patologia do Hospital Santa Rita de Cássia (HSRC). A partir desses blocos foram realizadas secções de 5 µm de espessura para a confecção das lâminas que foram coradas posteriormente pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio no aumento de 2,5x quanto à presença de infiltrado linfocitário tumoral (TIL, do inglês *tumor-infiltrating lymphocytes*).

Para classificação do padrão do infiltrado linfocitário foram utilizados os critérios e escore sugeridos por Marsh e cols. (2011) que definem o TIL em: alto, quando difuso e com presença de infiltrado em mais de 80% do estroma/tumor; moderado, quando irregular e presente entre 20% e 80% do

estroma/tumor; e baixo, quando fraco ou ausente e distribuído em menos de 20% do estroma/tumor.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE DUPLA MARCAÇÃO

Para análise de imuno-histoquímica de neutrófilos e PD-L1, lâminas foram confeccionadas a partir dos blocos de parafina contendo tecido tumoral, os quais foram submetidos a secções de 3 μm de espessura. Inicialmente os fragmentos tumorais das lâminas passaram por processo de desparafinização por calor em estufa a 60 °C durante 1 hora. Em seguida, foram submersos em soluções de xilol, reidratados em soluções de etanol com concentrações graduais à temperatura ambiente e lavados com água destinada.

A recuperação antigênica foi realizada com imersão das lâminas em solução tampão de citrato de sódio (pH = 6,0) que foi aquecida a 90-95 °C em banho-maria por 20 minutos. Após esse tempo, aguardou-se o resfriamento das lâminas e estas foram lavadas com tampão de lavagem (Tris Salino - TBS + Triton X-100, pH = 7,2-7,4). A lavagem das lâminas durante todo o processo de imuno-histoquímica de dupla marcação foi realizado por 3 vezes com intervalo de 5 minutos. Na sequência, foi realizado o bloqueio de proteínas com solução *Protein Block* do kit Novolink™ *Polymer Detection System* (Leica Biosystem, Wetzlar, Alemanha) por 1 hora à temperatura ambiente.

Realizou-se a aplicação do anticorpo primário anti PD-L1 (Abcam *Biotechnology*, Cambridge, MA, EUA), previamente diluído na proporção 1:400, e as lâminas foram incubadas em câmara escura e úmida a 4 °C durante a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com o tampão de lavagem e procedeu-se com o bloqueio da peroxidase endógena, com 3 aplicações com intervalos de 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com o tampão de lavagem e houve a aplicação do sistema de detecção pós-primário, que reagiu por 30 minutos. Foi realizada nova lavagem com o tampão

e logo após a aplicação do polímero conjugado com peroxidase (Novolink™ *Polymer Detection System* – Leica *Biosystem*, Wetzlar, Alemanha), por 30 minutos.

Posteriormente, foi realizada a revelação utilizando 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) à temperatura ambiente por 2 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas com água destilada e procedeu-se com a segunda recuperação antigênica com citrato de sódio em banho maria a 95 °C por 10 minutos. Em seguida, os espécimes foram lavados com solução de lavagem e foi realizado o Segundo bloqueio da proteína por 10 minutos utilizando *Protein Block* do kit Novolink™ *Polymer Detection System* (Leica *Biosystem*, Wetzlar, Alemanha). Realizou-se então a aplicação do anticorpo anti-elastase de neutrófilos (Abcam *Biotechnology*, Cambridge, MA, EUA), previamente diluído na razão 1:100, e as lâminas foram incubadas em câmara escura e úmida a 4 °C *overnight*.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem e foi aplicado o anticorpo secundário e do sistema de detecção conjugado com fosfatase alcalina (Envision™ DuoFLEX, Dako, CA, EUA), o qual reagiu por 30 minutos. Depois desse período, as lâminas foram lavadas e aplicou-se a solução *Permanent Red* para revelação da reação e, após 5 minutos a reação foi interrompida com água destilada. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, que agiu por 2 minutos e, em seguida, foram lavadas com água corrente por 10 minutos e imersas por 10 vezes em água de amônia.

A montagem das lâminas foi realizada com o auxílio de *Ultramount aqueous permanente* (Dako, CA, EUA) sem hidratação com solventes orgânicos.

Como controle positivo foram utilizados cortes de apêndice humano.

A quantificação de neutrófilos foi realizada através da seleção de 10 campos no aumento de 40x. Estes campos continham áreas representativas de estroma e tumor. Foram descartadas áreas de necrose. A contagem de neutrófilos foi realizada e foi realizada a média em cada área.

Para análise, os neutrófilos foram divididos em dois grupos, alto e baixo, conforme ponto de corte adotado pela análise da Curva de Características de Operação do Receptor, curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

A expressão de PD-L1 foi avaliada considerando a marcação membranar e citoplasmática de células tumorais e inflamatórias (macrófagos e linfócitos), utilizando o método *Combined Positive Score* (CPS). O CPS foi obtido através da utilização da fórmula:

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

Utilizando a lente de aumento de 10x, foram selecionadas 10 áreas contendo, no mínimo, 100 células tumorais. Em seguida, trocou-se o aumento para o de 20x e as células tumorais viáveis e as células PD-L1 positivas foram contadas em cada área. Os valores obtidos foram aplicados à fórmula após a contagem de todos os campos a média do CPS foi definida. Os resultados foram divididos em 3 grupos: < 1, 1 a 19 e ≥ 20 .

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio 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 adotados para todos os testes foi de 95%, $p \geq 0,05$.

Foi plotada uma curva ROC para definição do ponto de corte de RNL. O valor de corte foi determinado pelo índice de Youden J que define como a distância máxima entre a curva ROC e a linha diagonal onde os valores de sensibilidade e especificidade são maximizados. A área abaixo da curva (AUC) foi

empregada para avaliar a acurácia do teste em função do ponto de corte. Quanto mais próximo de 1, maior a precisão do teste (LOPES et al., 2014).

O teste do Qui-Quadrado e o exato de Fisher foram utilizados para determinar a associação entre as variáveis independentes.

As curvas de sobrevida foram traçadas pelo método Kaplan-Meier e comparadas com o teste de Long Rank (GOEL et al., 2010). A sobrevida global (SG) foi determinada pelo intervalo entre a data do diagnóstico e a data do óbito ou último acompanhamento. A sobrevida livre de doença (SLD) foi definida pelo tempo entre a data do último tratamento e a data da recidiva ou último acompanhamento. Não foram considerados indivíduos que realizaram tratamento paliativo. As taxas de SG e SLD foram ajustadas para 36 meses.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

No período de 2011 a 2015 foram incluídos 30 pacientes com diagnóstico de CEL atendidos no Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (Vitória-ES). Deste grupo amostral a população do sexo masculino foi predominante, representando 96,7% dos casos, e a idade média apresentada foi de 62 anos no momento do diagnóstico, sendo a idade mínima de 40 anos e a máxima de 89 anos.

Quanto aos fatores de risco relacionados ao consumo de bebidas alcólicas e ao uso de tabaco, a maioria dos indivíduos relatou exposição prévia ou atual às bebidas alcólicas (66,7%) e ao tabaco (90%), sendo que 36,7% relatou uso concomitante.

