



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**DOUTORADO EM ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES PD-1 E PD-L1 EM  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ASSOALHO BUCAL E PALATO**

**RECIFE**

**2024**

**ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO**

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES PD-1 E PD-L1 EM  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ASSOALHO BUCAL E PALATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em Odontologia. Área de concentração: Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Coorientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

**RECIFE**

**2024**

## Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Firmo, Adriana Carla Barbosa.

Análise da imunoexpressão dos marcadores PD-1 e PD-L1 em carcinoma de células escamosas de assoalho bucal e palato / Adriana Carla Barbosa Firmo. - Recife, 2025.

152 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2025.

Orientação: Gustavo Pina Godoy.

Coorientação: Cassiano Francisco Weege Nonaka.

Inclui referências e anexos.

1. Carcinoma de células escamosas; 2. Imuno-histoquímica; 3. Biomarcadores. I. Godoy, Gustavo Pina. II. Nonaka, Cassiano Francisco Weege. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES PD-1 E PD-L1 EM  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ASSOALHO BUCAL E PALATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, como requisito para a obtenção do título de Doutorado em Odontologia. Área de concentração: Clínica Integrada.

Aprovado em: 19/ 12/ 2024.

**Orientador:**

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

(Presidente)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca

(1º examinador)

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianne de Vasconcelos Carvalho

(2º examinadora)

Universidade de Pernambuco (UPE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Corrêa de Araújo Arcoverde Leal

(3º examinadora)

Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Águida Cristina Gomes Henriques Leitão

(4º examinadora)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

A **Deus** por sempre iluminar o meu caminho, me dando força e determinação na conclusão de mais uma etapa de minha vida e por permitir a concretização dos meus sonhos. Obrigada hoje e sempre!

Ao meu esposo **João Ricardo Perantoni Pereira** pelo apoio e incentivo, com toda certeza você faz parte desta conquista.

Aos meus filhos, **João Gabriel** e **Maria Luiza**, que sempre serão as maiores riquezas da minha vida! Em vocês eu vejo pureza, e todas as vezes que vocês me olham eu tenho a certeza da existência de Deus, pois só Ele seria capaz de fazer algo tão maravilhoso. Vocês são seres de luz que me fortalecem e me impulsionam todos os dias para seguir adiante em busca de evoluir como pessoa e como profissional! Obrigada por fazerem parte disso! Amo vocês do tamanho do infinito!

Aos meus pais, **Severino Firmo de Souza Filho** e **Cátia Verônica Barbosa da Silva**, pela compreensão e por me ensinar que tudo pode ser realizado desde que haja perseverança, dedicação, fé e paciência. Expresso minha felicidade e orgulho de ter tido a oportunidade de aprender com vocês os mais importantes valores da vida! Obrigada por tornar os meus dias mais leves e por todo o apoio de sempre!

Aos meus irmãos, **Anderson, Alessandra e Alan**, por todos estes anos de amor e amizade. E aos meus sobrinhos, **Joaquim, Heitor e João Pedro**, só posso agradecer por todos os momentos que vocês me proporcionam, vocês me fazem querer ser melhor a cada dia.

À **minha família querida**, que sempre acreditou em mim, que sempre me incentivou! Tenho plena certeza que o apoio de cada um de vocês foi fundamental para eu concluir mais uma etapa da minha vida.

## **Agradecimentos especiais**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy**, pela oportunidade, pela paciência e pelo exemplo de dedicação à vida acadêmica. Seus conselhos e ensinamentos me fizeram crescer! Obrigada por suas palavras de apoio que me fortaleceram nos momentos de angústia! Obrigada por acreditar em mim! O seu dom de ensinar é uma inspiração para todos!

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, por todos os ensinamentos, pela atenção e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, que mesmo nos momentos mais desafiadores, conseguiu passar leveza e segurança. Obrigada por tudo!

À **Profa. Dra. Marianne de Vasconcelos Carvalho** que nos apoiou e nos favoreceu na conclusão desse trabalho.

À **Universidade Federal de Pernambuco** que permitiu essa oportunidade de adquirir novos conhecimentos e alcançar mais um degrau da minha vida acadêmica.

À **Universidade Estadual da Paraíba** e a **Universidade de Pernambuco**, pelo apoio e contribuições durante a concretização dessa pesquisa.

Ao **Centro Integrado de Diagnóstico e Tratamento das Lesões da Região Craniofacial, unidade I do Centro Integrado Multiusuário de Referência em Saúde da Paraíba**, por disponibilizar a infraestrutura e equipamentos necessários ao escaneamento das lâminas histológicas em alta resolução.

Ao **Hospital de Câncer de Pernambuco** através da **Profa Dra Luciana Arcoverde** pela disponibilidade e contribuição, sempre compartilhando seu conhecimento de forma tão gentil, o meu muito obrigada.

## **Agradecimentos**

Ao Coordenador da Pós-Graduação em Odontologia, o **Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez**, pela sua compreensão, pela confiança depositada, pela paciência, pela atenção que tanto contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho, minha eterna gratidão!

Aos **professores e mestres do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE**, pela sua dedicação e contribuições, o meu imenso respeito e gratidão por toda ajuda.

À **Raíssa Soares dos Anjos** pela dedicação, apoio e contribuições durante a concretização dessa pesquisa.

A **Elton Fernandes Barros** por sua ajuda, pela colaboração e pelo apoio na conclusão desse trabalho.

Um agradecimento especial a **Ademilton**, pelo auxílio no Laboratório de Patologia Oral da UFPE.

Aos **colegas de trabalho** pelas colaborações prestadas durante esta jornada.

Aos **meus amigos** que souberam entender e aceitar os momentos de ausência e que contribuíram para a realização dessa pesquisa.

A **todos**, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



*Dizem que antes de um rio entrar no mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda jornada que percorreu, para os cumes, as montanhas, para o longo caminho sinuoso que trilhou através das florestas e povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Voltar é impossível na existência. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. Somente ao entrar no oceano o medo irá desaparecer, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas de tornar-se oceano.*

**Osho, citando Khalil Gibran**

## RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é a neoplasia mais comum em boca e diversos fatores relacionados ao paciente, ao tumor e ao tratamento associam-se ao prognóstico. Atualmente o microambiente imune é considerado parte do tecido neoplásico pois encontra-se em um estado dinâmico inter-relacionado com as células tumorais. O presente trabalho teve por objetivo analisar o perfil imunoistoquímico de PD-1 e PD-L1 em carcinomas de células escamosas de assoalho bucal (CCEAB) e carcinomas de células escamosas de palato duro (CCEP), por meio da avaliação do comportamento dessas proteínas no microambiente tumoral (MAT) e suas correlações clínicas e histopatológicas, com intuito de contribuir para uma melhor compreensão da resposta imunológica. Foi realizada uma análise retrospectiva, no período de julho de 2023 a janeiro de 2024, por meio da seleção de 10 casos de CCEAB e 10 casos de CCEP. Foram obtidos dados clínicos relativos ao sexo e idade dos pacientes, e realizadas as análises morfológicas e imunoistoquímicas. Para cada caso selecionado, foram escolhidos 5 campos de epitélio e 5 campos de estroma, totalizando 100 campos de observação em cada localização anatômica. Nestes campos realizou-se a contagem das células epiteliais e das células inflamatórias estromais (mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos) positivas e negativas, correlacionando os achados clínicos e histopatológicos com a imunoexpressão dos marcadores PD-1 e PD-L1. Em CCEAB observou-se que 9 casos foram do sexo masculino, em CCEP observou-se que 7 casos foram do sexo feminino. A idade em CCEAB e em CCEP variou entre 50 a 87 anos. Em relação à análise histopatológica das lesões, 13 casos foram considerados de alto grau histopatológico, 12 casos mostraram o padrão de invasão com a organização de células tumorais em pequenos grupos ou cordões com uma infiltração difusa e pronunciada. Apenas 6 casos apresentaram grau de ceratinização baixo/ausente, 4 casos apresentaram pleomorfismo nuclear intenso/extremo e 6 casos apresentaram infiltrado escasso/ausente. A imunoexpressão de PD-1 foi observada em 90% dos casos de CCEAB no parênquima e em 100% dos casos no estroma. Para o CCEP, a imunoexpressão de PD-1 foi de 100% no parênquima e no estroma. Quanto à imunoexpressão de PD-L1, foi observada em todos os casos de CCEAB e CCEP no parênquima e no estroma. Nos casos que apresentaram infiltrado inflamatório escasso/ausente observou-se um maior percentual de células positivas para PD-L1 no estroma com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,017$ ).

**Palavras-chave:** Carcinoma de células escamosas; Imuno-histoquímica; Biomarcadores; Vigilância imunológica; Microambiente tumoral.

## ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common neoplasm in the mouth and several factors related to the patient, tumor and treatment are associated with the prognosis. Currently, the immune microenvironment is considered part of the neoplastic tissue because it is in a dynamic state interrelated with tumor cells. The present study aimed to analyze the immunohistochemical profile of PD-1 and PD-L1 in squamous cell carcinomas of the floor of the mouth (SCCAB) and squamous cell carcinomas of the palate (SCCEP), by evaluating the behavior of these proteins in the tumor microenvironment (TME) and their clinical and histopathological correlations, in order to contribute to a better understanding of the immune response. A retrospective analysis was performed, from July 2023 to January 2024, by selecting 10 cases of SCCAB and 10 cases of SCCEP. Clinical data regarding the sex and age of the patients were obtained, and morphological and immunohistochemical analyses were performed. For each selected case, 5 epithelial fields and 5 stromal fields were chosen, totaling 100 observation fields in each anatomical location. In these fields, the positive and negative epithelial and stromal cell counts were performed, correlating the clinical and histopathological findings with the immunoexpression of PD-1 and PD-L1 markers. In CCEAB, it was observed that 9 cases were male, and in CCEP, it was observed that 7 cases were female. The ages in CCEAB and CCEP ranged from 50 to 87 years. Regarding the histopathological analysis of the lesions, 13 cases were considered to be of high histopathological grade, 12 cases showed the invasion pattern with the organization of tumor cells in small groups or cords with a diffuse and pronounced infiltration. Only 6 cases presented low/absent keratinization, 4 cases presented intense/extreme nuclear pleomorphism and 6 cases presented scarce/absent infiltrate. PD-1 immunoexpression was observed in 90% of cases of SCCEAB in the parenchyma and in 100% of cases in the stroma. For SCCE, PD-1 immunoexpression was 100% in the parenchyma and stroma. Regarding PD-L1 immunoexpression, it was observed in all cases of SCCEAB and SCCE in the parenchyma and stroma. In cases that presented scarce/absent inflammatory infiltrate, a higher percentage of PD-L1-positive cells was observed in the stroma with a statistically significant difference ( $p=0.017$ ), which suggests an alteration in the immune response in TMA, signaling a possible immune evasion.

**Keywords:** Carcinoma squamous cell; Immunohistochemistry; Biomarkers; Immunologic surveillance; Tumor microenvironment.

## LISTA DE FIGURAS

### TESE

<b>Figura 1 -</b>	Imagens clínicas de pacientes atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco. ( <b>A-</b> CCEAB; <b>B-</b> CCEP)- Arquivo Pessoal	<b>22</b>
<b>Figura 2 -</b>	Imagens de peças operatórias de um paciente atendido no Hospital de Câncer de Pernambuco. ( <b>A-</b> Lesão propriamente dita e cadeias linfáticas removidas bilateralmente no esvaziamento cervical; <b>B-</b> CCAB)- Arquivo Pessoal	<b>23</b>
<b>Figura 3 -</b>	Imagens de Tomografia Computadorizada de um paciente com CCEAB atendido no Hospital de Câncer de Pernambuco. ( <b>A-</b> Corte Axial; <b>B-</b> Corte Coronal)- Arquivo Pessoal	<b>25</b>
<b>Figura 4 -</b>	A via PD -1/PD-L1: A ligação PD-L1 com PD-1 leva à supressão da ativação de célula T. (Imagem obtida da publicação de Ghosh, Luong e Sun, 2021)	<b>30</b>
<b>Figura 5 -</b>	Imagens digitais de alta resolução das lâminas escaneadas de CCEAB demonstrando células imunopositivas para PD-L1 (A e C) e PD-1 (B e D) no parênquima (A e B) e no estroma (C e D)	<b>53</b>
<b>Figura 6 -</b>	Imagens digitais de alta resolução das lâminas escaneadas de CCEP demonstrando células imunopositivas para PD-L1 (A e C) e PD-1 (B e D) no parênquima (A e B) e no estroma (C e D)	<b>54</b>
<b>Figura 7 -</b>	Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma dos CCEAB e CCEP	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO – ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PD-1 E PD-L1 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM ASSOALHO BUCAL E PALATO

<b>Figura 1 -</b>	Imagens digitais de alta resolução das lâminas escaneadas de CCEAB (esquerda) e CCEP (direita) demonstrando células imunopositivas para PD-L1 (A e C) e PD-1 (B e D) no parênquima (A e B) e no estroma (C e D)	<b>87</b>
<b>Figura 2 -</b>	Gráficos box-splot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma dos CCEAB e CCEP	<b>90</b>
<b>Figura 3 -</b>	Gráfico box-splot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao grau histopatológico de malignidade das lesões	<b>91</b>
<b>Figura 4 -</b>	Gráfico box-splot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao grau de ceratinização (A), ao padrão de invasão (B), ao pleomorfismo nuclear (C) e a intensidade do infiltrado inflamatório (D)	<b>92</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 -</b>	Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação a intensidade do infiltrado inflamatório	<b>74</b>
<b>Gráfico 2 -</b>	Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao padrão de invasão	<b>75</b>
<b>Gráfico 3 -</b>	Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao pleomorfismo nuclear	<b>76</b>
<b>Gráfico 4 -</b>	Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao grau histopatológico das lesões	<b>77</b>
<b>Gráfico 5 -</b>	Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao grau de ceratinização	<b>78</b>
<b>Gráfico 6 -</b>	Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma dos CCEAB e CCEP	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

### TESE

<b>Tabela 1 -</b>	Dados clínicos dos casos de CCEAB e CCEP	<b>51</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes localizações (parênquima e estroma)	<b>57</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Teste de Mann-Whitney para percentual células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes localizações (parênquima e estroma)	<b>58</b>
<b>Tabela 4 -</b>	Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus histopatológicos (parênquima e estroma)	<b>60</b>
<b>Tabela 5 -</b>	Teste de Mann-Whitney para percentual células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus histopatológicos (parênquima e estroma)	<b>61</b>
<b>Tabela 6 -</b>	Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes padrões de invasão (parênquima e estroma)	<b>63</b>
<b>Tabela 7 -</b>	Teste de Mann-Whitney para percentual células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes padrões de invasão (parênquima e estroma)	<b>64</b>
<b>Tabela 8 -</b>	Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus de ceratinização (parênquima e estroma)	<b>66</b>
<b>Tabela 9 -</b>	Teste de Mann-Whitney para percentual células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes padrões graus de ceratinização (parênquima e estroma)	<b>67</b>
<b>Tabela 10 -</b>	Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus de pleomorfismo nuclear (parênquima e estroma)	<b>68</b>
<b>Tabela 11 -</b>	Teste de Mann-Whitney para percentual células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus de pleomorfismo nuclear (parênquima e estroma)	<b>69</b>
<b>Tabela 12 -</b>	Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes níveis de infiltrado inflamatório (parênquima e estroma)	<b>70</b>

<b>Tabela 13 -</b> Teste de Mann-Whitney para percentual células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes níveis de infiltrado inflamatório (parênquima e estroma)	<b>71</b>
---	-----------

---

<b>Tabela 14 -</b> Teste de Spearman para correlação entre os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 (Parênquima e Estroma) em CCAB	
---	--

<b>Tabela 15 -</b> Teste de Spearman para correlação entre os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 (Parênquima e Estroma) em CCEP.	
--	--

---

## **ARTIGO – ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PD-1 E PD-L1 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM ASSOALHO BUCAL E PALATO**

<b>Tabela 1 -</b> Dados clínicos dos casos de CCEAB e CCEP	<b>88</b>
--	-----------

---



## LISTA DE QUADROS

### TESE

<b>Quadro 1 -</b>	Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo	<b>44</b>
<b>Quadro 2 -</b>	Variáveis dependentes analisadas no estudo	<b>45</b>
<b>Quadro 3-</b>	Sistema de gradação histopatológica de malignidade no <i>front</i> de invasão, proposto por Bryne <i>et al.</i> (1992)	<b>46</b>
<b>Quadro 4-</b>	Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários que serão utilizados no estudo	<b>47</b>

### ARTIGO – ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PD-1 E PD-L1 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM ASSOALHO BUCAL E PALATO

<b>Quadro 1 -</b>	Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários que serão utilizados no estudo	<b>86</b>
-------------------	---	-----------

---

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

APCs	Antigen Presenting Cells
CCEAB	Carcinoma de Células Escamosas em Assoalho Bucal
CCECP	Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CCEP	Carcinoma de Células Escamosas em Palato
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CPS	Combined Positive Score
CTCs	Células Tumorais Circulantes
HPV	Papilomavírus Humano
ICI	Inibidores de Checkpoints Imunológicos
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IHC	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LITs	Linfócitos Infiltrantes Tumorais
LTC	Linfócitos T Citotóxicos
MAT	Microambiente Tumoral
MFSCC	Squamous Cell Carcinoma of the Floor of the Mouth
NK	Células Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1

PD-L1	Programmed Death- Ligand 1
PET	Positron Emission Tomography
PSCC	Squamous Cell Carcinoma of the Palate
RCI	Receptores de Checkpoint Imunológico
RM	Ressonância Magnética
RTLs	Receptores Toll-Like
SIC	Society for Immunotherapy of Cancer
TC	Tomografia Computadorizada
TM	Tumor Microenvironment
TPS	Tumor Proportion Score
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b> Carcinoma de células escamosas oral	20
<b>2.1.1</b> Aspectos clínicos e patológicos do CCEAB e CCEP	21
<b>2.1.2</b> Fatores de risco, métodos de diagnóstico e tratamento	24
<b>2.2</b> Descrição dos marcadores PD-1 e PD-L1	26
<b>2.2.1</b> PD-1	26
<b>2.2.2</b> PD-L1	28
<b>2.3</b> Interação PD-1 e PD-L1 no microambiente tumoral	29
<b>2.4</b> Imunoexpressão de PD-1 e PD-L1 x Imunoterapia	32
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b> Objetivo geral	40
<b>3.2</b> Objetivos específicos	40
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b> Aspectos éticos	41
<b>4.2</b> Caracterização do estudo	41
<b>4.3</b> População	41
<b>4.4</b> Amostra	41

4.4.1 Critérios de inclusão	42
4.4.2 Critérios de exclusão	42
4.5 Variáveis do estudo	42
4.5.1 Variáveis independentes	42
4.5.2 Variáveis dependentes	44
4.6 Estudo clínico	45
4.7 Estudo morfológico	46
4.8 Estudo imunoistoquímico	47
4.9 Análise imunoistoquímica	48
4.10 Análise estatística	49
5. RESULTADOS	51
5.1 Imunoexpressão de PD-1	52
5.2 Imunoexpressão de PD-L1	55
6. ARTIGO- ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES PD-1 E PD-L1 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ASSOALHO BUCAL E PALATO	80
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXOS	113
Anexo A- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética da UFPE	113
Anexo B- Instruções aos Autores (European Archives of Oto-Rhino-Laryngology)	118

## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) se desenvolve a partir do epitélio de revestimento da mucosa oral, sob a influência de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, bem como através de lesões potencialmente malignas. De maneira geral, as principais características das células tumorais encontradas no CCEO incluem manutenção da proliferação, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, angiogênese, invasão, metástase, desregulação do equilíbrio energético e evasão da destruição pelo sistema imunológico (Tarle; Luksic, 2024).