O sítio anatômico de acometimento primário de maior incidência foi a glote (53,3%), seguido da supraglote (33,3%). A subglote representou 3,3% dos casos. Os casos de lesão sobreposta de laringe (C32.8) e neoplasia maligna de laringe não especificada (C32.9) representaram 10,0% das amostras.

Quanto à classificação TNM, 51,7% dos casos apresentavam doença localmente avançada ou metastática (T3/T4) e 82,8% não apresentaram acometimento nodal (N0) ao diagnóstico.

Estes e outros dados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Características clínico-patológicas dos pacientes com CEL.

Características clínico-patológicas	n	%
Sexo		
Masculino	29	96,7
Feminino	1	3,3
Idade (anos)		
< 60 anos	13	43,3

≥ 60 anos	17	56,7
Sítio anatômico		
Supraglote	10	33,3
Glote	16	53,3
Subglote	1	3,3
Outros	3	10,0
Tabagismo		
Não exposto	3	10,0
Exposto	27	90,0
Etilismo		
Não exposto	10	33,3
Exposto	20	66,7
Tamanho do tumor^a		
T1/T2	14	48,3
T3/T4	15	51,7
Metástase linfonodal^a		
N0	24	82,8
N+	5	17,2
Estadiamento^a		
I/II	13	44,8
III/IV	16	55,2

^aNão informados: tamanho do tumor (n=1), metástase nodal (n=1) e estadiamento (n=1).

5.2 RELAÇÃO NEUTRÓFILO-LINFÓCITO

Uma curva ROC foi plotada relacionando o estado vital (vivo ou óbito) com RNL para determinar o ponto de corte ideal. Este ponto foi determinado a partir da área abaixo da curva (AUC), considerando que quanto mais próximo de 1 for o valor de AUC, mais preciso é o teste.

O ponto de corte ideal obtido foi RNL > 3,64 e a AUC foi de 0,812 ($p=0,001$). Com base nesses dados, os valores de RNL foram segregados em dois grupos: baixa RNL ($\leq 3,64$) e alta RNL ($> 3,64$). Esses resultados estão demonstrados no gráfico da figura 8.

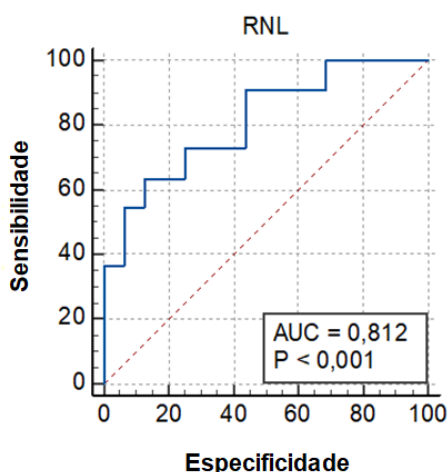


Figura 8 - Curva ROC para RNL em pacientes com CEL. Ponto de corte >3,64; sensibilidade: 63,64; especificidade: 87,50; Índice de Youden J: 0,511; AUC: 0,812.

Também foi realizada a associação de RNL com as características clínico-patológicas, demonstradas na tabela 5. Não foi observada nenhuma relação estatisticamente significativa entre RNL e as variáveis, porém percebe-se uma tendência relacionando o RNL alto e tumores com tamanho T3/T4 ($p=0,050$).

Tabela 5 - Associações entre RNL e características clínico-patológicas em CEL (n=20).

Variáveis clínico-patológicas	RNL baixo		RNL alto		p^*
	n=20	%	n=10	%	
Sexo					
Feminino	1	5,0	0	0,0	1,000
Masculino	19	95,0	10	100,0	
Idade					
<60 anos	7	35,0	6	60,0	0,255
≥60 anos	13	65,0	4	40,0	
Tabagismo					
Não-exposto	2	10,0	1	10,0	1,000
Exposto	18	90,0	9	90,0	
Etilismo					
Não-exposto	5	25,0	5	50,0	0,231
Exposto	15	75,0	5	50,0	
Tamanho^a					
T1/T2	12	63,2	2	20,0	0,050
T3/T4	7	36,8	8	80,0	

N^a					
Negativo	17	89,5	7	70,0	0,306
Positivo	2	10,5	3	30,0	
Estadiamento^a					
I/II	11	57,9	2	20,0	0,114
III/IV	8	42,1	8	80,0	

^aNão informados: tamanho do tumor (n=1), metástase nodal (n=1) e estadiamento (n=1).

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

5.3 NEUTRÓFILOS ASSOCIADOS AO TUMOR

Foram analisadas 26 amostras de CEL quanto à presença de neutrófilos associados ao tumor. Quatro casos não possuíam lamina coradas com hematoxilina e eosina disponíveis e/ou blocos de tumor para confecção das lamina. A quantificação de neutrófilos foi realizada considerando os compartimentos intratumoral e peritumoral.

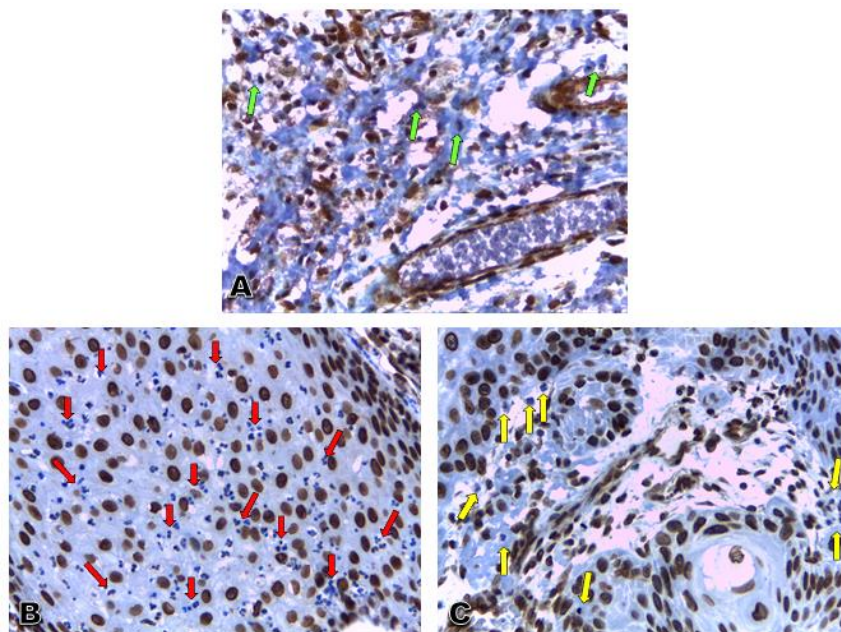


Figura 9 - Neutrófilos associados ao tumor (TAN). (A) controle positivo apêndice; (B) marcação imuno-histoquímica de neutrófilos peritumoral (setas vermelhas); (C) marcação imuno-histoquímica de neutrófilos intratumorais (setas amarelas). Objetiva 40x.

Foram realizadas as associações das características clínico-patológicas com TAN e estão representadas na tabela 6. A correlação entre N negativo e TAN intratumoral apresentou associação estatisticamente significativa ($p=0,020$). As demais variáveis não apresentaram relação significativa em termos estatísticos.

Tabela 6 - Associações entre a média de TAN, intra e peritumoral, com as variáveis clínico-patológicas em CEL (n=26).

Variáveis clínico-patológicas	Peritumoral Média				p^*	Intratumoral Média				p^*
	Abaixo		Acima			Abaixo		Acima		
	n=16	%	n=10	%		n=18	%	n=8	%	
Sexo										
Feminino	0	0,0	1	10,0	0,385	1	5,6	0	0,0	1,000
Masculino	16	100,0	9	90,0		17	94,4	8	100,0	
Sítio										
Supraglote	7	43,8	3	30,0	0,474	7	38,9	3	37,5	0,601
Glote	8	50,0	4	40,0		9	50,0	3	37,5	
Subglote	0	0,0	1	10,0		1	5,6	0	0,0	
Outros	1	6,3	2	20,0		1	5,6	2	25,0	
Tabagismo										
Não-exposto	1	6,3	1	10,0	1,000	2	11,1	0	0,0	1,000
Exposto	15	93,8	9	90,0		16	88,9	8	100,0	
Etilismo										
Não-exposto	7	43,8	3	30,0	0,683	7	38,9	3	37,5	1,000
Exposto	9	56,3	7	70,0		11	61,1	5	62,5	
Tamanho										
T1/T2	7	43,8	4	40,0	1,000	6	33,3	5	62,5	0,218
T3/T4	9	56,3	6	60,0		12	66,7	3	37,5	
N										
Negativo	14	87,5	7	70,0	0,340	17	94,4	4	50,0	0,020
Positivo	2	12,5	3	30,0		1	5,6	4	50,0	
Estadiamento										
I/II	7	43,8	3	30,0	0,683	6	33,3	4	50,0	0,664
III/IV	9	56,3	7	70,0		12	66,7	4	50,0	

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

5.4 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL

Um total de 26 amostras foram avaliadas quanto ao padrão de infiltrado linfocitário, sendo que o padrão predominante foi o moderado, presente em 73,08% das amostras.

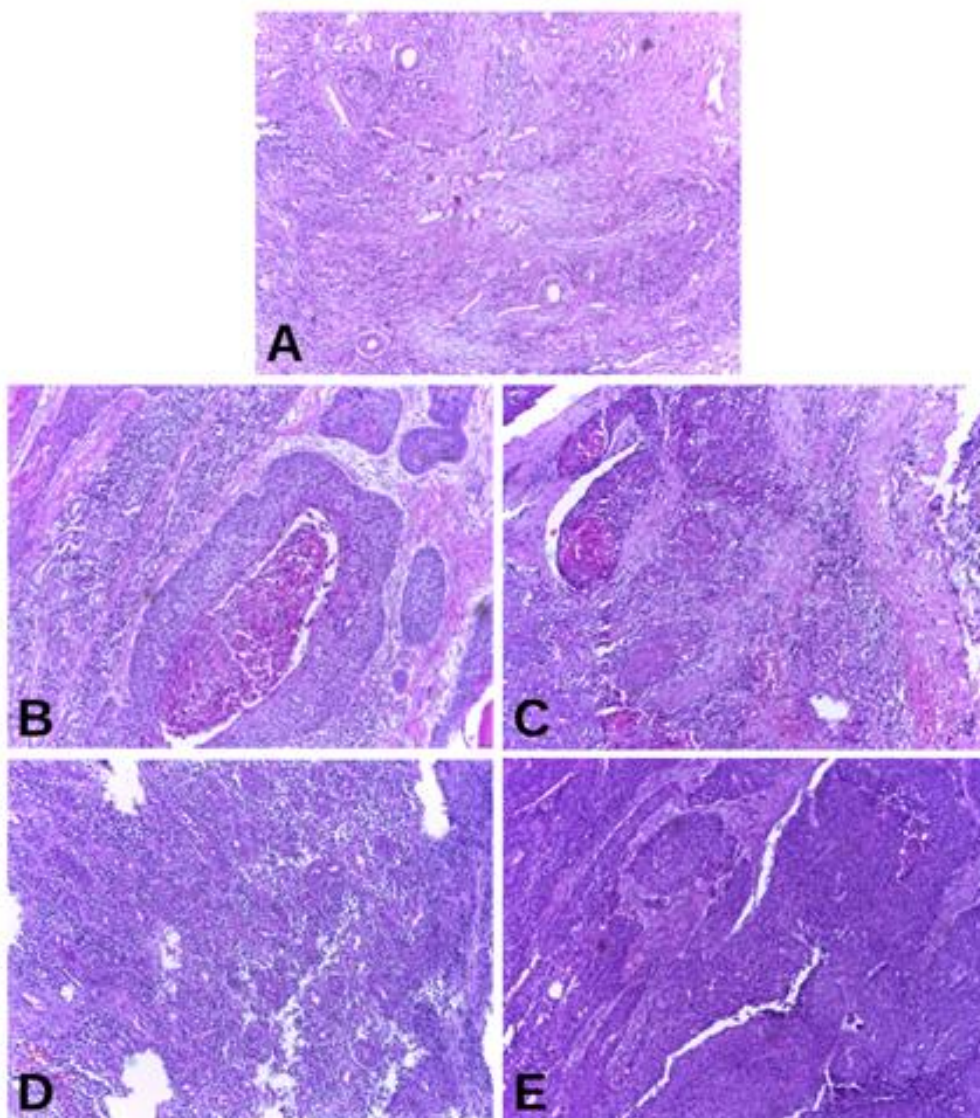


Figura 10 – Fotomicrografia do infiltrado linfocitário tumoral, Em A, padrão de baixo infiltrado linfocitário tumoral; em B e C, moderado em D e E, alto. Coloração HE. Objetiva: 10x.

A correlação com as variáveis clínico-patológicas foi realizada, porém não houve qualquer relação estatisticamente significativa, conforme resultados apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Associações entre TIL e as variáveis clínico-patológicas em CEL (n=26).

Variáveis clínico-patológicas	TIL						p*
	Baixo		Moderado		Alto		
	n=4	%	n=19	%	n=3	%	
Sexo							
Feminino	0	0,0	0	0,0	1	33,3	0,115
Masculino	4	100,0	19	100,0	2	66,7	
Sítio							
Supraglote	3	75,0	6	31,6	1	33,3	0,757
Glote	1	25,0	10	52,6	2	66,7	
Subglote	0	0,0	1	5,3	0	0,0	
Outros	0	0,0	2	10,5	0	0,0	
Tabagismo							
Não-exposto	1	25,0	1	5,3	1	33,3	0,167
Exposto	3	75,0	18	94,7	2	66,7	
Etilismo							
Não-exposto	2	50,0	6	31,6	1	33,3	0,806
Exposto	2	50,0	13	68,4	2	66,7	
Tamanho							
T1/T2	2	50,0	7	38,9	2	66,7	0,692
T3/T4	2	50,0	11	61,1	1	33,3	
N							
Negativo	4	100,0	13	72,2	3	100,0	0,413
Positivo	0	0,0	5	27,8	0	0,0	
Estadiamento							
I/II	2	50,0	6	33,3	2	66,7	0,547
III/IV	2	50,0	12	66,7	1	33,3	

^aNão informados: tamanho do tumor (n=1), metástase nodal (n=1) e estadiamento (n=1).