Estimativas globais mostram que o CCEO representa o 16º câncer mais comum em todo o mundo, com aproximadamente 355.000 novos casos por ano (Miranda-Filho; Bray, 2020). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) divulgou que a estimativa de novos casos de câncer no Brasil é de 704 mil para cada ano do triênio 2023 – 2025. Em se tratando apenas de CCEO, a previsão é de 15.100 novos casos ao ano, o que significa que serão 45.300 em três anos. De acordo com dados do GLOBOCAN (IARC, OMS), 389.846 novos casos de câncer de lábio e cavidade oral foram diagnosticados em 2022, enquanto 188.438 pessoas morreram dessa doença (Brasil, 2022).

O tabagismo é um dos principais fatores etiológicos, com evidências robustas indicando uma relação direta entre o consumo de cigarros, charutos, tabaco de mascar e o aumento da incidência de CCEO. No entanto, outros fatores têm sido associados ao desenvolvimento de CCEO incluindo exposição excessiva à luz ultravioleta, imunossupressão e exposição a certos agentes químicos, como o álcool. Sabe-se ainda que consumo de álcool em combinação com o tabaco, potencializa os efeitos carcinogênicos dos compostos químicos encontrados no tabaco. (Freire *et al.*, 2021; Georgaki *et al.*, 2021; Stirling *et al.*, 2022).

Apesar dos avanços significativos em procedimentos diagnósticos e terapêuticos nas últimas três décadas, as taxas de morbidade e mortalidade do CCEO permanecem altas, o que pode ser atribuído ao estágio avançado no momento do diagnóstico e a falta de: modalidades terapêuticas eficazes, biomarcadores para diagnóstico precoce, previsão de prognóstico (Greeshma *et al.*, 2023).

Jin *et al.* (2023) relataram que o principal tratamento do CCEO é a cirurgia ou radioterapia combinada com quimioterapia e essas terapias podem atingir uma alta expectativa de cura enquanto os pacientes estão em estágios iniciais (I e II). Infelizmente, cerca de 70% dos pacientes apresentam câncer em estágio avançado (III e IV) no diagnóstico inicial. O resultado clínico de vários tratamentos é pouco satisfatório com menor taxa de sobrevida. Nas últimas décadas, surgiu um novo paradigma terapêutico, com base em anticorpos monoclonais e pequenos inibidores moleculares que bloqueiam vias de sinalização envolvidas na patogênese tumoral e no checkpoint imunitário. A supressão da imunomodulação negativa é, assim, um dos grandes pilares atuais da imunoterapia.

Então, os inibidores de checkpoints imunológicos (ICI) tornaram-se uma nova modalidade de tratamento antitumoral. Hoje em dia, os ICI que visam a via PD-1/PD-L1 são tratamentos promissores para o CCEO. A ligação de PD-1 à PD-L1 pode inibir a ativação e proliferação de células T, que apresentam papel vital na resposta imunológica adaptativa, reconhecendo e destruindo as células tumorais. Além disso, as células tumorais podem induzir a expressão de PD-L1 de várias maneiras, o que leva a uma diminuição dos efeitos imunológicos das células T no microambiente tumoral (MAT) e, assim, ajudam na progressão do tumor e evitam a vigilância imunológica (He *et al.*, 2020; Perumal *et al.*, 2024).

A expressão de marcadores imunológicos, PD-1 e PD-L1, no tecido tumoral tem sido estudada como um potencial indicador prognóstico e preditivo de resposta terapêutica. A presença de Linfócitos Infiltrantes Tumorais (LITs) e a expressão de PD-L1 foram associadas a uma melhor resposta aos ICI, que representam uma nova fronteira no tratamento contra vários tipos de câncer, incluindo o CCEO (Grochot *et al.*, 2019; Ghosh *et al.*, 2021; Röhl *et al.*, 2023).

Dentro dessa perspectiva, o objetivo desse estudo foi elucidar o perfil imunoistoquímico dessas proteínas em CCEAB e CCEP, contribuindo para uma melhor compreensão da resposta imune nesse tipo de neoplasia e fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais direcionadas e eficazes. O estudo avaliou o comportamento dessas proteínas no MAT, analisando se existe um padrão de expressão e se há alguma correlação com as características clínicas e histopatológicas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Carcinoma de Células Escamosas Oral

O CCEO é um tumor maligno que afeta os lábios, seu revestimento interno e estruturas circundantes, bem como o assoalho bucal, palato, gengiva, e língua. Trata-se de um câncer mais prevalente no sexo masculino e em idade acima de 40 anos. A maioria dos casos ainda são diagnosticados em estágios avançados. Houve registro de 377.713 novos casos (lábios e cavidade oral) em todo o mundo em 2020, com taxa de mortalidade de até 50%. No Brasil, dados do Atlas de Mortalidade por Câncer mostraram que, somente em 2019, a mortalidade para CCEO (lábio, língua, gengiva, assoalho de boca e palato) teve 2.661 casos (Amaral *et al.*, 2022).

Do ponto de vista epidemiológico, o CCEO apresenta uma incidência variável, influenciada por fatores geográficos e comportamentais. Até 2030, espera-se que o câncer seja a principal causa de morte em nosso país, elevando o custo das novas tecnologias para seu tratamento. É possível verificar que a ocorrência dessa doença em idosos é diferente daqueles acometidos em idade jovem. Com altas taxas de morbimortalidade, o CCEO é considerado um importante problema de saúde pública no Brasil (Cunha *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2020).

Em média, as taxas nos homens são atualmente duas vezes maiores que as das mulheres. O CCEO está associado ao status socioeconômico, com as taxas mais altas ocorrendo nas camadas mais pobres da população e apresenta uma taxa de sobrevivência baixa de apenas cinco anos, em aproximadamente 50 a 55% dos casos (Johnson *et al.*, 2021).

De maneira preocupante, a incidência de CCEO está aumentando na população mais jovem, particularmente em mulheres brancas com menos de 40 anos que não fumam ou bebem álcool. Embora a infecção de alto risco pelo papilomavírus humano (HPV) tipo 16 seja responsável por mais de 75% dos CCE de orofaringe, apenas cerca de 2% dos CCEO são causados pelo HPV. Isso sugere a necessidade de investigar outras causas mais raras que podem estar associadas ao desenvolvimento de CCEO, como doenças autoimunes, doenças infecciosas,



condições imunossupressoras e doenças genéticas hereditárias (anemia de Fanconi, xeroderma pigmentoso, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Bloom, ataxia-telangiectasia e síndrome de Cowden), bem como medicamentos que modulam o sistema imunológico (Tarle; Luksic, 2024).

O CCEO é caracterizado principalmente pelo aparecimento de lesões orais que não cicatrizam acompanhadas da ausência de sintomas dolorosos, mas nos estágios mais avançados, a dor pode ocorrer em cerca de 40% dos pacientes, geralmente quando atingem um tamanho clínico significativo. A dor pode variar de leve desconforto a dor intensa em casos avançados, principalmente na língua. Outros sintomas comumente encontrados incluem dor de ouvido, sangramento, movimentação dentária, dificuldade para respirar, dificuldade para engolir, dificuldade para falar, trismo e parestesia, todos nos estágios mais avançados da doença (Freire *et al.*, 2021).

Embora a cavidade oral seja facilmente acessível para exame clínico, o prognóstico ruim se deve em parte ao fato de que mais de 50% do CCEO é diagnosticado em um estágio avançado da doença (estágios III e IV), e mais de 40% dos pacientes têm metástases regionais no momento do diagnóstico (Tarle; Luksic, 2024).

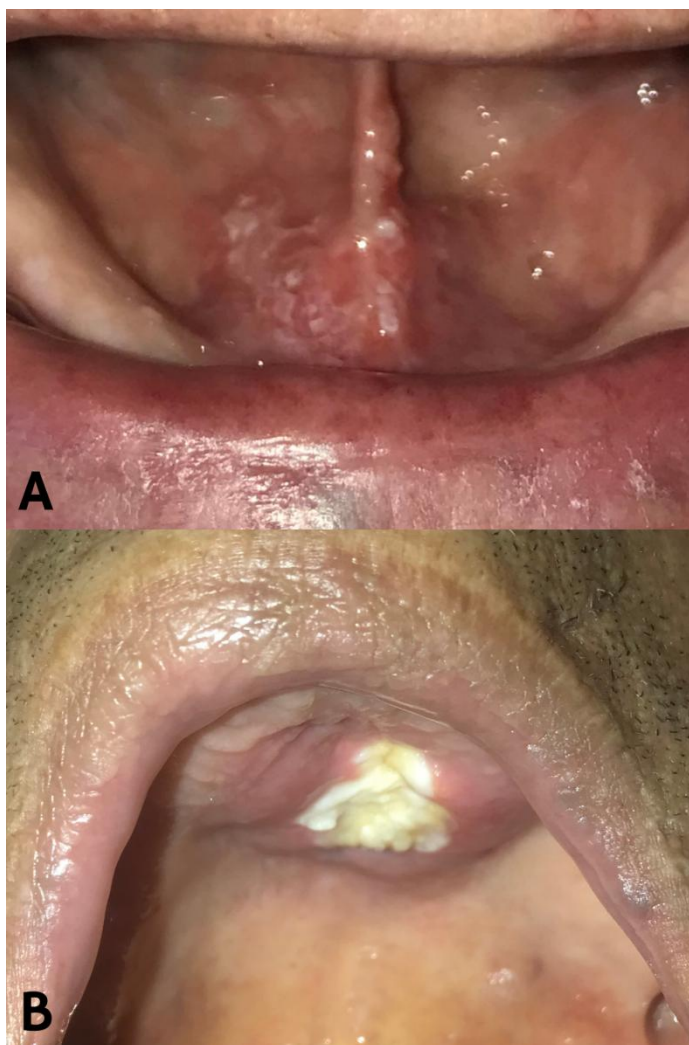
O CCEO possui várias localizações anatômicas como: gengiva, lábios, mucosa jugal, língua, palato e assoalho bucal, a maioria dos diagnósticos são feitos tardiamente. E com isso, continua sendo uma das malignidades mais agressivas devido à sua alta tendência à invasão local e disseminação de linfonodos cervicais, especialmente o CCEAB (Cunha *et al.*, 2020; Miranda-Filho; Bray, 2020; Rodrigues *et al.*, 2019).

### **2.1.1 Aspectos clínicos e patológicos do CCEAB E CCEP**

O CCEAB e CCEP frequentemente se manifestam como lesões ulcerativas ou exofíticas. Na evolução da doença, é comum a invasão local agressiva, afetando estruturas adjacentes como ossos maxilares e mandíbula, músculos e vasos sanguíneos, complicando ainda mais o quadro clínico. Os sintomas do CCEAB e CCEP podem variar dependendo do estágio da doença. A detecção precoce é crucial,

mas muitas vezes é dificultada pela localização anatômica e pela apresentação inespecífica das lesões iniciais (Harrington *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2020; Jang *et al.*, 2022) (Figura 1).

**Figura 1.** Imagens clínicas de pacientes atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco. (A- CCEAB; B- CCEP).

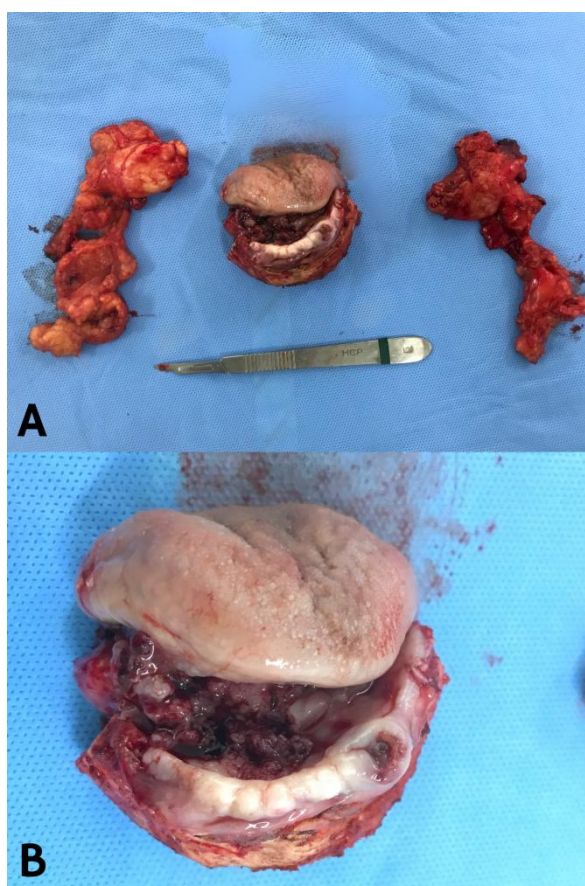


Fonte: Arquivo Pessoal (2022)

À medida que o tumor progride, os sintomas podem incluir dor, dificuldade para mastigar, engolir, falar e sensação de corpo estranho na boca. A presença de ulcerações persistentes, inchaço, sangramento espontâneo e halitose são sinais clínicos que frequentemente levam os pacientes a buscar atendimento médico. Outros sintomas incluem trismo, parestesia ou paralisia nas áreas afetadas, devido à invasão

ao nervo alveolar inferior ou de outros nervos locais. Em estágios avançados, a invasão de estruturas adjacentes pode resultar em complicações significativas, como osteólise dos ossos gnáticos, e infiltração de tecidos moles profundos (Evrard *et al.*, 2020; Lenouvel *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021; Liu, 2022) (Figura 2).

**Figura 2.** Imagens das peças operatórias de um paciente com CCEAB atendido no Hospital de Câncer de Pernambuco. (**A**- Lesão propriamente dita e cadeias linfáticas removidas bilateralmente no esvaziamento cervical; **B**- CCEAB).



Fonte: Arquivo Pessoal (2022)

No tocante às características histopatológicas, o CCEO é caracterizado por proliferação descontrolada de células epiteliais de revestimento da mucosa oral, que podem apresentar graus variados de diferenciação celular. O exame histopatológico revela a presença de células com pleomorfismo celular e nuclear, aumento da razão núcleo-citoplasma, nucléolos proeminentes, hipercromatismo nuclear, aumento de

mitoses típicas e atípicas e queratinização anormal. A invasão do estroma subjacente e a presença de embolização vascular e linfática são comuns, sendo indicadores prognósticos negativos (Evrard *et al.*, 2020; Poulouse; Kainickal, 2022; Ratnakar *et al.*, 2023).

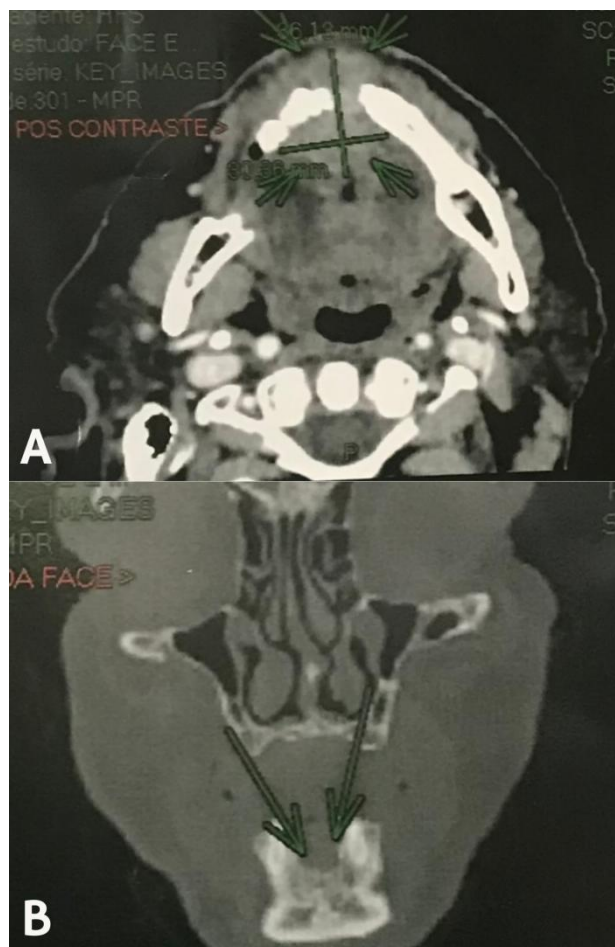
### **2.1.2 Fatores de risco, métodos de diagnóstico e tratamento**

O CCEAB e CCEP são neoplasias malignas que envolvem uma complexa interação de fatores de risco, apresenta uma sintomatologia variada e requer métodos de diagnóstico específicos para uma detecção eficaz. Esses fatores de risco são destacados pelos hábitos pessoais, o uso de tabaco e a ingestão de álcool que é um dos fatores mais envolvidos no desenvolvimento de tumores malignos na cavidade oral. O consumo de álcool, especialmente em combinação com o tabaco, também é um fator significativo, potencializando os efeitos carcinogênicos dos compostos químicos encontrados no tabaco. A predisposição genética e as mutações somáticas em genes-chave também desempenham um papel no desenvolvimento da doença (Cabrera *et al.*, 2020; Kujan *et al.*, 2020; Starzynska *et al.*, 2022; Steen *et al.*, 2023; Weber *et al.*, 2022).

O diagnóstico precoce do CCEAB e CCEP é crucial para melhorar os resultados clínicos e a sobrevida dos pacientes. A avaliação clínica inicial inclui um exame físico detalhado da cavidade oral, com inspeção e palpação cuidadosa das lesões suspeitas. A confirmação diagnóstica requer biópsia da lesão, seguida de exame histopatológico para determinar a presença de células malignas e avaliar o grau de diferenciação do tumor. (Hu *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2019; Miranda-Galvis *et al.*, 2021; Polesel *et al.*, 2021).

Métodos de imagem são fundamentais para o estadiamento da doença e incluem tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM) e tomografia por emissão de pósitrons (PET). Esses métodos ajudam a determinar a extensão local do tumor, a invasão de estruturas adjacentes e a presença de metástases regionais ou distantes. (Ghosh *et al.*, 2021; Rotman *et al.*, 2020) (Figura 3).

**Figura 3.** Imagens de Tomografia Computadorizada de um paciente com CCEAB atendido no Hospital de Câncer de Pernambuco. **A-** Corte axial; **B-** Corte coronal.



Fonte: Arquivo Pessoal (2022)

Jin *et al.* (2023) descreveram o CCEAB e CCEP como uma doença maligna heterogênea, com altos índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Adicionalmente, discutiram as opções de tratamento, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia, bem como as limitações no tratamento de pacientes com câncer em estágios avançados.

A compreensão dos aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos do CCEO é essencial para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais eficazes, particularmente no contexto da imunoterapia emergente (Knochelmann *et al.*, 2021).

A imunoterapia é uma estratégia terapêutica que vem sendo investigada para o tratamento do CCEAB e CCEP. Sabe-se que as células cancerígenas podem escapar do ataque do sistema imunológico do hospedeiro através do sequestro dos circuitos regulatórios mediados por checkpoints imunológicos. Portanto, a reativação da imunidade antitumoral pelo bloqueio dos checkpoints imunológicos é considerada uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. A proteína de morte celular programada 1 (PD-1), do original *Programmed Cell Death Protein 1*, e seu ligante de morte programada 1 (PD-L1), do original Programmed Death- Ligand 1, são proteínas críticas de checkpoint imunológicas responsáveis pela regulação negativa da estabilidade e integridade da função imune das células T. Os medicamentos anti-PD-1/PD-L1 foram desenvolvidos para o bloqueio checkpoint imunológico e podem induzir respostas clínicas em diferentes tipos de câncer, o que fornece uma nova esperança no tratamento dessa lesão. No entanto, as taxas de resposta dos pacientes às atuais terapias anti-PD-1 ou anti-PD-L1 ainda são baixas e muitos dos pacientes que inicialmente respondem positivamente ao tratamento, terminam desenvolvendo resistência a essas terapias (Ghosh; Luong; Sun, 2021; Sekido *et al.*, 2019).

## **2.2. Descrição dos Marcadores PD-1 e PD-L1**

Sabe-se que os marcadores PD-1 e PD-L1 desempenham papéis fundamentais na regulação da resposta imunológica e na resistência tumoral. Esses marcadores são componentes essenciais do sistema imunológico, cuja interação influencia significativamente a capacidade do organismo de combater neoplasias, incluindo o CCEAB e CCEP. A compreensão dessas moléculas e sua interação é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento dessas lesões (Lopes *et al.*, 2019; Miranda-Galvis *et al.*, 2021; Ruiter *et al.*, 2020).

### **2.2.1 PD-1**

A PD-1 é um receptor de inibição imunológica e sua função é modular a resposta imune para evitar danos colaterais aos tecidos saudáveis, prevenindo a autoimunidade e mantendo a homeostase imunológica. A PD-1 pertence à família

CD28 de moléculas expressas na superfície celular de linfócitos infiltrantes tumorais (LITs). Também conhecida como PDC1 e CD279. É codificada pelo gene PDCD1 localizado no cromossomo humano 2. É uma proteína de membrana tipo I com um peso molecular de 50–55 kDa. Essa molécula atua como um mediador da tolerância imunológica para os sistemas imunológicos central e periférico. A sinalização de PD-1 desempenha um papel central na vigilância imunológica em uma série de condições, incluindo câncer, autoimunidade, transplante de órgãos e infecções virais. Uma compreensão mais profunda dos mecanismos regulatórios que governam PD-1 fornece novas perspectivas e alvos potenciais para o gerenciamento dessas doenças (Gao *et al.*, 2024; Polesel *et al.*, 2021; Veigas *et al.*, 2021).

A PD-1 é um receptor transmembrana expressado principalmente em células T ativadas, mas também pode ser encontrado em células B, células natural killer (NK) e algumas células mielóides. Sua principal função é atuar como um regulador negativo da resposta imune, prevenindo a ativação excessiva e a autoimunidade. Quando PD-1 se liga ao seu ligante PD-L1, há uma inibição das funções efetoras das células T, como a proliferação e a produção de citocinas, promovendo um estado de exaustão celular (Ghosh *et al.*, 2021; Sekido *et al.*, 2019; Sieviläinen *et al.*, 2019).

A PD-1 foi identificada pela primeira vez em linfócitos T em apoptose. É uma molécula de superfície que juntamente com o seu ligante PD-L1 desempenha um papel inibindo a função dos linfócitos T nos tecidos. A ativação dessas proteínas imunossupressoras altera o metabolismo dentro das células T, o que pode afetar seu fenótipo e função adequada. Curiosamente, as proteínas inibidoras de checkpoints imunológicos também são expressas e atuam em outras células do sistema imunológico, como macrófagos, alterando seu metabolismo e função (Gao *et al.*, 2024; Stirling *et al.*, 2022).

Wehrhan *et al.* (2021) constataram que a expressão de PD-1 foi significativamente maior em tecidos tumorais de CCEO em comparação com mucosa oral saudável. Estes autores verificaram que o aumento da expressão de PD-1 pode ser uma manifestação de exaustão de células T levando à tolerância imunológica. A interação PD-1 e PD-L1 pode ser um mediador importante da imunossupressão local no CCEO, exigindo protocolos avançados de tratamento multimodal.

Machiels *et al.* (2020) relataram que PD-1 é um receptor checkpoint imunológico conhecido por desempenhar um papel na evasão imunológica do tumor, e seu ligante, o PD-L1, também é altamente expresso nas células tumorais e nos componentes do MAT.

Ortega *et al.* (2024) afirmaram que a superexpressão de PD-1 auxilia na evasão imune em muitos tipos de câncer e que tem uma variedade de atividades em diferentes vias de imunidade, como imunidade tumoral, autoimunidade, imunidade de transplante e imunidade de infecção.

A regulação e a função de PD-1 nas células T foram amplamente estudadas. Em células T em repouso, a expressão de PD-1 em nível basal é muito baixa, enquanto, em infecções agudas, a expressão de PD-1 é significativamente induzida, e mantém o equilíbrio delicado entre respostas imunes efetivas e danos teciduais mediados pelo sistema imunológico, evitando que as células T reajam exageradamente (Gao *et al.*, 2024).

### 2.2.2 PD-L1

O ligante PD-L1, também chamado de CD274 ou B7-H1, pertence à família B7 e é codificado pelo gene CD277 no cromossomo humano 9. É uma proteína transmembrana tipo I de 33 kDa e tem 290 resíduos de aminoácidos, se expressa em uma variedade de células, incluindo células tumorais e células do MAT, como macrófagos e células dendríticas (Ortega *et al.*, 2024; Su *et al.*, 2020).

O PDL-1 foi descoberto em 1999 como uma molécula que interage com PD-1. Essa molécula demonstrou atuar como um inibidor de respostas de células T humanas, sendo reconhecido como um ligante e um parceiro funcional de PD-1. A deficiência de PD-L1 mostrou aumentar o risco de desenvolver doenças autoimunes. Tanto as células apresentadoras de antígenos (APCs) quanto as células tumorais expressam grandes quantidades de PD-L1. A expressão de PD-L1 nas células tumorais pode ser induzida por citocinas inflamatórias, como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), e pode ser secretada por células T ativadas, o que representa uma resposta adaptativa das células tumorais para evitar a destruição pelo sistema imune. Essa expressão constitui um mecanismo de evasão imunológica, permitindo que as células



tumorais escapem da destruição mediada pelo sistema (Evrard *et al.*, 2020; Suzuki *et al.*, 2020).

O PD-L1 é um biomarcador prognóstico encontrado em células tumorais e/ou estromais, em vários tipos de carcinomas. Entre eles, estão o adenocarcinoma de transição esôfago-gástrica, glioma, melanoma, alguns tipos de linfoma e os carcinomas de: ovário, colo uterino, rim, cabeça e pescoço, mama, intestino, pâncreas e pulmão. Essa proteína tem a capacidade de mapear a probabilidade de uma resposta positiva (favorável) ou negativa (tóxica). Sob certas condições, esse marcador pode ser obrigatório para o tratamento e pode ser necessário para a escolha do tratamento mais adequado (Grochot *et al.*, 2019; Lenouvel *et al.*, 2021; Stirling *et al.*, 2022).

O bloqueio de PD-L1 da superfície celular é suficiente para aumentar a citotoxicidade de linfócitos T. Quando a ligação entre PD-1/PD-L1 é quebrada, há ativação de células T e, conseqüentemente, ocorrem respostas imunomediadas. Com isso, torna-se possível a produção de citocinas, a proliferação de células T e, o mais desejado, a eliminação de células tumorais (Wu *et al.*, 2019).

He *et al.* (2020) detalharam o papel do PD-L1 na prevenção da lise tumoral mediada por células T e sua função como regulador negativo da ativação, proliferação e migração das células T. Eles também mencionaram seus papéis potenciais na prevenção de danos aos tecidos do hospedeiro e na supressão da autoimunidade.

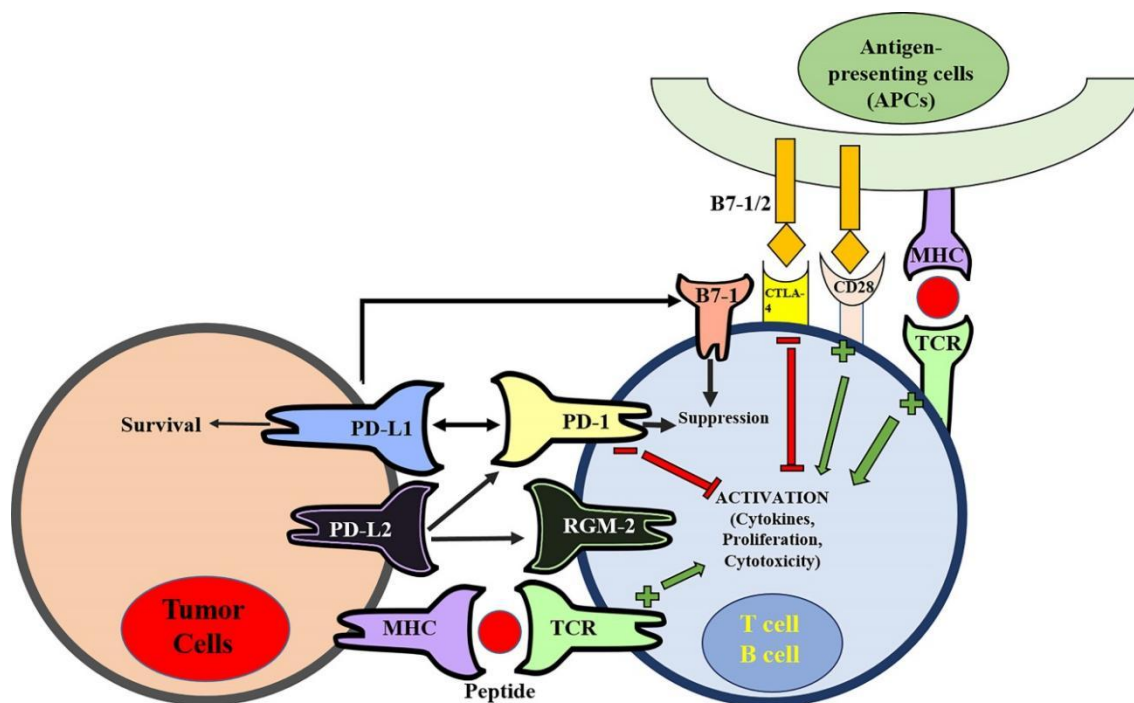
Bugshan e Farooq (2020) destacaram que a expressão de PD-L1 em CCEO está associada a um MAT imunossupressor, o que facilita a evasão imunológica. Os referidos autores destacaram que a expressão elevada de PD-L1 permite que as células tumorais escapem da destruição pelo sistema imunológico.

### **2.3 Interação de PD-1 e PD-L1 no MAT**

O eixo PD-1/PD-L1 desempenha um papel importante na regulação da homeostase imunológica e é regulado de forma rígida e dinâmica para evitar a superativação do sistema imunológico. A interrupção do eixo PD-1/PD-L1 resulta em várias doenças autoimunes em humanos (Gao *et al.*, 2024).

A interação entre PD-1 e PD-L1 cria um microambiente imunossupressor que favorece a evasão imunológica das células tumorais, favorece o crescimento e a sobrevivência do tumor. As células tumorais que expressam PD-L1 podem se ligar ao PD-1 nas células T infiltrantes, resultando na inibição da atividade citotóxica dessas células T e na redução da resposta imune antitumoral (Hu *et al.*, 2020; Liu, 2022; Veigas *et al.*, 2021) (Figura 4).

**Figura 4.** A via PD-1/PD-L1: A ligação PD-L1 com PD-1 leva à supressão da ativação de células T.



Fonte: Ghosh; Luong; Sun (2021, p. 2737)

A interação entre PD-1 e PD-L1 no MAT é um mecanismo de evasão imunológica que facilita a resistência tumoral. As células tumorais que expressam PD-L1 podem ligar-se ao PD-1 nas células T infiltrantes, resultando na inibição da função efetora dessas células T. Esse processo contribui para a exaustão das células T, caracterizada por uma diminuição da sua capacidade proliferativa e citotóxica, permitindo que as células tumorais evitem a imunovigilância e proliferem de maneira descontrolada (Hu *et al.*, 2020; Rotte, 2019).

O principal mecanismo pelo qual a interação PD-1/PD-L1 diminui a resposta imune está relacionada à sobrevivência, proliferação e citotoxicidade das células T. A exposição crônica de células T a antígenos tumorais pode levar à expressão de altos níveis de PD-1 em sua superfície, favorecendo o perfil de esgotamento das células T (Veigas *et al.*, 2021).

O aumento da expressão de PD-L1 está relacionado a tumores sólidos e atua como uma defesa tumoral contra o sistema imunológico. Em determinados tumores sólidos, a PD-L1 pode se ligar ao PD-1 presente nas células tumorais, essa ligação pode ativar a sinalização do receptor PD-1 nas células T, inibindo a proliferação e a liberação de substâncias citotóxicas das células T. Essa regulação negativa do sistema imunológico visa proteger o sistema imunológico e a infecção crônica. No entanto, muitas células malignas também usam esse método para impedir que o sistema imunológico funcione. A interação entre PD-1 e PD-L1 ativa sinais que levam à supressão da atividade das células T, resultando na sobrevivência permanente das células malignas (Lenouvel *et al.*, 2021; Rotte, 2019; Sieviläinen *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019).