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

5.5 EXPRESSÃO DE PD-L1

Para a avaliação da expressão de PD-L1 foram consideradas as marcações de membrana e citoplasma de células tumorais e inflamatórias (linfócitos e macrófagos). Todas as células marcadas foram contadas para que fosse calculado o CPS. Um total de 26 amostras foram analisadas e o valor médio de CPS foi de 18,4. Dentre as amostras avaliadas, 20 (76,9%) apresentaram

marcação positiva das células tumorais e todas (100,0%) apresentaram marcação positiva nas células inflamatórias.

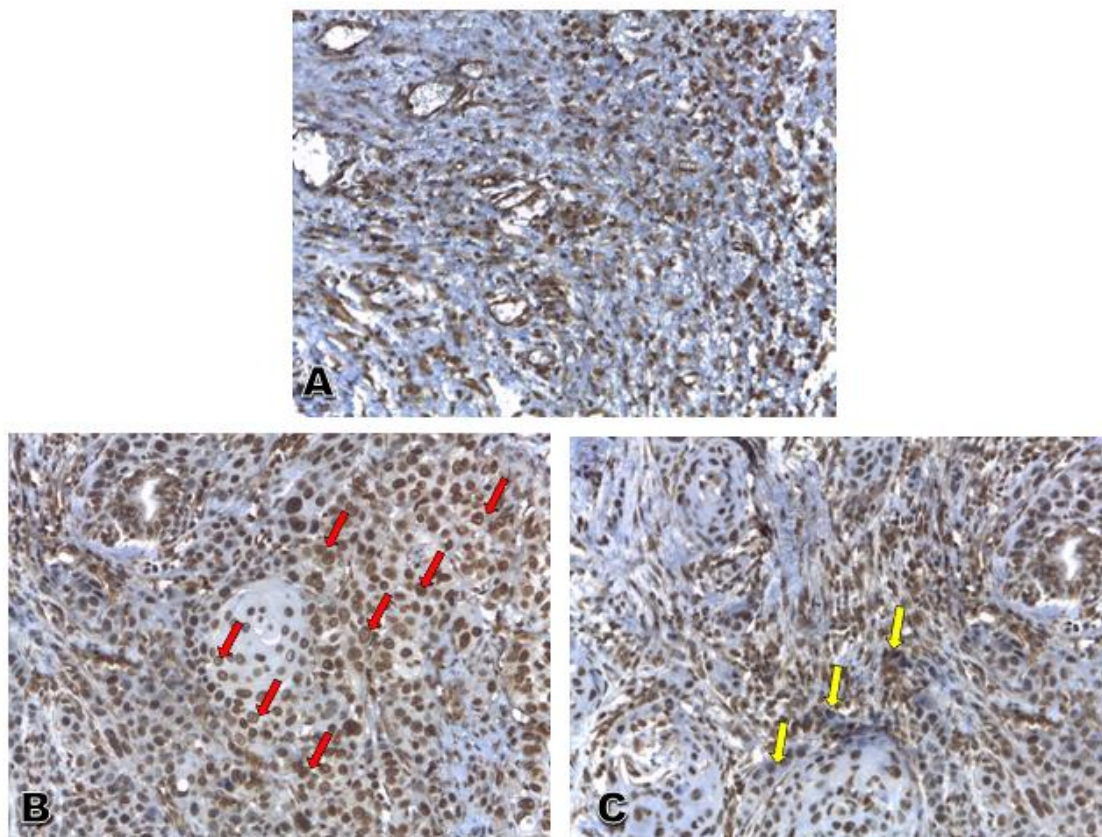


Figura 11 - Expressão de PD-L1. Marcação imuno-histoquímica de PD-L1 nas células tumorais (setas vermelhas) em B e nas células inflamatórias (setas amarelas) em C; (A) controle positivo apêndice. Objetiva 20x.

Conforme dados da tabela 8, não foi observada qualquer relação significativa na associação da expressão de PD-L1 e as variáveis clínico-patológicas.

Tabela 8 - Associação entre PD-L1 e variáveis clínico-patológicas em CEL (n=26).

Variáveis clínico-patológicas	PD-L1 CPS						p*
	< 1		1 - 19		≥ 20		
	n=1	%	n=15	%	n=10	%	
Sexo							
Feminino	0	0,0	1	6,7	0	0,0	1,000
Masculino	1	100,0	14	93,3	10	100,0	
Sítio							

Supraglote	1	100,0	5	33,3	4	40,0	0,300
Glote	0	0,0	9	60,0	4	40,0	
Subglote	0	0,0	1	6,7	0	0,0	
Outros	0	0,0	0	0,0	2	20,0	
Tabagismo							
Não-exposto	0	0,0	1	6,7	2	20,0	0,596
Exposto	1	100,0	14	93,3	8	80,0	
Etilismo							
Não-exposto	0	0,0	7	46,7	2	20,0	0,381
Exposto	1	100,0	8	53,3	8	80,0	
Tamanho							
T1/T2	1	100,0	6	40,0	4	44,4	0,818
T3/T4	0	0,0	9	60,0	5	55,6	
N							
Negativo	1	100,0	13	86,7	6	66,7	0,460
Positivo	0	0,0	2	13,3	3	33,3	
Estadiamento							
I/II	1	100,0	6	40,0	3	33,3	0,642
III/IV	0	0,0	9	60,0	6	66,7	

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

5.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA

5.6.1 SOBREVIDA GLOBAL

Ao término do período de 36 meses, 11 participantes (36,67%) evoluíram à óbito e 3 (10,00%) foram censurados.

Tumores T3/T4, doença avançada (estádios III/IV) e sítio (outros) foram associados a pior sobrevida. Quanto às variáveis metástase linfonodal (N+/N0), etilismo (não exposto/exposto) e tabagismo (não exposto/exposto) não foram encontradas relações significativas com SG, conforme figura 12.