Existem várias vias conhecidas pelas quais PD-L1 e PD-1 protegem as células tumorais do ataque do sistema imunológico. Uma via envolve a ligação de PD-1 em células T específicas de antígeno com PD-L1 em células tumorais. Essa ligação resulta na exaustão das células T e induz a apoptose destas células. A segunda via envolve a ligação de PD-L1 das células tumorais e PD-1 em células T reguladoras. Essa ligação promove tolerância imunológica do sistema imunológico às células cancerígenas. Esse efeito imunomodulador negativo é ativado pela estimulação de PD-1 e bloqueado por anticorpos anti-PD-1. A terceira via envolve a transmissão de sinais inibitórios para células tumorais por PD-L1. Isso protege as células tumorais da apoptose mediada por células imunoefetivas (Huang *et al.*, 2020).

Ortega *et al.* (2024) concluíram em seu estudo que o eixo PD-1/PD-L1 exerce um papel importante como um checkpoint imunológico na resposta imune adaptativa, prevenindo inflamação imunológica crônica. Em células tumorais, a superexpressão do PD-L1 em sua superfície estimula a ligação com PD-1 na superfície da célula T, levando a um estado de exaustão e aumentando a proliferação e o tamanho da massa tumoral.

Chatzopoulos et al. (2021) destacaram a importância do microambiente imunológico no comportamento agressivo dos CCEO, afirmando que a interação entre PD-L1 e PD-1 desempenha um papel crucial na evasão imunológica e na progressão tumoral.

Dermani et al. (2019) fizeram uma pesquisa, destacando uma breve visão geral dos eventos moleculares e bioquímicos que são regulados pela interação PD-1 e PD-L1 em vários tipos de câncer, e destacaram que em decisões clínicas, a expressão de PD-L1 na superfície das células cancerosas é um biomarcador valioso. Portanto, direcionar PD-1 ou PD-L1 junto com terapias comuns contra o câncer pode melhorar a eficácia do tratamento.

## **2.4 Imunoexpressão de PD-1 e PD-L1 X Imunoterapia**

A imunoistoquímica (IHC) tem sido usada para detectar potenciais marcadores de CCECP e CCEO. Esses marcadores poderiam ajudar na avaliação de pessoas saudáveis e com alto risco de desenvolver a doença, além de ajudar no prognóstico e no tratamento preventivo. As proteínas checkpoints imunológicas são um alvo de grande interesse na terapia do CCEO para avaliar a atividade das células T antitumorais, uma vez que protegem o sistema imunológico, emitem sinais que regulam a defesa, e apoiam as respostas imunes (Dang et al., 2023).

A avaliação da expressão de PD-L1 por meio de técnicas como a IHC tem se tornado uma prática padrão na oncologia clínica para orientar as decisões terapêuticas, oferecendo informações prognósticas valiosas e auxiliando na seleção de terapias imunológicas personalizadas (Evrard et al., 2020; Gao et al., 2021).

A avaliação manual de PD-L1 via IHC continua sendo um desafio para os patologistas. Existem vários clones disponíveis comercialmente do anticorpo anti-PD-L1, cada um associado a diferentes modalidades de avaliação e limiares de positividade. Duas pontuações diferentes foram introduzidas e, atualmente, representam o padrão ouro para avaliação PD-L1 em certas malignidades sólidas. São elas: (1) TPS (High Tumor Proportion Score) que representa a proporção (%) de células tumorais positivas para PD-L1 em relação ao número total de células tumorais viáveis  $\times 100$ ; e (2) CPS (Combined Positive Score) que representa o número de todas

as células PD-L1 positivas (células neoplásicas e inflamatórias) em relação ao número de todas as células tumorais viáveis  $\times 100$ . Essas diferentes pontuações foram desenvolvidas para a avaliação de padrões de coloração PD-L1 com clones específicos. Atualmente, para elegibilidade de imunoterapia de pacientes com CCEO, a pontuação recomendada na prática clínica é CPS para avaliar o clone 22C3 (Nocini *et al.*, 2022).

Gao *et al.* (2021) consideraram o CPS melhor que o TPS para estratificar pacientes e prever a resposta do CCEO ao tratamento com inibidores de checkpoints imunológicos. O TPS foi usado anteriormente como um critério de pontuação para expressão de PD-L1. Ele calcula a porcentagem de células tumorais viáveis que mostram coloração parcial ou completa de PD-L1 na membrana em qualquer intensidade. Devido aos baixos valores preditivos positivos e negativos obtidos com expressão IHC única de PD-L1 em tumores, o CPS se tornou um sistema de pontuação de coloração imunológica relativamente aceito para avaliar a expressão de PD-L1. Esta pontuação é calculada como o número de células tumorais PD-L1-positivas, linfócitos e macrófagos, dividido pelo número total de células tumorais viáveis. O valor preditivo da expressão de PD-L1 é aumentado quando se considera sua expressão combinada em células tumorais e células imunes infiltrantes.

Nocini *et al.* (2022) destacaram a necessidade de diretrizes padronizadas para a avaliação de PD-L1 em CCEO, ressaltando a importância de lidar com a heterogeneidade intratumoral de expressão de PD-L1 e a subjetividade na avaliação da IHC, bem como o uso de diferentes clones com diferentes escores. A avaliação de PD-L1 em células neoplásicas deve ser realizada em áreas tumorais que compreendem pelo menos 100 células viáveis e apenas um padrão de coloração membranosa deve ser considerado para representar positividade. Quanto à avaliação de PD-L1 em células inflamatórias, os patologistas devem avaliar apenas as células inflamatórias que infiltram áreas tumorais ou em estreita relação com células tumorais (as chamadas células imunes “infiltrantes de tumor”). A população de células inflamatórias é geralmente composta de linfócitos e macrófagos. Ao contrário das células tumorais, as células inflamatórias infiltrantes do tumor são consideradas positivas se qualquer coloração PD-L1 for evidente, independentemente do seu padrão de coloração.

A compreensão do papel de PD-1 e PD-L1 na regulação imunológica e na resistência tumoral levou ao desenvolvimento de inibidores de checkpoints imunológicos, como pembrolizumabe e nivolumabe. Esses inibidores bloqueiam a ligação de PD-1 a PD-L1, impedindo a sinalização imunossupressora e permitindo que as células T mantenham sua atividade citotóxica contra as células tumorais (Jang *et al.*, 2022; Sekido *et al.*, 2019).

A terapêutica baseada em inibidores de PD-1 e PD-L1 tem revolucionado o tratamento do CCEO. A expressão de PD-L1 nas células tumorais e no MAT serve como um biomarcador preditivo para a resposta à imunoterapia. Os pacientes com alta expressão de PD-L1 respondem melhor a terapias com inibidores de PD-1/PD-L1. A utilização desses medicamentos representa uma abordagem promissora no tratamento do CCEO, destacando a importância dos marcadores PD-1 e PD-L1 como alvos terapêuticos. Pacientes com alta expressão de PD-L1 frequentemente apresentam uma menor resposta às terapias tradicionais, mas podem responder melhor aos inibidores de checkpoints imunológicos (Gao *et al.*, 2021; Harrington *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Payne *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2020; Suzuki *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021).

Ghosh, Luong e Sun (2021) enfatizaram o PD-1 e PD-L1 como checkpoints imunológicos que fornecem sinais coinibitórios à ativação das células T, tornando-os alvos importantes para terapias de bloqueio de checkpoints imunológicos. Níveis mais altos de expressão de PD-1 em linfócitos infiltrantes de tumores (LITs) são geralmente associados a um MAT mais imunossupressor e isso pode prejudicar a eficácia das terapias anti-PD-1/PD-L1, pois as células imunes já estão em um estado de exaustão (Gao *et al.*, 2024).

A expressão de PD-L1 pode ser utilizada para selecionar pacientes que são mais propensos a responder a essas terapias, permitindo uma abordagem mais personalizada e eficaz. Estudos clínicos têm demonstrado que a terapia com inibidores de PD-1/PD-L1 pode induzir respostas duradouras e melhorar a sobrevida global em pacientes com vários tipos de câncer, incluindo CCEO (Cohen *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2021; Lenouvel *et al.*, 2021; Veigas *et al.*, 2021).

Cohen *et al.* (2019) afirmaram que geralmente, a expressão de PD-L1 no tumor está associada a uma eficácia no tratamento com inibidores de checkpoint

imunológicos anti-PD-1/PD-L1 no CCECP recorrente/metastático. No entanto, é importante salientar que o valor preditivo da expressão de PD-L1 não é absoluto, e alguns pacientes com PD-L1 negativo ainda se beneficiam do tratamento com esses agentes.

As terapias comumente usadas para o CCECP são: cirurgia, radioterapia, quimioterapia e radioquimioterapia. Mas atualmente, têm sido utilizados esses medicamentos, nivolumab e pembrolizumab, que possuem anticorpos PD-1 que demonstraram melhora significativa na sobrevida para CCECP e foram aprovados em todo o mundo. Esse avanço da imunoterapia, especialmente o bloqueio de PD-1, alcançou benefícios em comparação com a quimioterapia tradicional no CCECP recorrente e metastático. A imunoterapia neoadjuvante pode ser benéfica para alguns pacientes, porém mais de 70% dos pacientes ainda não respondem a esses medicamentos de anticorpos PD-1. Portanto, é necessário um maior desenvolvimento e melhoria da terapêutica imunológica (Knochelmann *et al.*, 2021; Suzuki *et al.*, 2020).

No estudo de Troiano *et al.*, (2018), a alta expressão de PD-L1 não se correlacionou com mau prognóstico de pacientes que sofrem de CCEO. As mulheres apresentaram níveis mais altos de expressão de PD-L1 do que os homens. Nenhuma correlação foi encontrada entre a expressão da proteína PD-L1 e mastigação de betel, consumo de álcool, invasão perineural, profundidade de invasão, tratamento ou metástases à distância. Uma expressão mais elevada foi associada a uma melhor sobrevivência global, além de que a presença da expressão de PD-L1 e TILs (Tumores Infiltrados por Linfócitos) foi associada a um melhor resultado em pacientes com CCEO localmente avançado.

As pesquisas de Lenouvel *et al.* (2020) e Zhong *et al.* (2020) demonstraram que a expressão de PD-L1 no MAT foi maior em tumores de alto grau e está associada a um pior prognóstico no CCEO.

Alguns estudos verificaram que a expressão de PD-L1 esteve associada: a resposta inflamatória no MAT, a resposta imunológica suprimida, a metástase linfonodal, ao estágio avançado do tumor, a pior prognóstico e a menor tempo de sobrevida em CCECP e CCEO (Chang *et al.*, 2023; Dong *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2022; Puntigam *et al.*, 2020; Weber *et al.*, 2019).

Boschert *et al.* (2020) analisaram a expressão de PD-L1 em CCECP e concluíram que a expressão de PD-L1 pode variar significativamente entre os subtipos histológicos e estágios da doença. Este ponto ressalta a importância de considerar a heterogeneidade tumoral ao interpretar os resultados de PD-L1. Logo, a variabilidade na expressão de PD-L1 pode influenciar a eficácia das terapias direcionadas ao eixo PD-1/PD-L1.

Akisada *et al.* (2021) realizaram um estudo com 121 casos de CCE em língua, avaliando a correlação entre a expressão de PD-L1 e o prognóstico clínico. Seus resultados indicaram que 11,6% dos casos apresentavam  $\geq 50\%$  de células positivas para PD-L1, e que esses casos tinham uma menor sobrevivência livre de doença e maior incidência de metástase nodal.

Sim, Leidner e Bell (2019) analisaram as imunoterapias em ensaios clínicos para pacientes com CCECP e discutiram os avanços nessa área para melhorar as taxas de resposta e integrar a imunoterapia ao cenário de tratamento definitivo. As taxas de resposta aos inibidores de PD-1/PD-L1 em CCECP variaram de 13% a 20%, enquanto a sobrevida foi melhorada em apenas 1 a cada 10 pacientes tratados.

Dang *et al.* (2023) conduziram uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados sobre a eficácia e segurança dos inibidores de checkpoints imunológicos em CCECP recorrente ou metastático e verificaram que a monoterapia com anti-PD-1/PD-L1 melhorou significativamente a sobrevida na população total e em pacientes com alta expressão de PD-L1.

Gao *et al.* (2021) afirmaram que o CCEO com alta expressão de PD-L1, avaliado por imunoistoquímica através de TPS e CPS, foram considerados adequados para terapia anti-PD-1/PD-L1.

Até o momento, sabe-se que dez anticorpos PD-1/PD-L1 bloqueando a interação de PD-1 com seu ligante PD-L1 foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para o tratamento de 17 tipos diferentes de câncer, incluindo câncer de pulmão de células não pequenas, melanoma, CCECP, carcinoma de células renais e linfoma de células B mediastinal e estão revolucionando o tratamento do câncer (Liu *et al.*, 2024).



Sekido *et al.* (2023) publicaram que a imunoterapia com nivolumab foi eficaz no tratamento de um paciente com CCEO avançado, resultando em remissão completa após falha da quimiorradioterapia e a expressão de PD-L1 encontrada no tumor foi de 5%.

De acordo com Cramer, Burtneess e Ferris (2019), em pacientes com expressão de PD-L1 < 1%, a taxa de resposta ao pembrolizumabe foi de 4%, comparada a 22% em pacientes com expressão de PD-L1  $\geq$  1%. Então, mesmo na ausência de expressão de PD-L1, pacientes não tratados com inibidores de checkpoint imunológico devem ser considerados para tratamento de segunda linha com um inibidor de PD-1 ou em um ensaio clínico de estratégia imunoterápica inovadora.

Apesar da imunoterapia anti-PD-1/PD-L1 ter alcançado resultados encorajadores no tratamento de vários tipos de câncer, as respostas duráveis ao bloqueio de PD-1/PD-L1 foram observadas apenas em uma minoria de pacientes (menos de 40% na maioria dos tipos de câncer) e a resistência intrínseca ou adquirida é comum em pacientes. Recentemente, o nível de expressão de PD-L1 foi examinado para ser um biomarcador preditivo para a resposta dos pacientes à imunoterapia anti-PD-1/PD-L1, e muitos estudos se concentraram nos mecanismos subjacentes da regulação de PD-L1 (Liu *et al.*, 2024).

O princípio básico da imunoterapia é a modulação da interação imunológica tumor-hospedeiro, pois a mobilização completa da resposta imune do hospedeiro pode ser benéfica. A infiltração de células imunes é uma característica patológica proeminente do CCEO. Como em outros tumores sólidos, essa característica é sugerida como uma manifestação de uma resposta imune das células imunoefetoras contra as células tumorais. Foi confirmado que todos os cânceres humanos podem ser classificados em três perfis, incluindo o fenótipo imune-deserto, o fenótipo imune-excluído e o fenótipo imune-inflamado. A resposta clínica dos dois primeiros fenótipos é geralmente rara após a terapia anti-PD-1/PD-L1, e os tumores desses dois fenótipos são considerados tumores não inflamados. Pelo contrário, os tumores com um fenótipo inflamado parecem ter um alto recrutamento de células T, e os inibidores de checkpoints imunológicos podem ser mais eficazes neste tipo de tumor (Gao *et al.*, 2021).

Devido ao comprometimento imunológico e a presença de linfócitos no CCEO, a terapia anti-PD-1/PD-L1 é considerada uma opção de tratamento potencial. No entanto, a heterogeneidade do tumor, as diferenças nas condições imunológicas dos pacientes e a inter-relação entre células tumorais e células estromais dentro do MAT podem afetar a eficácia terapêutica dos bloqueios de checkpoints imunológicos. Portanto, para maximizar o benefício do bloqueio do eixo PD-1/PD-L1, encontrar um preditor eficiente (os possíveis parâmetros clínicos ou fatores biológicos) antes do tratamento é de grande importância (Gao *et al.*, 2021).

Parvez *et al.*, (2023) em seu estudo ofereceram uma visão geral aprofundada da importância do PD-1/PD-L1 na imunoterapia do câncer e suas implicações futuras na oncologia. Embora a promessa das terapias PD-1/PD-L1 seja inegável, a ciência luta com questões não resolvidas. Determinar a dosagem ideal, garantir a segurança, identificar a eficácia exata e superar a resistência inata e adquirida representam desafios significativos. Além disso, entender as complexidades dos mecanismos desses inibidores ressalta a necessidade de pesquisas mais aprofundadas.

A reprogramação metabólica associada às proteínas checkpoints imunológicas é essencial para entender o desenvolvimento de resistência e eventos adversos relacionados ao sistema imunológico. Além disso, pode fornecer informações valiosas para potenciais biomarcadores ou terapias metabólicas direcionadas combinadas com imunoterapias para melhorar a resposta e a sobrevida do paciente. As células cancerígenas geralmente superexpressam a proteína de checkpoint imunológico PD-L1. Este ligante também pode alterar o metabolismo das células cancerígenas e a disponibilidade de nutrientes no microambiente do tumor, afetando a função antitumoral das células T. Além disso, já se sabe que as células malignas também podem expressar PD-1, resultando na reprogramação do seu metabolismo (Stirling *et al.*, 2022).

Cramer, Burtness e Ferris (2019) ressaltaram que ao interpretar a expressão de PD-L1 como biomarcador em diferentes estudos é muito desafiador devido à variedade de ensaios dificultando comparações entre estudos. Projetos de padronização para ensaios de PD-L1 têm sido propostos pela comunidade científica e por agências reguladoras. Enquanto o nível de expressão de PD-L1 pode ajudar na seleção de pacientes para terapia com pembrolizumabe em combinação com

quimioterapia versus monoterapia, pacientes com CCECP negativos para PD-L1 também podem se beneficiar de agentes anti-PD-1.

A contínua pesquisa sobre a modulação desses caminhos imunológicos promete avanços significativos na terapia oncológica personalizada. A análise da expressão de PD-L1 e outros biomarcadores no MAT tem revelado diferenças significativas na resposta imunológica entre os pacientes, sugerindo que a imunoexpressão desses marcadores deve ser utilizada para estratificar pacientes e personalizar cada vez mais as abordagens terapêuticas (Jin *et al.*, 2023; Zhong *et al.*, 2020).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

O objetivo deste estudo foi avaliar a imunexpressão de PD-1 e PD-L1 em CCEAB e CCEP e analisar as associações clínico-patológicas.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Identificar a imunexpressão de PD-1 e PD-L1 em parênquima e em estroma nos CCEAB e CCEP.
- Avaliar a imunexpressão de PD-1 e PD-L1 de acordo com os dados clínicos como: idade, sexo e localização anatômica.
- Analisar a imunexpressividade de PD-1 e PD-L1 de acordo com as características histopatológicas como: grau histopatológico, padrões de invasão, grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear e níveis de infiltrado inflamatório.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Aspectos éticos**

Para a realização desse estudo foram seguidos todos os aspectos éticos específicos estabelecidos pelas diretrizes e normas da Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde. A presente pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil), submetida à análise de seu conteúdo e aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco, parecer nº 3.982.514 (Anexo A).

### **4.2 Caracterização do estudo**

Este estudo foi caracterizado como uma pesquisa observacional em base de dados de caráter descritivo, retrospectivo e correlacional da expressão de PD-1 e PD-L1 em CCEAB e CCCEP.

### **4.3 População**

Os casos analisados foram obtidos através dos arquivos dos laboratórios de Patologia Oral localizados na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) campus Campina Grande (PB) e na Universidade de Pernambuco (UPE) campus Recife (PE). Os mesmos possuíam diagnóstico definitivo de CCEAB e CCEP, e através dos blocos de parafina utilizados para análise histopatológica realizou-se as análises histomorfológica e imunoistoquímica.

### **4.4 Amostra**

O estudo foi realizado com uma amostra não probabilística de conveniência, constituída por 20 espécimes com diagnósticos histopatológicos de CCEAB e CCEP que foram fixados por formol a 10% e incluídos em blocos de parafina.

Foram incluídos 10 casos de CCEAB e 10 casos de CCEP. Para a análise, foram realizados exames microscópicos em cinco campos de epitélio e cinco campos

de estroma por caso, totalizando 100 campos de observação para cada região anatômica. Esse estudo avaliou o comportamento das proteínas PD-1 e PD-L1 no microambiente tumoral, buscando identificar padrões de expressão e possíveis correlações com as características clínicas e histopatológicas. As análises imunoistoquímicas abrangeram a contagem de células tumorais e inflamatórias positivas e negativas, fornecendo dados sobre a imunoexpressão desses marcadores.

#### **4.4.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos na amostra casos de CCEAB e CCEP, com material tumoral disponível, em blocos de parafina, e com registros clínicos correspondentes ao paciente, como: idade, sexo e localização anatômica.

#### **4.4.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos os casos com falta de dados clínicos, quantidade insuficiente de tecido tumoral no bloco de parafina ou com histórico de carcinoma prévio de cabeça e pescoço.

### **4.5 Variáveis do estudo**

Foram definidas e analisadas as variáveis clínicas (sexo, idade e localização anatômica) e as variáveis histopatológicas (grau histopatológico, padrão de invasão, grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear e níveis de infiltrado inflamatório). Sendo possível assim, uma investigação das relações entre a expressão dos marcadores e as características clínicas e histopatológicas dos tumores (Quadros 1 e 2).

#### **4.5.1 Variáveis independentes:**

- a. **Sexo:** Para avaliar se existe diferença na expressão desses marcadores com relação ao tipo de gênero, masculino ou feminino.

- b. **Idade:** Analisar a faixa etária dos casos estudados.
- c. **Localização do tumor:** A localização anatômica dos CCE, dividida entre assoalho bucal e palato, foi adotada para entender as diferenças na expressão dos marcadores PD-1 e PD-L1 e avaliar se a localização influenciava a expressão dos marcadores no parênquima e no estroma.
- d. **Intensidade do infiltrado inflamatório:** Esta variável foi categorizada em intenso/moderado e escasso/ausente para determinar sua correlação com a expressão de PD-1 e PD-L1.
- e. **Padrão de invasão tumoral:** Os padrões de invasão foram classificados em bordas bem delimitadas/cordões sólidos e pequenos grupos ou cordões/infiltração difusa. Esta categorização permitiu a análise do impacto do padrão de invasão na expressão dos marcadores.
- f. **Grau de pleomorfismo nuclear:** O pleomorfismo nuclear foi dividido em pouco/moderado e intenso/extremo, para avaliar a heterogeneidade celular e sua influência na expressão de PD-1 e PD-L1.
- g. **Grau histopatológico:** Os tumores foram categorizados em alto/moderado e baixo/ausente grau histopatológico, contribuindo para entender se a diferenciação tumoral impacta a expressão dos marcadores.
- h. **Grau de ceratinização:** Esta variável foi classificada em alto/moderado e baixo/ausente. A ceratinização do tumor foi investigada para verificar sua correlação com a expressão de PD-1 e PD-L1.

**Quadro 1.** Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo

Variável	Categoria
Sexo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Masculino</li> <li>- Feminino</li> </ul>
Idade	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Jovens (até 19 anos)</li> <li>- Adultos (20 até 59 anos)</li> <li>- Idosos (acima de 60 anos)</li> </ul>
Localização do tumor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Assoalho Bucal</li> <li>- Palato</li> </ul>
Intensidade do infiltrado inflamatório	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Intenso/ moderado</li> <li>- Escasso/ ausente</li> </ul>
Padrão de invasão tumoral	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bordas bem delimitadas/ cordões sólidos</li> <li>- Pequenos grupos ou cordões/ infiltração difusa</li> </ul>
Grau de pleomorfismo nuclear	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pouco/ moderado</li> <li>- Intenso/ extremo</li> </ul>
Grau histopatológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto/ moderado</li> <li>- Baixo/ ausente</li> </ul>
Grau de ceratinização	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto/ moderado</li> <li>- Baixo/ ausente</li> </ul>

Fonte: Autoria Própria (2024)

#### 4.5.2 Variáveis dependentes:

- a. **Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima):** O percentual de células tumorais no parênquima que expressam PD-1 foi medido e analisado em relação às variáveis independentes. Esta variável permitiu avaliar a expressão de PD-1 nas células tumorais localizadas no parênquima.



- b. **Percentual de células positivas para PD-1 (estroma):** A análise do percentual de células positivas para PD-1 no estroma ajudou a entender como o microambiente tumoral pode influenciar a expressão de PD-1.
- c. **Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima):** Esta variável representou o percentual de células tumorais no parênquima que expressam PD-L1, considerando que a expressão de PD-L1 foi correlacionada com as características clínicas e histopatológicas dos tumores.
- d. **Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma):** Similar ao PD-1, o percentual de células positivas para PD-L1 no estroma foi analisado para entender a influência do microambiente tumoral na expressão deste marcador.

**Quadro 2.** Variáveis dependentes analisadas no estudo

Variável	Categoria
PD-1 (parênquima)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Positiva</li><li>- Negativa</li></ul>
PD-1 (estroma)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Positiva</li><li>- Negativa</li></ul>
PD-L1 (parênquima)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Positiva</li><li>- Negativa</li></ul>
PD-L1 (estroma)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Positiva</li><li>- Negativa</li></ul>

Fonte: Autoria Própria (2024)

**4.6. Estudo clínico**

Informações relativas ao sexo, idade e localização anatômica das lesões foram coletadas a partir de informações contidas nos prontuários médicos e armazenados num banco de dados nos Laboratórios de Patologia da UEPB e UPE.

#### 4.7. Estudo morfológico

Para o desenvolvimento do estudo morfológico, foi realizada uma avaliação dos aspectos histomorfológicos dos casos selecionados. As amostras fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina foram submetidas a cortes histológicos de 5µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e analisados sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) nos aumentos de 40x, 100x e 400x. A classificação histopatológica dos CCEs foi realizada no front de invasão tumoral, conforme o sistema proposto por Bryne *et al.* (1992) (Quadro 3).

**Quadro 3.** Sistema de gradação histopatológica de malignidade no *front* de invasão, proposto por Bryne *et al.* (1992)

Aspectos morfológicos	Escore de malignidade			
	1	2	3	4
<b>Grau de Ceratinização</b>	Alto(> 50% das células)	Moderado (20-50% das células)	Baixo (>5<20% das células)	Ausente (0-5% das células)
<b>Pleomorfismo Nuclear</b>	Pouco (>75% de células maduras)	Moderado(50 a 75% de células maduras)	Intenso(>25< 50% de células maduras)	Extremo(0 a 25% de células maduras)
<b>Padrão de Invasão</b>	Bordas Infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)	Infiltração difusa e pronunciada, em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15)
<b>Infiltrado Inflamatório</b>	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Fonte: Bryne *et al.* (1992)

Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso. As lesões com escore final menor ou igual a 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade e os tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA *et al.*, 2007).

4.8 Estudo imunoistoquímico

A amostra selecionada, previamente fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltrietoxisilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Envision™ Flex+, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, EUA), utilizando anticorpos policlonais anti-PD-1 e anti-PD-L1. (Quadro 4).

**Quadro 4.** Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
PD-1	PAA751Hu01	Cloud-Clone Corp.	1:200	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight
PD-L1	MAA788Hu22	Cloud-Clone Corp.	1:3000	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight

Fonte: Autoria própria (2024)

Como controle positivo, para todos os anticorpos, foram utilizados cortes histológicos de tonsila humana. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Odontologia da UEPB.

A técnica de imunoistoquímica utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol aquecido (15 minutos cada);
- ⇒ Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);

- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
  - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- ⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 2);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpos primários, em solução diluente (*EnVision™ Flex antibody diluent*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), a 4°C em câmara úmida;
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário polimerizado à peroxidase (*EnVision™ Flex/HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);

- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (EnVision™ Flex DAB+, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Harris, à temperatura ambiente (1 minuto);
- ⇒ Desidratação em álcool absoluto:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

#### 4.9. Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, as lâminas foram escaneadas em imagens digitais de alta resolução (MoticEasyScan Pro 6, Motic Inc., Richmond, BC, CAN) e, posteriormente, visualizadas no programa DSAssistant (Motic Inc., Richmond, BC, CAN). As imunoexpressões das proteínas PD-1 e PD-L1 foram avaliadas separadamente no parênquima e no estroma dos CCEAB e CCEP.

Com base em uma adaptação da metodologia utilizada no estudo de Lenouvel et al. (2021), foi realizada uma análise quantitativa da imunoexpressão de PD-1 e PD-L1. Sob aumento de 100x (DSAssistant, Motic Inc., Richmond, BC, CAN), foram identificadas as áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos, que apresentaram pigmentos de coloração acastanhada. Posteriormente, sob aumento de 400x (DSAssistant, Motic Inc., Richmond, BC, CAN), para cada caso selecionado foram fotomicrografados cinco campos em parênquima e cinco campos em estroma. Em seguida, com o auxílio do programa ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java,

National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), foram realizadas as contagens das células imunomarcadas e das células negativas em cada um dos campos microscópicos. Os valores obtidos em cada um desses campos foram somados, estabelecendo-se o percentual de células neoplásicas e estromais positivas em relação ao total de células contadas.

#### **4.10. Análise estatística**

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2007®). Os resultados obtidos com os estudos clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (Versão 20.0, IBM SPPS Inc., Armonk, NY, USA).

A estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para PD-1 e PD-L1 foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas, de acordo com os grupos de lesões. Possíveis correlações entre as imunoexpressões das proteínas foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

5. RESULTADOS

Ao analisar os dados clínicos referentes a idade e ao sexo entre as regiões anatômicas estudadas, foi possível verificar que nos casos de CCEAB a idade variou de 50 a 80 anos. Já nos casos de CCEP a idade variou entre 58 a 87 anos. Com relação ao sexo, nos casos de CCEAB predominou mais casos envolvendo pacientes do sexo masculino com 90% dos casos. Já com relação aos casos de CCEP houve predominância dos pacientes do sexo feminino com 70% dos casos. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Dados clínicos dos casos de CCEAB e CCEP.

Dados clínicos	CCEAB	CCEP
<i>Idade (em anos)*</i>		
Variação	50 – 80	58 – 87
Média ± desvio padrão	65,0±11,1	73,1 ± 10,8
<i>Sexo</i>		
Feminino	1 (10,0%)	7 (70,0%)
Masculino	9 (90,0%)	3 (30,0%)

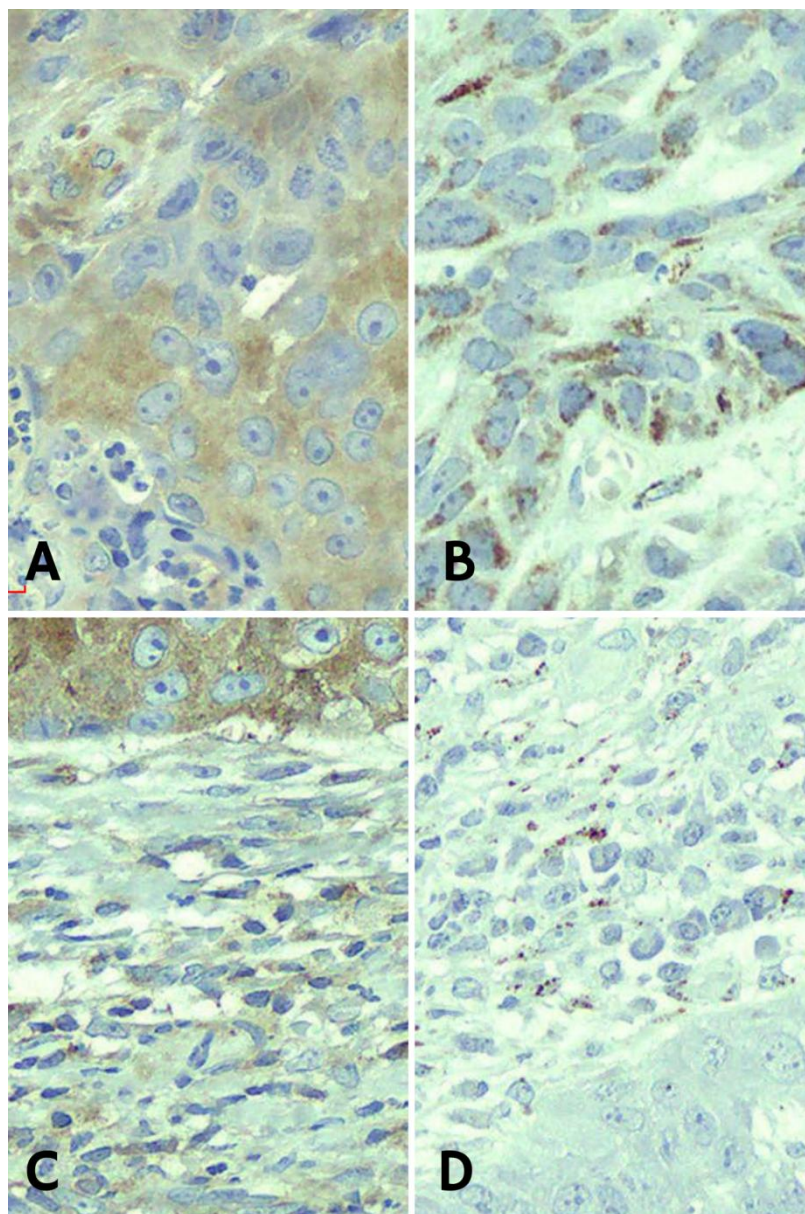
\* Informação indisponível em 02 casos de CCEP  
Fonte: Autoria Própria (2024)

### **5.1 Imunoexpressão de PD-1**

A análise dos casos de CCEAB e CCEP revelou importantes dados sobre a imunoexpressão dos marcadores analisados, com foco tanto no parênquima quanto no estroma dos tumores (Figuras 5 e 6). Para o CCEAB, a imunoexpressão no parênquima foi observada em 90% dos casos, com uma mediana de 24,8% e uma variação que oscilou entre 0,0% e 85,0%. Já no estroma, a positividade foi identificada em todos os casos, apresentando uma mediana de 28,7% e uma variação entre 10,7% e 41,0%. Em contraste, nos casos de CCEP, a imunoexpressão no parênquima esteve presente em todos os casos analisados, com uma mediana mais elevada de 37,0% e uma variação que variou de 0,6% a 99,9%. No estroma, a positividade também foi observada em todos os casos, com uma mediana de 42,7% e variações entre 1,3% e 87,8% (Figura 7).