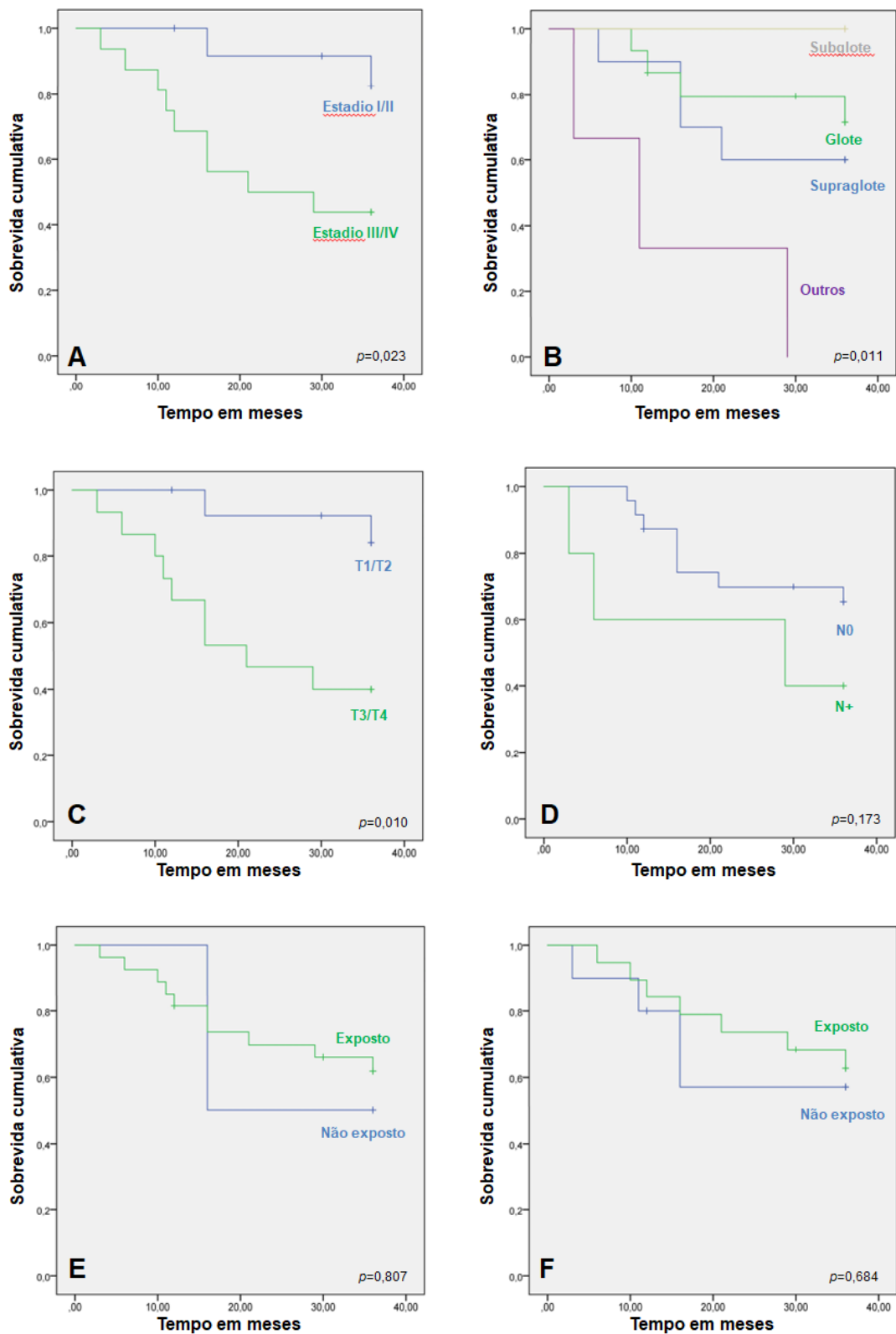


Figura 12 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo estadiamento (A), sítio (B), tamanho do tumor primário (C), metástase linfonodal (D), tabagismo (E) e etilismo (F).

Pacientes com RNL alta tiveram a sobrevida reduzida quando comparados aos pacientes com RNL baixa. A média de sobrevida de indivíduos com RNL alta foi de 20,50 meses, enquanto a média dos participantes com RNL baixa foi de 32,47 meses. Este resultado apresentou significância estatística ($p=0,005$), conforme demonstrado na figura 13.

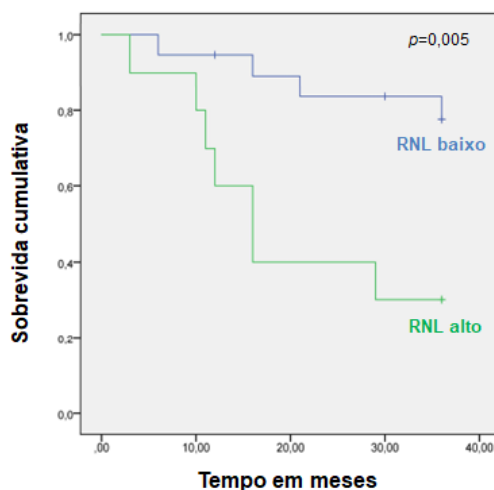


Figura 13 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank, segundo RNL, no período de 36 meses.

A SG em 36 meses de indivíduos que apresentaram alta quantidade de neutrófilos no compartimento peritumoral foi um pouco maior (média de 30,50 meses) do que a dos indivíduos com baixa quantidade (média de 25,35 meses) (figura 14A). Da mesma forma, os participantes com alta densidade neutrofílica na região intratumoral apresentaram uma SG em 36 meses maior (média de 30,00 meses) do que aqueles com baixa concentração (média de 25,68 meses) (figura 14B). Em ambos os casos, não houve diferença significativa.

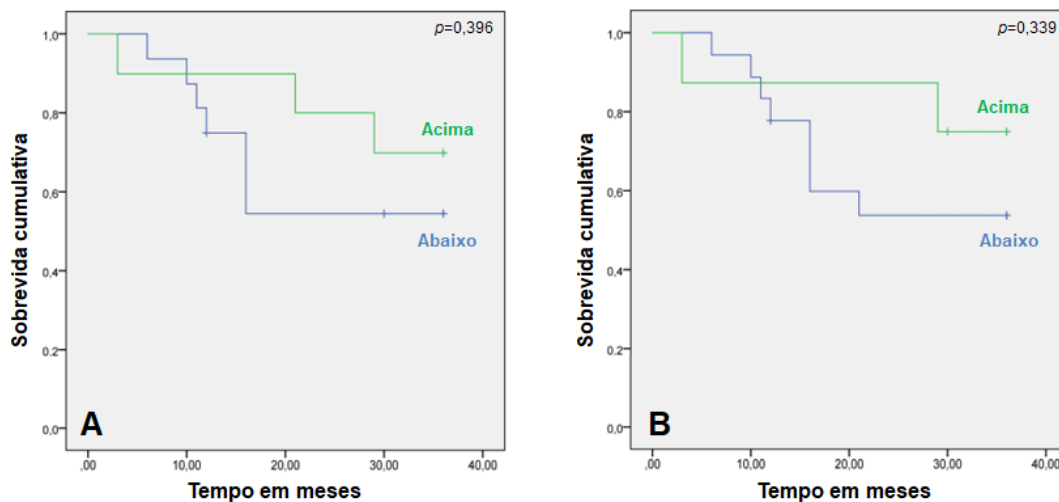


Figura 14 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo TAN. Em A neutrófilos peritumorais e em B neutrófilos intratumorais.

Para o padrão de infiltrado linfocitário não houve significância com as taxas de sobrevida em 36 meses, conforme figura 15.