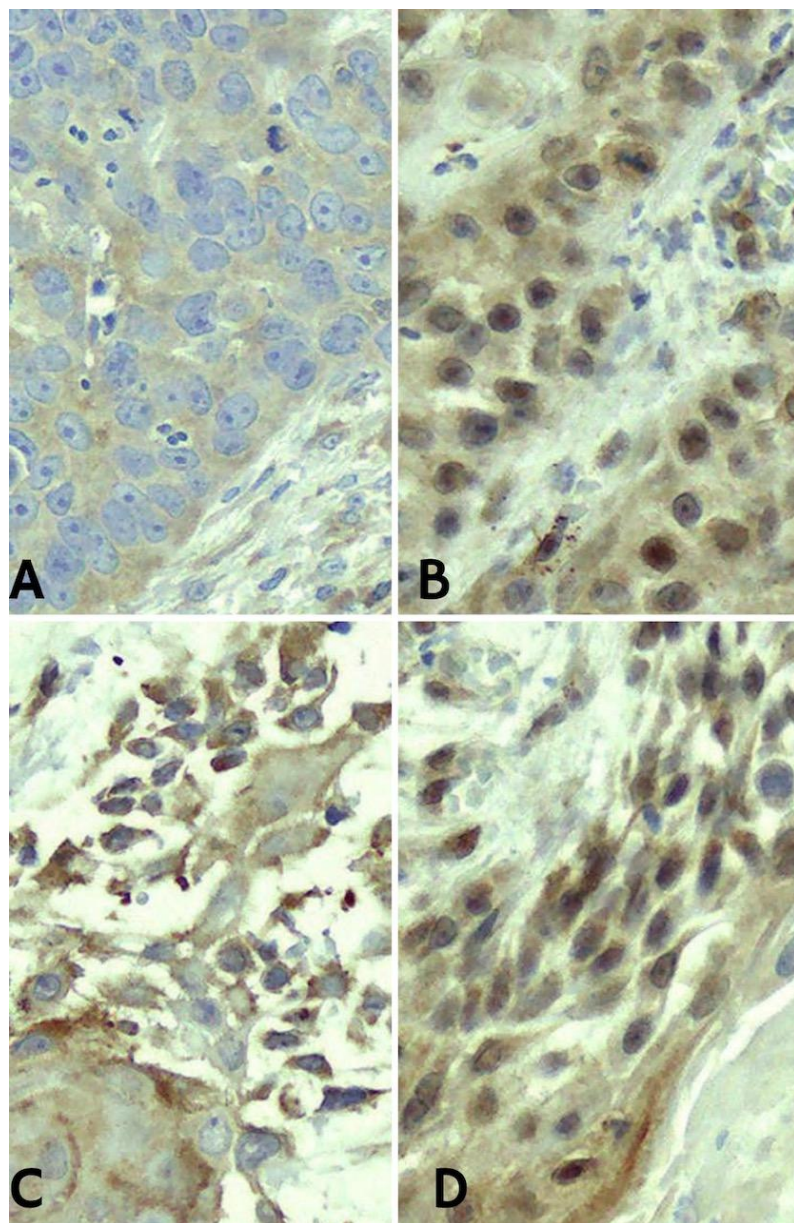


**Figura 5.** Imagens digitais de alta resolução das lâminas escaneadas de CCEAB demonstrando células imunopositivas para PD-L1 (A e C) e PD-1 (B e D) no parênquima (A e B) e no estroma (C e D).



Fonte: Autoria própria (2024)

**Figura 6.** Imagens digitais de alta resolução das lâminas escaneadas de CCEP demonstrando células imunopositivas para PD-L1 (A e C) e PD-1 (B e D) no parênquima (A e B) e no estroma (C e D).

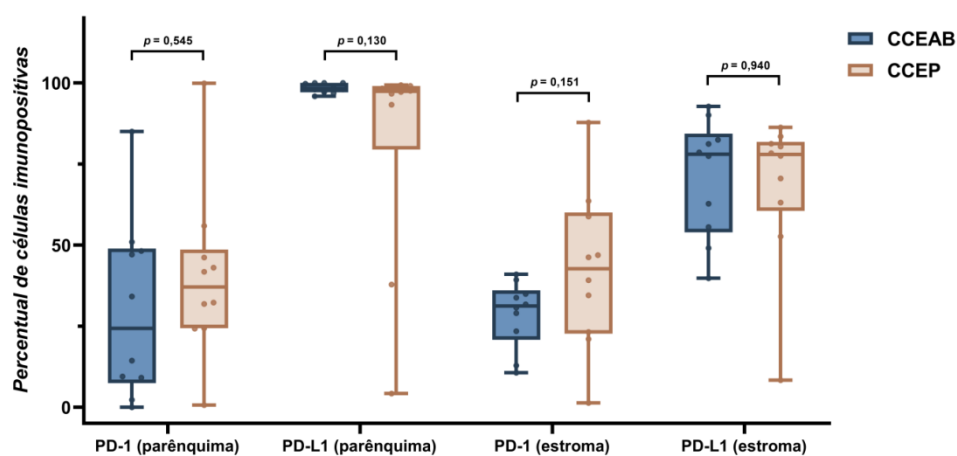


Fonte: Autoria própria (2024)

## 5.2 Imunoexpressão de PD-L1

Especificamente para a imunoexpressão de PD-L1, no CCEAB, todos os casos mostraram positividade tanto no parênquima quanto no estroma (Figuras 5). No parênquima, a mediana foi de 98,4%, com uma variação de 95,9% a 100,0%. No estroma, a mediana foi de 71,0%, variando de 39,8% a 92,8% (Figura 7). Nos casos de CCEP, a imunoexpressão de PD-L1 também foi positiva em todos os casos (Figura 6). No parênquima, a mediana foi de 82,3%, com variações de 4,2% a 99,4%, enquanto no estroma, a mediana foi de 68,2%, com variações de 8,4% a 86,3% (Figura 7).

**Figura 7.** Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma dos CCEAB e CCEP.



A Tabela 2 apresenta os resultados do Teste de Mann-Whitney para o percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e estroma, tanto no assoalho bucal quanto no palato.

#### **PD-1**

Os valores de Mean Rank e Sum of Ranks indicam uma distribuição das células positivas, onde no parênquima, o palato apresentou um Mean Rank maior (11,30) comparado ao assoalho bucal (9,70). Para o estroma, a diferença é ainda mais pronunciada, com o palato apresentando um Mean Rank de 12,40 em comparação a 8,60 do assoalho bucal.

#### **PD-L1**

Os valores de Mean Rank e Sum of Ranks indicam uma distribuição das células positivas, onde no parênquima, o assoalho bucal apresentou um Mean Rank maior (12,50) comparado ao assoalho bucal (8,50). Para o estroma, a diferença é pouco pronunciada, com o assoalho bucal apresentando um Mean Rank de 10,60 em comparação a 10,40 do assoalho bucal.

**Tabela 2.** Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes localizações (parênquima e estroma)

Localização	N	Mean Rank	Sum of Ranks
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)</b>			
Assoalho bucal	10	9,70	97,00
Palato	10	11,30	113,00
Total	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)</b>			
Assoalho bucal	10	8,60	86,00
Palato	10	12,40	124,00
Total	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)</b>			
Assoalho bucal	10	12,50	125,00
Palato	10	8,50	85,00
Total	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)</b>			
Assoalho bucal	10	10,60	106,00
Palato	10	10,40	104,00
Total	20		

Fonte: Autoria própria (2024)

A Tabela 3 detalha os resultados estatísticos do Teste de Mann-Whitney para os mesmos grupos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 entre as diferentes localizações (associadas aos valores de p maiores que 0,05. Embora o Mean Rank sugira uma variação na expressão dos marcadores, essas diferenças não são suficientes para rejeitar a hipótese nula de igualdade entre os grupos).

**Tabela 3.** Teste de Mann-Whitney para Percentual de Células Positivas para PD-1 e PD-L1 em Diferentes Localizações (Parênquima e Estroma)

Teste Estatístico <sup>b</sup>	Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)
Mann-Whitney U	42,000	31,000	30,000	49,000
Wilcoxon W	97,000	86,000	85,000	104,000
Z	-0,605	-1,436	-1,514	-0,076
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,545	0,151	0,130	0,940
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,579 <sup>a</sup>	0,165 <sup>a</sup>	0,143 <sup>a</sup>	0,971 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.  
b. Grouping Variable: Localização  
Fonte: Autoria própria (2024)

Os resultados da Tabela 4 se concentram nos percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus histopatológicos (alto e baixo). A análise revela que os graus histopatológicos apresentam uma distribuição de células positivas em que os tumores de alto grau, na maioria dos casos, possuem um Mean Rank superior ao dos tumores de baixo grau, indicando uma maior expressão de PD-1 e PD-L1 nos tumores de maior agressividade.



**Tabela 4.** Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus histopatológicos (parênquima e estroma)

Grau histopatológico	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)			
Baixo grau	7	8,43	59,00
Alto grau	13	11,62	151,00
Total	20		
Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)			
Baixo grau	7	9,00	63,00
Alto grau	13	11,31	147,00
Total	20		
Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)			
Baixo grau	7	8,86	62,00
Alto grau	13	11,38	148,00
Total	20		
Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)			
Baixo grau	7	8,29	58,00
Alto grau	13	11,69	152,00
Total	20		

Fonte: Autoria própria (2024)



A análise estatística para os diferentes graus histopatológicos revela que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, com valores de p acima de 0,05 (Tabela 5), sugerindo que a expressão de PD-1 e PD-L1 não varia significativamente entre os diferentes graus histopatológicos analisados, o que implica que a expressão dessas proteínas não está diretamente relacionada com o grau de malignidade dos tumores.

**Tabela 5.** Teste de Mann-Whitney para Percentual de Células Positivas para PD-1 e PD-L1 em Diferentes Graus Histopatológicos (Parênquima e Estroma)

Teste Estatístico <sup>b</sup>	Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)
Mann-Whitney U	31,000	35,000	34,000	30,000
Wilcoxon W	59,000	63,000	62,000	58,000
Z	-1,149	-0,832	-0,913	-1,228
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,251	0,405	0,361	0,219
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,275 <sup>a</sup>	0,438 <sup>a</sup>	0,393 <sup>a</sup>	0,241 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.  
b. Grouping Variable: Grau histopatológico de malignidade  
Fonte: Autoria própria (2024)

A Tabela 6 apresenta os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes padrões de invasão, envolvendo bordas bem delimitadas/cordões, bandas ou trabéculas versus pequenos grupos ou cordões/infiltração difusa e pronunciada, sendo possível observar que os padrões de invasão têm um impacto na distribuição dos percentuais de células positivas, com o grupo de pequenos grupos ou cordões/infiltração difusa e pronunciada geralmente apresentando um Mean Rank maior, indicando maior expressão de PD-1 nesses casos. No entanto, nota-se maior expressão de PD-L1 no padrão de invasão envolvendo bordas bem delimitadas/cordões, bandas ou trabéculas.

**Tabela 6.** Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes padrões de invasão (parênquima e estroma)

<b>Padrão de invasão</b>	<b>N</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Sum of Ranks</b>
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)</b>			
<b>Bordas bem delimitadas/cordões, bandas ou trabéculas</b>	8	7,75	62,00
<b>Pequenos grupos ou cordões/Infiltração difusa e pronunciada</b>	12	12,33	148,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)</b>			
<b>Bordas bem delimitadas/cordões, bandas ou trabéculas</b>	8	9,88	79,00
<b>Pequenos grupos ou cordões/Infiltração difusa e pronunciada</b>	12	10,92	131,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)</b>			
<b>Bordas bem delimitadas/cordões, bandas ou trabéculas</b>	8	10,88	87,00
<b>Pequenos grupos ou cordões/Infiltração difusa e pronunciada</b>	12	10,25	123,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)</b>			
<b>Bordas bem delimitadas/cordões, bandas ou trabéculas</b>	8	11,00	88,00
<b>Pequenos grupos ou cordões/Infiltração difusa e pronunciada</b>	12	10,17	122,00
<b>Total</b>	20		

Os resultados do Teste de Mann-Whitney apresentados na Tabela 7 para os padrões de invasão não mostram diferenças estatisticamente significativas (valores de  $p > 0,05$ ), indicando que, apesar das variações observadas no Mean Rank, essas não são suficientes para estabelecer uma diferença significativa na expressão dos marcadores entre os diferentes padrões de invasão.

**Tabela 7.** Teste de Mann-Whitney para Percentual de Células Positivas para PD-1 e PD-L1 em Diferentes Padrões de Invasão (Parênquima e Estroma)

Teste Estatístico <sup>b</sup>	Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)
Mann-Whitney U	26,000	43,000	45,000	44,000
Wilcoxon W	62,000	79,000	123,000	122,000
Z	-1,697	-0,386	-0,232	-0,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,090	0,700	0,817	0,758
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,098 <sup>a</sup>	0,734 <sup>a</sup>	0,851 <sup>a</sup>	0,792 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.  
b. Grouping Variable: Padrão de invasão categorizado  
Fonte: Autoria própria (2024)

A Tabela 8 se concentra nos percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus de ceratinização (alto/moderado versus baixo/ausente). Embora tenha obtido apenas 6 casos com grau de ceratinização baixo/ausente. Os resultados sugerem que os graus de ceratinização influenciam a distribuição das células positivas, com baixo grau/ausente apresentando um Mean Rank superior em parênquima e estroma, tanto para PD-1 quanto para PD-L1, o que sugere uma maior expressão dos marcadores nesses casos.

**Tabela 8.** Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus de ceratinização (parênquima e estroma)

Grau de ceratinização	N	Mean Rank	Sum of Ranks
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)</b>			
Alto/Moderado	14	10,14	142,00
Baixo/Ausente	6	11,33	68,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)</b>			
Alto/Moderado	14	10,21	143,00
Baixo/Ausente	6	11,17	67,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)</b>			
Alto/Moderado	14	10,43	146,00
Baixo/Ausente	6	10,67	64,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)</b>			
Alto/Moderado	14	9,79	137,00
Baixo/Ausente	6	12,17	73,00
<b>Total</b>	20		

Fonte: Autoria própria (2024)

A análise estatística demonstrada na Tabela 9 para os graus de ceratinização não revela diferenças significativas, com valores de p superiores a 0,05, sugerindo que a ceratinização do tumor não tem um impacto significativo na expressão de PD-1 e PD-L1.

**Tabela 9.** Teste de Mann-Whitney para Percentual de Células Positivas para PD-1 e PD-L1 em Diferentes Graus de Ceratinização (Parênquima e Estroma)

Teste Estatístico <sup>b</sup>	Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)
Mann-Whitney U	37,000	38,000	41,000	32,000
Wilcoxon W	142,000	143,000	146,000	137,000
Z	-0,412	-0,330	-0,083	-0,825
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,680	0,741	0,934	0,409
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,718 <sup>a</sup>	0,779 <sup>a</sup>	0,968 <sup>a</sup>	0,444 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.  
b. Grouping Variable: Grau de ceratinização categorizado  
Fonte: Autoria própria (2024)

Na Tabela 10, são apresentados os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus de pleomorfismo nuclear (pouco/moderado versus intenso/extremo). A distribuição das células positivas indica que os tumores com pleomorfismo nuclear pouco/moderado tendem a ter um Mean Rank maior para a expressão de PD-1 (parênquima) e PD-L1 (estroma). Já a expressão de PD-1 (estroma) e PD-L1 (parênquima) obtiveram um Mean Rank maior no grupo de tumores intenso/extremo, o que indica uma maior expressão de células positivas nesses casos.



**Tabela 10.** Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes graus de pleomorfismo nuclear (parênquima e estroma)

<b>Pleomorfismo nuclear</b>	<b>N</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Sum of Ranks</b>
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)</b>			
<b>Pouco/Moderado</b>	16	11,13	178,00
<b>Intenso/Extremo</b>	4	8,00	32,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)</b>			
<b>Pouco/Moderado</b>	16	10,38	166,00
<b>Intenso/Extremo</b>	4	11,00	44,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)</b>			
<b>Pouco/Moderado</b>	16	10,25	164,00
<b>Intenso/Extremo</b>	4	11,50	46,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)</b>			
<b>Pouco/Moderado</b>	16	11,19	179,00
<b>Intenso/Extremo</b>	4	7,75	31,00
<b>Total</b>	20		

Fonte: Autoria própria (2024)

Os resultados do Teste de Mann-Whitney para o pleomorfismo nuclear mostram que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (valores de  $p > 0,05$ ) (Tabela 11), sugerindo que o pleomorfismo nuclear não afeta significativamente a expressão dos marcadores PD-1 e PD-L1.

**Tabela 11.** Teste de Mann-Whitney para Percentual de Células Positivas para PD-1 e PD-L1 em Diferentes Graus de Pleomorfismo Nuclear (Parênquima e Estroma)

Teste Estatístico <sup>b</sup>	Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)
Mann-Whitney U	22,000	30,000	28,000	21,000
Wilcoxon W	32,000	166,000	164,000	31,000
Z	-0,945	-0,189	-0,379	-1,039
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,345	0,850	0,705	0,299
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,385 <sup>a</sup>	0,892 <sup>a</sup>	0,750 <sup>a</sup>	0,335 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.  
b. Grouping Variable: Pleomorfismo nuclear categorizado  
Fonte: Autoria própria (2024)

A Tabela 12 apresenta os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes níveis de infiltrado inflamatório (intenso/moderado versus escasso/ausente). Os resultados indicam que os infiltrados inflamatórios mais intensos/moderados apresentam um Mean Rank menor para a expressão de PD-1 (parênquima e estroma) e PD-L1 (estroma) em comparação com os infiltrados escassos/ausentes. Como pode-se observar a expressão de PD-L1 (parênquima) obteve um Mean Rank maior para o infiltrado inflamatório intenso/moderado. Entretanto, a análise estatística para os níveis de infiltrado inflamatório revela que, para PD-L1 no estroma, há uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,017$ ) (Tabela 13), indicando que a expressão de PD-L1 no estroma é afetada pelo nível de infiltrado inflamatório. Para os outros grupos, as diferenças não são significativas.