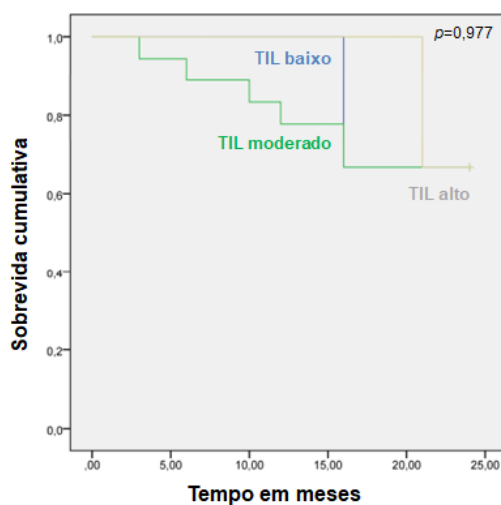


Figura 15 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação ao TIL ($p=0,977$).

Quanto à expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias não houve associação à sobrevida em 36 meses, conforme observado na figura 16.

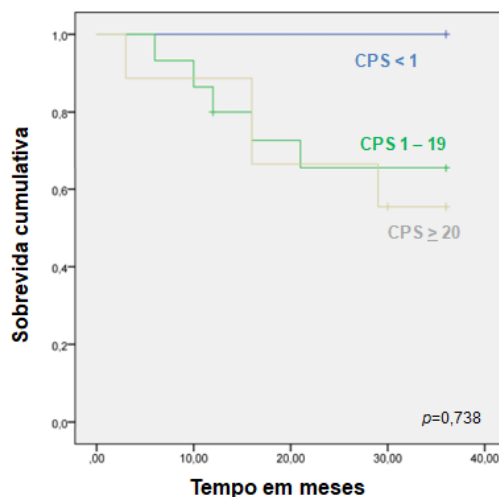


Figura 16 - Curva de Sobrevida Global pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo expressão de PD-L1 nas células tumorais e inflamatórias (CPS) ($p=0,738$).

5.6.2 SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

Para o cálculo da sobrevida livre de doença (SLD) foram considerados recidiva local, regional ou à distância como desfecho final. Sete casos (23,33%) evoluíram com recorrência da doença.

A recorrência da doença foi associada à metástase linfonodal ($p=0,013$) e ao sítio de acometimento primário ($p=0,07$). Não foi observada diferença nas curvas de sobrevida livre de doença comparando o tamanho primário do tumor, ao estadiamento clínico, ao etilismo e tabagismo, conforme figura 17.

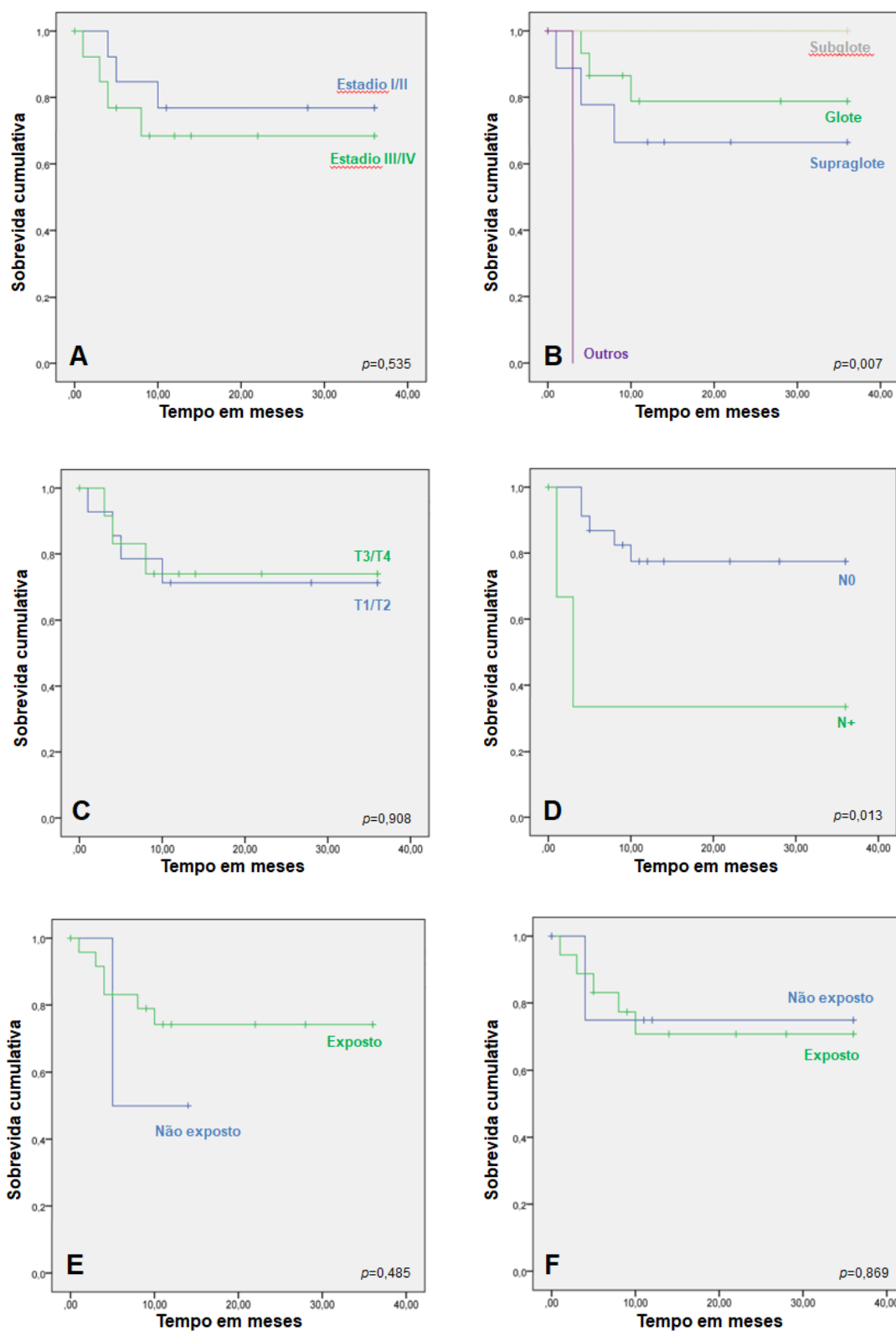


Figura 17 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo estadiamento (A), sítio (B), tamanho do tumor primário (C), metástase linfonodal (D), tabagismo (E) e etilismo (F).

Também não foi observada diferença significativa entre as curvas de SLD com RNL baixa e alta ($p=0,318$), conforme demonstrado na figura 18.

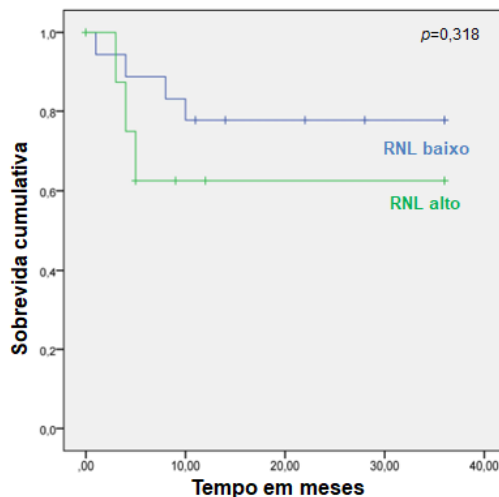


Figura 18 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo RNL ($p=0,318$).

A SLD em 36 meses de indivíduos que apresentaram baixa quantidade de neutrófilos no compartimento peritumoral foi um pouco maior (média de 26,99 meses) do que a dos indivíduos com alta quantidade (média de 25,00 meses) (figura 19A). No entanto, os participantes com alta densidade neutrofílica na região intratumoral apresentaram uma SLD em 36 meses maior (média de 26,28 meses) do que aqueles com baixa concentração (média de 26,23 meses) (figura 19B). Em ambos os casos, não houve diferença significativa.

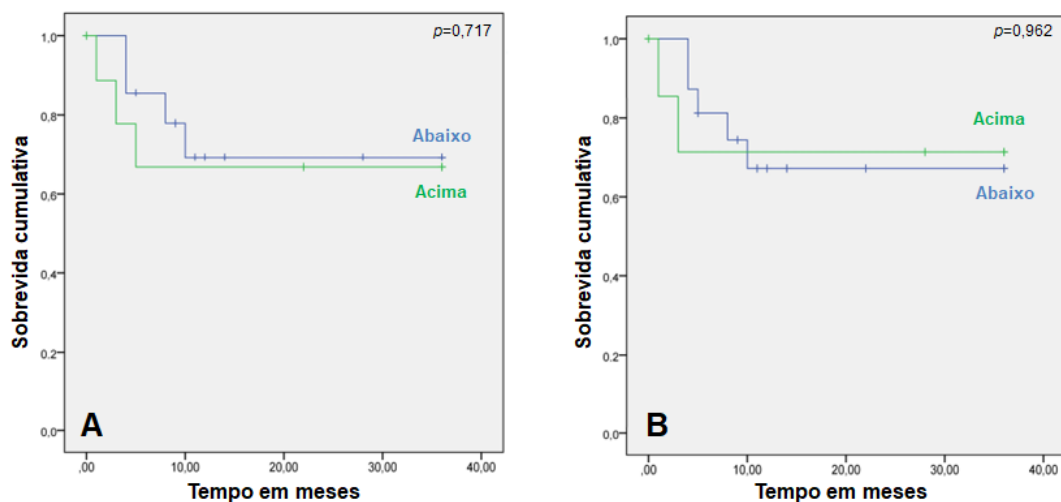


Figura 19 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses segundo neutrófilos associados ao tumor. Em A neutrófilos peritumorais e em B neutrófilos intratumorais.

Não foi observada associação significativa entre o padrão do infiltrado linfocitário (figura 20), bem como da expressão de PD-L1 (figura 21) com as taxas de SLD.

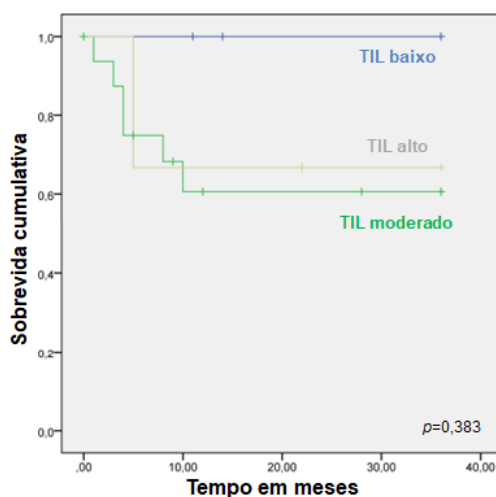


Figura 20 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação ao TIL ($p=0,383$).

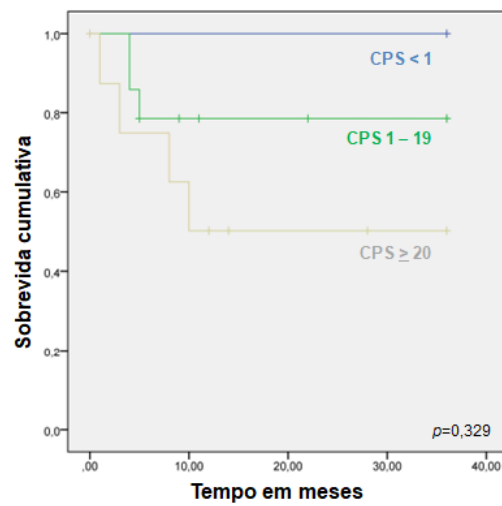


Figura 21 - Curva de Sobrevida Livre de Doença pelo método de Kaplan-Meier e Long Rank no período de 36 meses em relação à expressão de PD-L1 ($p=0,329$).

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide de laringe (CEL) é a 9ª neoplasia maligna mais comum entre indivíduos do sexo masculino e com maior incidência na população com idade igual ou superior a 40 anos (STEUER et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019). O presente estudo corrobora esses dados com 96,66% dos participantes do sexo masculino e com 56,66% população com idade igual ou superior a 60 anos.

O tabagismo e etilismo são hábitos frequentes em pacientes com CEL e configuram fatores de risco importantes neste cenário. Neste estudo 90,00% dos indivíduos eram tabagistas ou ex-tabagistas e 66,70% eram etilistas atuais ou ex-etilistas. Apesar da literatura reportar efeito sinérgico quando há estes dois fatores e piora na sobrevida global e livre de doença, os resultados deste estudo, tanto para exposição ao tabaco quanto para exposição à bebidas alcoólicas, não demonstram diferença significativa entre os grupos exposto e não exposto.

Neste estudo, 50,0% dos casos foram diagnosticados com tumores maiores em tamanho (T3/T4), 80,0% sem metástase linfonodal (N0) e 53,3% com estágio clínico avançado (III/IV). O sítio primário de maior incidência foi a glote, representando 53,3% dos casos. Os dados deste estudo apontaram taxas de SG significativas para indivíduos inicialmente diagnosticados com tumores de tamanho T1/T2 ($p=0,010$), estadiamento clínico inicial I/II ($p=0,023$) e sítio primário localizado na subglote ($p=0,011$). Os dados de SLD revelaram valores significativos para participantes que não apresentaram metástase linfonodal ($p=0,013$) e sítio primário de glote ($p=0,007$) no diagnóstico inicial. Estes resultados corroboram a importância do diagnóstico precoce e de acordo com as diretrizes estabelecidas pela AJCC (2018). Todavia, a utilização única do TNM apresenta limitações quanto ao prognóstico da doença (MARCUS et al., 2018). Em vista disto, é crescente o número de pesquisas explorando possíveis biomarcadores de prognóstico.

Estudos têm demonstrado que a inflamação persistente pode estar relacionada ao câncer, contribuindo para a tumorigênese e angiogênese (ZHANG; VEERAMACHANENI, 2022). Sabe-se que o TME possui características importantes e que desempenha papel fundamental na iniciação e disseminação das neoplasias malignas (CURRY et al., 2014; SADEGHI RAD et al., 2021; WANG et al., 2021; SADEGHI RAD et al., 2021).