**Tabela 12.** Percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes níveis de infiltrado inflamatório (parênquima e estroma)

<b>Infiltrado inflamatório</b>	<b>N</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Sum of Ranks</b>
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)</b>			
<b>Intenso/Moderado</b>	14	9,36	131,00
<b>Escasso/Ausente</b>	6	13,17	79,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)</b>			
<b>Intenso/Moderado</b>	14	10,00	140,00
<b>Escasso/Ausente</b>	6	11,67	70,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)</b>			
<b>Intenso/Moderado</b>	14	10,79	151,00
<b>Escasso/Ausente</b>	6	9,83	59,00
<b>Total</b>	20		
<b>Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)</b>			
<b>Intenso/Moderado</b>	14	8,43	118,00
<b>Escasso/Ausente</b>	6	15,33	92,00
<b>Total</b>	20		

Fonte: Autoria própria (2024)

**Tabela 13.** Teste de Mann-Whitney para Percentual de Células Positivas para PD-1 e PD-L1 em Diferentes Níveis de Infiltrado Inflamatório (Parênquima e Estroma)

Teste Estatístico <sup>b</sup>	Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)
Mann-Whitney U	26,000	35,000	38,000	13,000
Wilcoxon W	131,000	140,000	59,000	118,000
Z	-1,320	-0,577	-0,330	-2,392
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,187	0,564	0,741	0,017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,207 <sup>a</sup>	0,602 <sup>a</sup>	0,779 <sup>a</sup>	0,015 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.  
b. Grouping Variable: Infiltrado inflamatório categorizado  
Fonte: Autoria própria (2024)

As Tabelas 14 e 15 mostram as análises de correlação de Spearman que apresentam os resultados em CCEAB que não houve nenhuma correlação estatisticamente significativa e que em CCEP houveram duas correlações estatisticamente significativas. A primeira foi PD-1 (parênquima) e PD-1 (estroma), esta correlação positiva apresenta  $R=0,842$  e  $p=0,002$ . Outra correlação forte encontrada foi entre PD-1 (parênquima) e PD-L1 (parênquima) onde observou-se os valores de  $r=0,685$  e  $p=0,029$ .

**Tabela 14.** Teste de Spearman para correlação entre os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 (Parênquima e Estroma) em CCEAB.

			Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)
Spearman's rho	Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Correlation Coefficient	1,000	,248	,436	,212
		Sig. (2-tailed)		,489	,208	,556
		N	10	10	10	10
	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Correlation Coefficient	,248	1,000	,423	-,079
		Sig. (2-tailed)	,489		,223	,829
		N	10	10	10	10
	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Correlation Coefficient	,436	,423	1,000	-,522
		Sig. (2-tailed)	,208	,223		,122
		N	10	10	10	10
	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)	Correlation Coefficient	,212	-,079	-,522	1,000
		Sig. (2-tailed)	,556	,829	,122	
		N	10	10	10	10

**Tabela 15.** Teste de Spearman para correlação entre os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 (Parênquima e Estroma) em CCEP.

			Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)
Spearman's rho	Percentual de células positivas para PD-1 (parênquima)	Correlation Coefficient	1,000	,842**	,685*	,321
		Sig. (2-tailed)		,002	,029	,365
		N	10	10	10	10
	Percentual de células positivas para PD-1 (estroma)	Correlation Coefficient	,842**	1,000	,564	,394
		Sig. (2-tailed)	,002		,090	,260
		N	10	10	10	10
	Percentual de células positivas para PD-L1 (parênquima)	Correlation Coefficient	,685*	,564	1,000	,539
		Sig. (2-tailed)	,029	,090		,108
		N	10	10	10	10
	Percentual de células positivas para PD-L1 (estroma)	Correlation Coefficient	,321	,394	,539	1,000
		Sig. (2-tailed)	,365	,260	,108	
		N	10	10	10	10

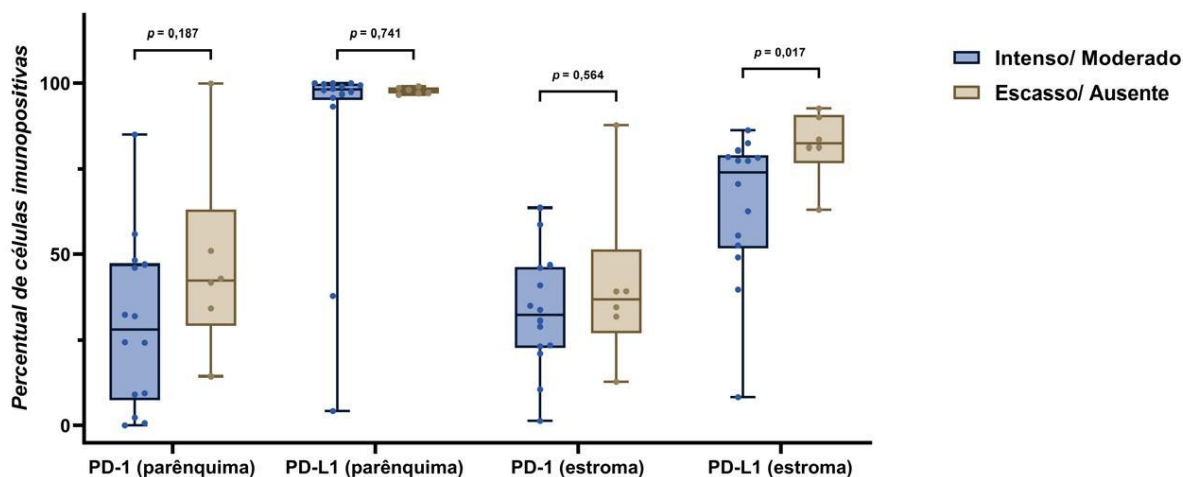
\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* . Correlation is significant at the 0.005 level (2-tailed).

No que diz respeito aos gráficos boxplot, estes auxiliaram na representação visual dos percentuais de células imunopositivas para PD-1 e PD-L1 em diferentes contextos clínicos e histopatológicos. Os gráficos a seguir ilustram a distribuição desses percentuais em função de diversas variáveis, permitindo uma análise comparativa e a identificação de possíveis padrões de expressão.

No gráfico 1, que avalia a intensidade do infiltrado inflamatório, observa-se que os tumores com infiltrado inflamatório intenso/moderado apresentam uma menor expressão de PD-1 e PD-L1 tanto no parênquima quanto no estroma. Especificamente, para PD-L1 no estroma, a diferença entre os grupos intenso/moderado e escasso/ausente é estatisticamente significativa ( $p = 0,017$ ), sugerindo uma correlação entre a escassez do infiltrado inflamatório e a expressão de PD-L1 no estroma. As demais comparações não apresentaram significância estatística, indicando que, em geral, a intensidade do infiltrado inflamatório não exerce um impacto significativo na expressão de PD-1 e PD-L1.

**Gráfico 1.** Gráfico box-splot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação a intensidade do infiltrado inflamatório

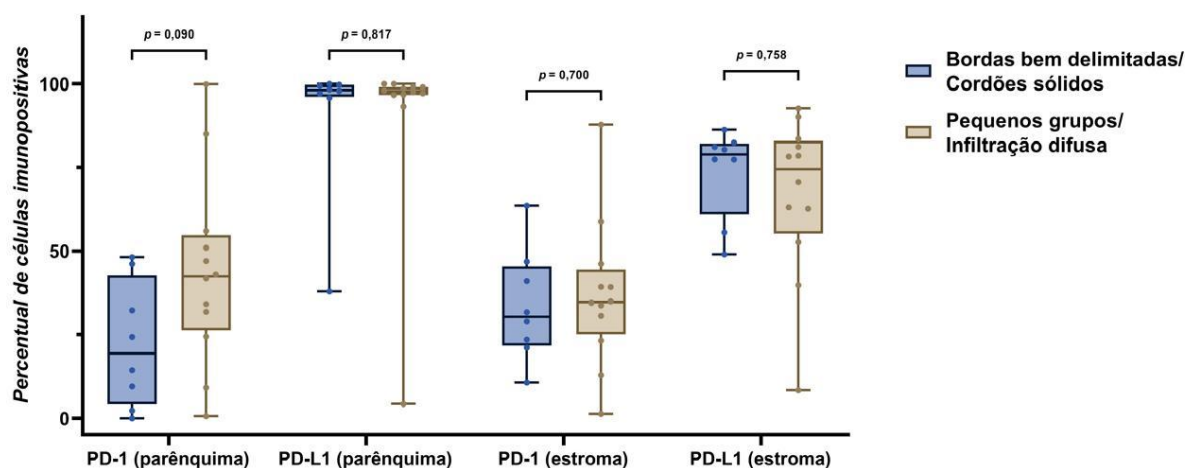


Fonte: Autoria Própria (2024)



O gráfico 2 compara os padrões de invasão, mostra que tumores com bordas bem delimitadas/cordões sólidos têm uma menor variabilidade na expressão de PD-1 e PD-L1 em comparação com aqueles que apresentam pequenos grupos ou infiltração difusa. Contudo, nenhuma das diferenças observadas entre os grupos atingiu significância estatística, conforme os valores de p apresentados. Isso sugere que, embora haja uma tendência de maior expressão em tumores com pequenos grupos/infiltração difusa, essa diferença não é robusta o suficiente para ser considerada significativa no contexto do estudo.

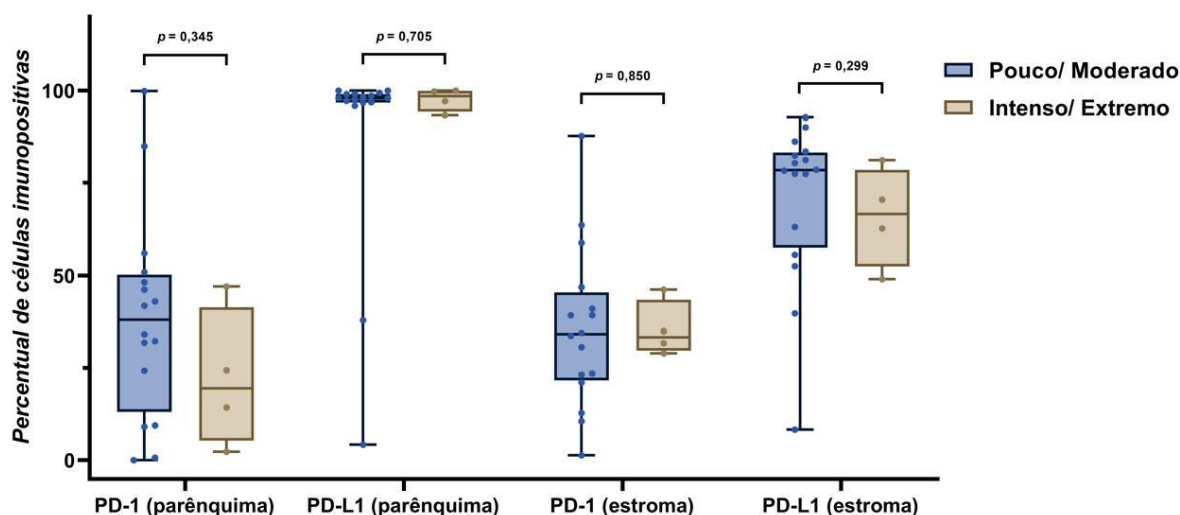
**Gráfico 2.** Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao padrão de invasão



Fonte: Autoria Própria (2024)

No gráfico 3, que aborda o pleomorfismo nuclear, a distribuição dos percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 mostra que tumores com pleomorfismo nuclear pouco/moderado tendem a ter uma maior expressão desses marcadores em comparação com aqueles com pleomorfismo intenso/extremo. Contudo, assim como nos gráficos anteriores, as diferenças não são estatisticamente significativas, indicando que o grau de pleomorfismo nuclear não tem um impacto significativo na expressão de PD-1 e PD-L1.

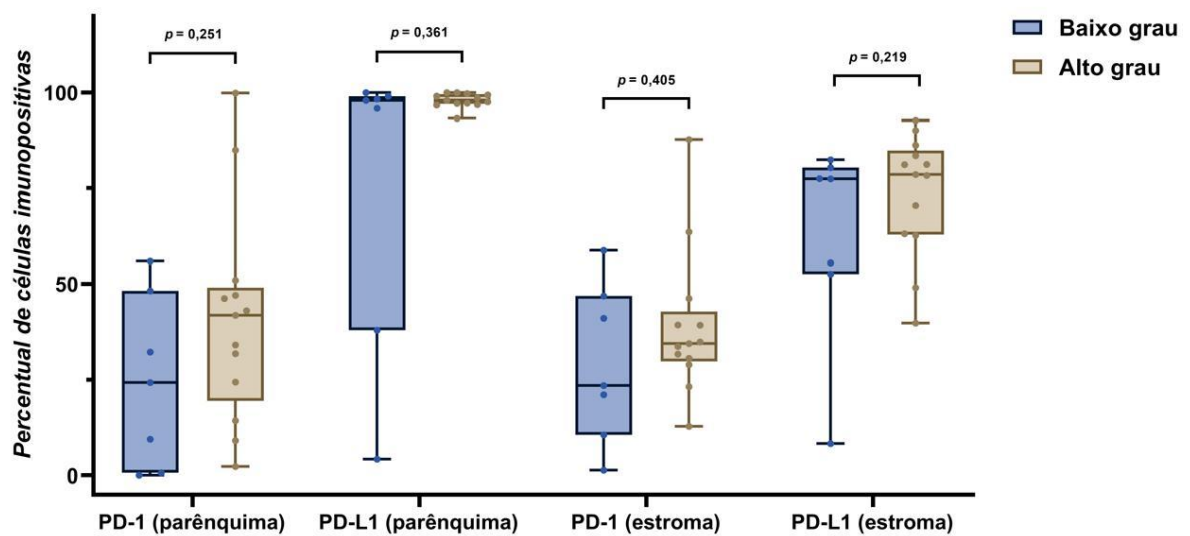
**Gráfico 3.** Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao pleomorfismo celular



Fonte: Autoria Própria (2024)

O gráfico 4 analisa a expressão dos marcadores em relação ao grau histopatológico dos tumores. Os resultados indicam que tumores de grau alto/moderado apresentam uma maior variabilidade na expressão de PD-1 e PD-L1, especialmente no estroma. No entanto, os valores de  $p$  sugerem que essas diferenças não são estatisticamente significativas, o que implica que o grau histopatológico, por si só, não é um determinante crítico na expressão desses marcadores.

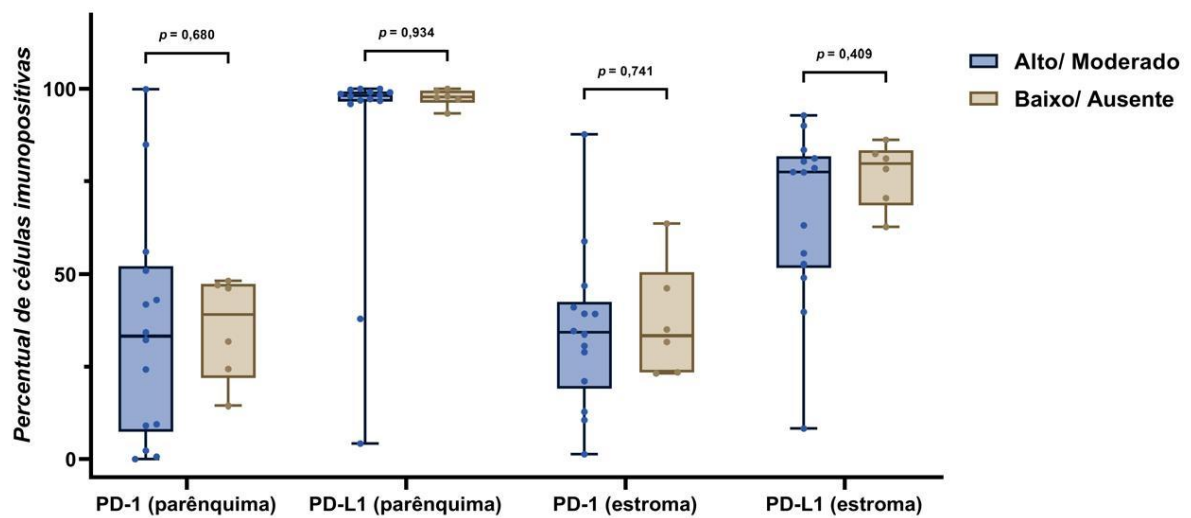
**Gráfico 4.** Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao grau histopatológico das lesões



Fonte: Autoria Própria (2024)

O gráfico 5 compara a expressão de PD-1 e PD-L1 entre diferentes grupos de ceratinização. Observa-se que tumores com baixo grau/ausente de ceratinização tendem a apresentar uma maior expressão de PD-1 (estroma) e PD-L1 (estroma). Porém, conforme os valores de  $p$  apresentados, essas diferenças não são estatisticamente significativas. Isso indica que o grau de ceratinização não é um fator determinante na expressão dos marcadores estudados.