A inflamação refletida pela relação neutrófilo/linfócito (RNL) é estudada em diferentes grupos de câncer e tem sido relacionada com prognóstico e sobrevida. Em carcinomas renais de células claras, a RNL menor que 2,7 foi relacionada a melhores taxas de sobrevida livre de doença (SLD). No carcinoma de nasofaringe metastático a RNL pré-tratamento foi considerada um preditor independente de desfecho de sobrevida. No carcinoma de pulmão de células não pequenas a RNL foi associada ao mal prognóstico. Em estudo prévio realizado por Kum e colaboradores (2014) foi demonstrado pela primeira vez uma relação neutrófilo-linfócito mais elevadas em CEL do que em outras lesões deste mesmo órgão (DUZLU et al., 2015). No presente estudo, pacientes com baixa RNL apresentaram SG significativamente superior àqueles com alta RNL. No entanto, não houve ganho significativo em SLD quando comparados os grupos RNL baixa e RNL alta.

Em experimento realizado em modelos murinos de alguns tipos de câncer, Zhang et al. descobriram que das células imunes associadas ao tumor, os neutrófilos e os macrófagos foram predominantes. Além disso, eles realizaram experimentos em modelos pré-clínicos em subtipos enriquecidos com neutrófilos e subtipos enriquecidos com macrófagos para examinar sua resposta aos inibidores de *checkpoint* imunológico (ICIs). Foi então identificado que as linhagens celulares derivadas de tumores enriquecidos com macrófagos obtiveram boa resposta aos ICIs, enquanto as linhagens celulares enriquecidas com neutrófilos se mostraram resistentes à estas terapias, sugerindo um microambiente imunossupressor promovido pelos TANs. Ademais, os autores verificaram que pacientes com doença progressiva (PD – *progressive disease*) ou com resposta parcial (PR – *partial response*) tinham um valor de TAN superior aos pacientes com resposta completa (CR – *complete response*), o

que sugere que os neutrófilos possuem uma função promotora do tumor maior que a supressora no microambiente tumoral (SADEGHI RAD et al., 2021). Contudo, neste estudo não houve diferença significativa de SG e SLD para participantes com grande e pequena quantidade de TAN, tanto no compartimento peritumoral quanto no intratumoral.

Cho e colaboradores (2011) demonstraram que o aumento da expressão de PD-L1 resultou em aumento da apoptose de TILs CD8+ intratumorais. Ademais, concluíram que citocinas como TGF- β e IL-10 permitem que as células T naïve locais sejam diferenciadas em linfócitos T supressores, ao mesmo tempo que utilizam das atividades supressoras das células T reguladoras existentes. O PD-1 é de particular interesse nos carcinomas epiteliais de cabeça e pescoço, pois um infiltrado linfocítico no microambiente tumoral foi correlacionado ao melhor prognóstico (WEI et al, 2017). Entretanto, os resultados de TIL deste estudo não evidenciaram significância quando associados à SG e SLD.

Os carcinomas de células epidermóide de cabeça e pescoço apresentam uma importante expressão de PD-L1, sendo este achado correlacionado a evasão à resposta destes tumores. Esta elevada expressão de PD-L1 ainda tem sido correlacionada ao pior prognóstico, às taxas inferiores de sobrevida livre de doença e sobrevida global, além da maior ocorrência de presença de metástases linfonodais e à distância (FARKONA et al., 2016; JIANG et al., 2019). Porém, os achados de expressão de PD-L1 representados em CPS do presente estudo não demonstraram comprometimento significativo do prognóstico quando associados à SG e SLD.

7 CONCLUSÃO

Pelo presente estudo pode-se reafirmar que pacientes com CEL têm melhor prognóstico quando inicialmente diagnosticados com tumores de tamanho T1/T2, que não possuam metástase linfonodal e tenham estádios clínicos I/II. Além disso, tumores de subglote foram relacionados à melhor prognóstico.

Os resultados obtidos pelo presente estudo reiteram que o TME inflamado representa fator importante a ser compreendido e que RNL pode ser considerado como biomarcador de prognóstico em CEL através da relação entre a baixa RNL e a SG em 36 meses. Todavia, não houve evidência de correlação entre TAN e SG e TAN e SLD. A aplicabilidade de RNL como biomarcador de prognóstico também constitui uma alternativa financeiramente viável, não necessitando de investimentos ou procedimentos além dos já realizados na rotina clínica.

Também não foi demonstrada qualquer relação significativa entre as variáveis clínico-patológicas e indicadores de prognóstico a partir dos resultados de TIL. Estes achados sugerem que outros fatores podem estar associados e novas investigações tornam-se necessários para elucidação.

Foi observada uma relação entre a baixa expressão de PD-L1 (CPS<1) nas curvas de sobrevida SG e SLD. Todavia, não estes achados não representaram valores significantes que pudessem sugerir que PD-L1 possui potencial para biomarcador de prognóstico na população estudada.

REFERÊNCIAS

AJCC CANCER STAGING MANUAL. **AJCC Cancer Staging Manual**. 18th edition ed. Chicago: Springer, 2018.

ANTONIO, M. et al. **Diretrizes Oncológicas 2**. São Paulo: Doctor Press Ed. Científica, 2019.

BACK, G.; SOOD, S. The management of early laryngeal cancer: options for patients and therapists. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**. Filadélfia, v. 13, p. 85-91, 2005.

BEHLAU, M.; AZEVEDO, R.; MADAZIO, G. **Voz: o livro do especialista**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

BURTNESS, B. et al. **Efficacy of first-line (1L) pembrolizumab by PD-L1 combined positive score <1, 1-19, and ≥20 in recurrent and/or metastatic (R/M) head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): KEYNOTE-048 subgroup analysis**. *The Lancet*. CT - EUA: 31 out, 2019.

CHAWLA, S.; CARNEY, A. S. Organ preservation surgery for laryngeal cancer. **Head & Neck Oncology**, p. 1–12, 15 mai. 2009.

DEVITA JR, V.; LAWRENCE, T.; ROSENBERG, S. **DeVita, Hellman and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology**. 11th edition ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2019. v. 11th.

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.

GOEL, M. K.; KHANNA, P.; KISHORE, J. Understanding Survival Analysis: KaplanMeier 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>>.

HU, C. et al. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 102, 1 mar. 2020.

INTERCHANGE. **Interchange Objectives**. Disponível em: <https://interchange.iarc.who.int/objectives/>. Acesso em 21 jan. 2022.

JIANG, X. et al. **Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape**. **Molecular Cancer**. BioMed Central Ltd., 15 jan. 2019.

KOROULAKIS, A. AGARWAL, M. **Laryngeal Cancer**. [Updated 2021 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526076/>

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

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.

MERCK S/A. **Bula ERBITUX® (cetuximabe)**. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.].

STEUER, C. E. et al. An update on larynx cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 31–50, jan. 2017b.

SUN, C.; MEZZADRA, R.; SCHUMACHER, T. N. **Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint**. **Immunity**. Cell Press, 20 mar. 2018.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

THANC GUIDE. **Laryngeal Cancers**. Disponível em: <https://thancguide.org/cancer-types/throat/laryngeal/>. Acesso em: 27 jul. 2022.

WANG, J. C. et al. T cell exhaustion in cancer: Mechanisms and clinical implications. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 6, p. 4279–4286, 1 jun. 2018.

WU, Q. et al. **Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway**. **Acta Pharmacologica Sinica**. Springer Nature, 1 jan. 2021.