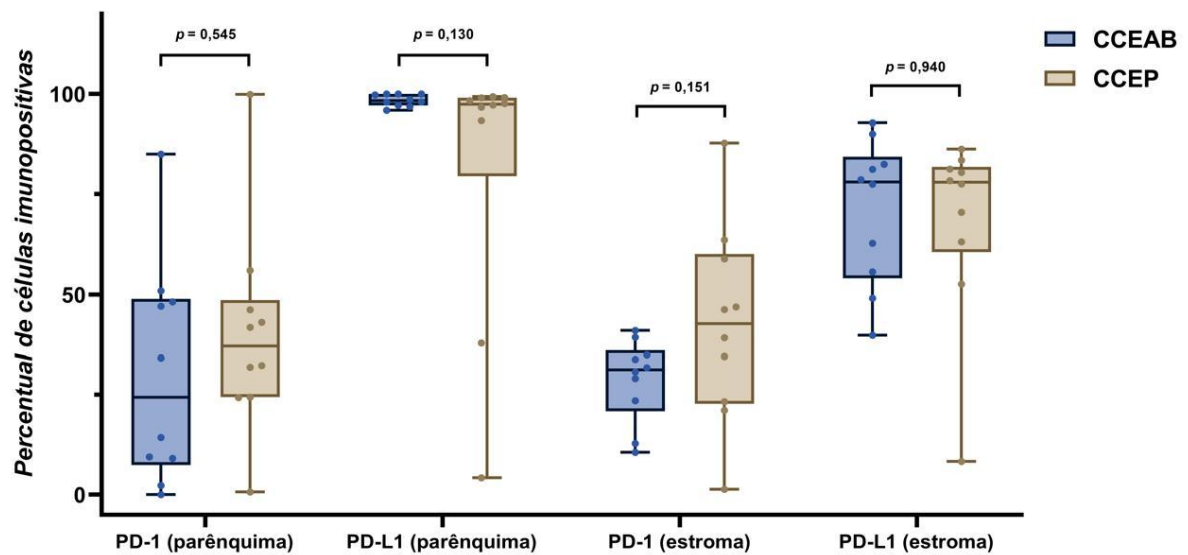
**Gráfico 5.** Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao grau de ceratinização



Fonte: Autoria Própria (2024)

O gráfico 6 ilustra as correlações entre as imunoexpressões de PD-1 e PD-L1 em diferentes localizações anatômicas e contextos clínicos. Observa-se que, para alguns comparativos, há uma tendência de correlação positiva, como no caso do percentual de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima. Isso sugere que, em certos contextos, a expressão de PD-1 e PD-L1 pode estar correlacionada, fornecendo dados para a compreensão da resposta imune no microambiente tumoral.

**Gráfico 6.** Gráficos box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma dos CCEAB e CCEP



Fonte: Autoria Própria (2024)

## **6- ARTIGO – ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PD-1 E PD-L1 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM ASSOALHO BUCAL E PALATO**

**Adriana C. B. Firmo<sup>1</sup>; Raíssa S. dos Anjos<sup>2</sup>; Elton F. Barros<sup>3</sup>; Marianne de V. Carvalho<sup>2</sup>; Cassiano F. W. Nonaka<sup>3</sup>; Gustavo P. Godoy<sup>4</sup>**

1 Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde

2 Universidade de Pernambuco, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Centro de Anatomia Patológica Integrada

3 Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

4 Universidade Federal de Pernambuco, Área Acadêmica de Patologia, Centro de Ciências Médicas

### **Endereço para correspondência:**

Adriana Carla Barbosa Firmo

Universidade Federal de Pernambuco

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde

Av. Prof Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária.

CEP: 50670-901.

Recife/PE, Brasil

Tele-fax: (81) 2126-8817

E-mail: [adrianafirmo@gmail.com](mailto:adrianafirmo@gmail.com)

ORCID <https://orcid.org/0009-0009-7039-6200>

## Resumo

**Objetivos:** Analisar o perfil imunoistoquímico de PD-1 e PD-L1 em carcinomas de células escamosas de assoalho bucal (CCEAB) e carcinomas de células escamosas de palato (CCEP), avaliando o comportamento dessas proteínas no microambiente tumoral (MAT) e suas correlações clínicas e histopatológicas.

**Metodologia:** Foram selecionados casos de CCEAB (n=10) e casos de CCEP (n=10) para realizar análises morfológicas e imunoistoquímicas. Para esta última, utilizou-se 100 campos de observação em cada localização anatômica e foram feitas as contagens das células epiteliais e das células estromais positivas e negativas, correlacionando os achados clínicos (sexo e idade) e histopatológicos (grau de malignidade, ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório) com a imunoexpressão dos marcadores PD-1 e PD-L1.

**Resultados:** Em CCEAB houve predomínio do sexo masculino (n=9; 90%), já em CCEP houve predomínio do sexo feminino (n=7; 70%). A idade dos pacientes variou entre 50 a 87 anos. A imunoexpressão de PD-1 em CCEAB foi de 100% no estroma e 90% no parênquima. Quanto à imunoexpressão de PD-1 em CCEP e de PD-L1, em CCEAB e CCEP foi de 100% no parênquima e no estroma. Nos casos com infiltrado inflamatório escasso/ ausente observou-se um maior percentual de células positivas para PD-L1 no estroma e observou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,017$ ).

**Conclusão:** O comportamento de PD-1 e PD-L1 no MAT em CCEAB e CCEP mostrou um percentual elevado de células imunomarcadas. As lesões com infiltrado inflamatório escasso/ ausente obtiveram maior percentual de PD-L1 no estroma, sugerindo uma alteração da resposta imune no MAT e sinaliza uma possível evasão imunológica.

**Palavras-chave:** Carcinoma de células escamosas; Imuno-histoquímica; Biomarcadores; Vigilância imunológica; Microambiente tumoral.

## **Introdução**

O CCEO é descrito como uma doença maligna heterogênea que possui como opções de tratamento: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Porém, existem limitações no tratamento de pacientes com câncer em estágios avançados. Apesar dos avanços significativos em procedimentos diagnósticos e terapêuticos nas últimas três décadas, ele ainda permanece com as taxas de morbidade e mortalidade altas, o que pode ser atribuído ao estágio avançado no diagnóstico e à falta de modalidades terapêuticas eficazes, de biomarcadores para diagnóstico precoce e previsão de prognóstico [1-5].

O tratamento do CCEO continua desafiador devido à sua natureza infiltrativa e à alta tendência à recidiva do tumor, levando a um prognóstico geral ruim. No caso de recorrência precoce, o prognóstico do paciente piora significativamente, com a taxa de sobrevivência caindo para menos de 30%. Melhorias mínimas nas tendências de sobrevivência em tumores recorrentes e em estágio avançado foram relatadas nas últimas décadas. A imunoterapia neoadjuvante pode representar uma nova abordagem terapêutica que muda o padrão de tratamento na terapia avançada do CCEO [6-11].

Sabe-se que as células cancerígenas podem escapar do ataque do sistema imunológico do hospedeiro através do sequestro dos circuitos regulatórios mediados por checkpoints imunológicos. Portanto, a reativação da imunidade antitumoral pelo bloqueio dos checkpoints imunológicos é uma estratégia a ser considerada para o tratamento do CCEO. A PD-1 e seu ligante PD-L1 são proteínas de checkpoints imunológicas responsáveis pela regulação negativa da estabilidade e integridade da função imune das células T. A expressão de PD-L1 nas células tumorais e no microambiente tumoral serve como um biomarcador preditivo para a resposta à imunoterapia [12-19].



Pacientes com alta expressão de PD-L1 frequentemente apresentam uma menor resposta às terapias tradicionais, mas podem responder melhor aos inibidores de checkpoints imunológicos. A utilização desses medicamentos representa uma abordagem promissora no tratamento do CCEO, destacando a importância dos marcadores PD-1 e PD-L1 como alvos terapêuticos. A contínua pesquisa sobre a modulação desses caminhos imunológicos promete avanços significativos na terapia oncológica personalizada [20-30].

Dong *et al.* (2021) [31] afirmaram que embora tenham existido avanços significativos na imunoterapia ao longo dos anos, há falta de evidências de exaustão de células T durante a carcinogênese oral e concluíram em seu estudo que a exaustão das células T desempenha um papel vital na carcinogênese oral, e o bloqueio de PD-1 pode prevenir a progressão da carcinogênese oral.

Bugshan; Farooq (2020) [32] destacaram que a expressão elevada de PD-L1 em CCEO está associada a um microambiente tumoral imunossupressor, ou seja facilita a evasão imunológica, permitindo que as células tumorais escapem da destruição pelo sistema imunológico.

Desta forma, o CCEAB e o CCEP são lesões agressivas que possuem um prognóstico ruim para os pacientes que se encontram em estágios avançados. Atualmente, o tratamento baseado em cirurgia como método principal não é eficaz para esses casos. A expressão de PD-1/PD-L1 no CCEAB e CCEP, a sua relação com parâmetros clínico-patológicos e o uso de inibidores de checkpoints imunológicos PD-1/PD-L1, faz parte de um conteúdo importante a ser explorado na pesquisa científica. Este artigo propõe uma análise da imunoexpressão dos marcadores PD-1 e PD-L1 em CCEAB e CCEP, visando elucidar o perfil imunoistoquímico dessas proteínas e analisar a relação entre a expressão de PD-1 e PD-L1 com os parâmetros clínico-patológicos, contribuindo para uma melhor compreensão da resposta imune e assim obtendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais direcionadas e eficazes.

## **Metodologia**

### **Tipo de Estudo**

Este estudo foi conduzido como uma análise retrospectiva e transversal. Os casos analisados foram obtidos através dos arquivos dos laboratórios de Patologia Oral localizados na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus Campina Grande e na Universidade de Pernambuco (UPE), Campus Recife. Os mesmos possuíam diagnóstico definitivo de CCEAB e CCEP, e através dos blocos de parafina utilizados na análise histopatológica realizou-se as análises histomorfológica e imunoistoquímica.

### **Variáveis do Estudo**

Foram definidas e analisadas as variáveis clínicas (sexo, idade e localização anatômica) e as variáveis histopatológicas (grau histopatológico, padrão de invasão, grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear e níveis de infiltrado inflamatório), sendo possível assim, uma investigação das relações entre a expressão dos marcadores e as características clínicas e histopatológicas dos tumores.

### **Obtenção das Amostras**

A amostra, por conveniência, foi composta por 20 casos de CCE em assoalho bucal e palato, selecionados de forma igualitária e arquivados nos Laboratórios da UEPB e UPE. Para a análise, foram escolhidos 10 casos de cada localização anatômica, nos quais se realizaram exames microscópicos em cinco campos de epitélio e cinco campos de estroma por caso, totalizando 100 campos de observação para cada região anatômica. O estudo focou em avaliar o comportamento das proteínas PD-1 e PD-L1 no microambiente tumoral, buscando identificar padrões de expressão e possíveis correlações com as características clínicas e histopatológicas. As análises imunoistoquímicas abrangeram a contagem de células tumorais e inflamatórias positivas e negativas, fornecendo dados sobre a imunoexpressão desses marcadores.

## **Estudo Clínico**

Informações relativas ao sexo, idade e localização anatômica das lesões foram coletadas a partir de informações contidas nos prontuários médicos e armazenados num banco de dados nos Laboratórios de Patologia da UEPB e UPE.

## **Estudo Morfológico**

As amostras foram fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina, sendo submetidas a cortes histológicos de 5µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e analisados sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE). A classificação histopatológica dos CCEs foi realizada no front de invasão tumoral, conforme o sistema proposto por Bryne *et al.* (1992) <sup>[33]</sup>. Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso. As lesões com escore final menor ou igual a 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade e os tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade.

## **Estudo Imunoistoquímico**

A amostra selecionada, previamente fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Envision™ Flex+, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, EUA), utilizando anticorpo policlonal anti-PD-1 e anticorpos monoclonais anti-PD-L1. (Quadro 1).

**Quadro 1.** Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Referência	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
PD-1	PAA751Hu01	Cloud-Clone Corp.	1:200	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight
PD-L1	MAA788Hu22	Cloud-Clone Corp.	1:3000	Tris-EDTA, pH 9,0 Steamer, 90°C, 60 min	Overnight

Fonte: Autoria própria (2024)

Como controle positivo, para todos os anticorpos, foram utilizados cortes histológicos de tonsila humana. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Odontologia da UEPB.

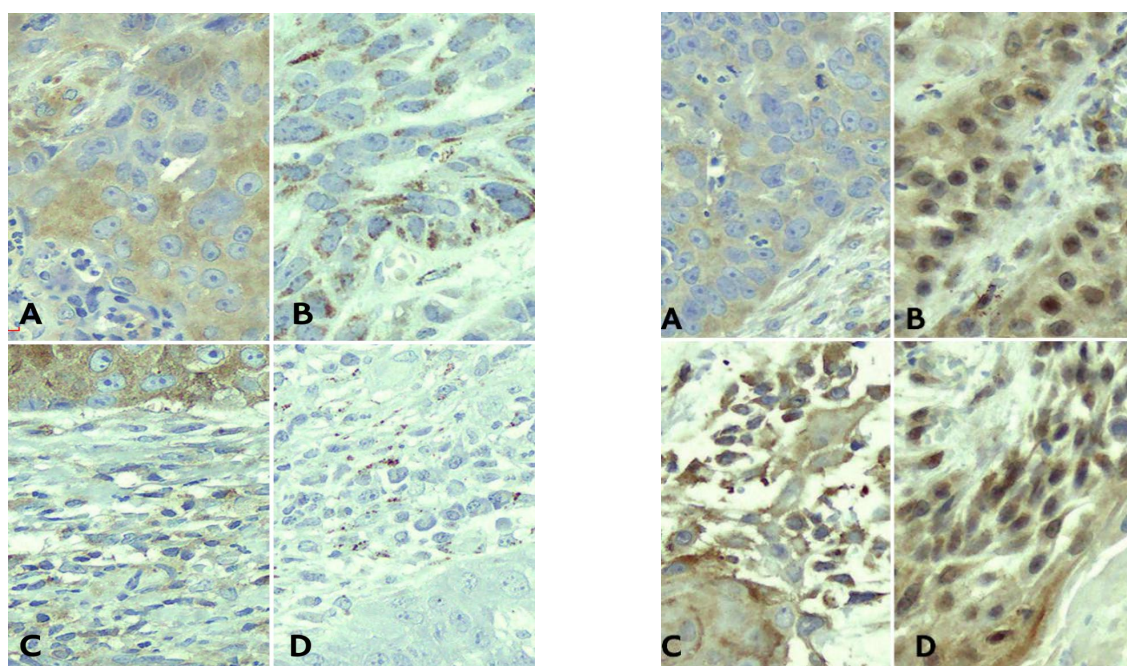
**Análise Imunoistoquímica**

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, as lâminas foram escaneadas em imagens digitais de alta resolução (MoticEasyScan Pro 6, Motic Inc., Richmond, BC, CAN) e, posteriormente, visualizadas no programa DSAssistant (Motic Inc., Richmond, BC, CAN). As imunoexpressões das proteínas PD-1 e PD-L1 foram avaliadas separadamente no parênquima e no estroma dos CCEAB e CCEP.

Com base em uma adaptação da metodologia utilizada no estudo de Lenouvel et al. (2021) <sup>[34]</sup>, foi realizada uma análise quantitativa da imunoexpressão de PD-1 e PD-L1. Sob aumento de 100x (DSAssistant, Motic Inc., Richmond, BC, CAN), foram identificadas as áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos. Posteriormente, sob aumento de 400x (DSAssistant, Motic Inc., Richmond, BC, CAN), para cada caso selecionado foram fotomicrografados cinco campos em parênquima e cinco campos em estroma. Em seguida, com o auxílio do programa ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), foram realizadas as contagens das células imunomarcadas e das células negativas em cada um dos campos microscópicos. Os valores obtidos em cada um desses campos foram

somados, estabelecendo-se o percentual de células neoplásicas e estromais positivas em relação ao total de células contadas (Fig 1).

**Fig 1** Imagens digitais de alta resolução das lâminas escaneadas de CCEAB (esquerda) e CCEP (direita) demonstrando células imunopositivas para PD-L1 (A e C) e PD-1 (B e D) no parênquima (A e B) e no estroma (C e D)



Fonte: Autoria própria (2024)

### Análise estatística

Os resultados obtidos com os estudos clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (Versão 20.0, IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a avaliação dos percentuais de imunopositividade para PD-1 e PD-L1 foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para essas proteínas, de acordo com os grupos de lesões. Possíveis correlações entre as imunoexpressões das proteínas foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

Ao analisar os dados clínicos referentes a idade e ao sexo entre as regiões anatômicas estudadas, foi possível verificar que nos casos de CCEAB a idade variou de 50 a 80 anos. Já nos casos de CCEP a idade variou entre 58 a 87 anos. Com relação ao sexo, houve predomínio de pacientes do sexo masculino nos CCEAB (n = 9; 90,0%) e do sexo feminino nos CCEP (n = 7; 70,0%) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Dados clínicos dos casos de CCEAB e CCEP.

Dados clínicos	CCEAB	CCEP
<i>Idade (em anos)*</i>		
Variação	50 – 80	58 – 87
Média $\pm$ desvio padrão	65,0 $\pm$ 11,1	73,1 $\pm$ 10,8
<i>Sexo</i>		
Feminino	1 (10,0%)	7 (70,0%)
Masculino	9 (90,0%)	3 (30,0%)

\* Informação indisponível em 02 casos de CCEP  
 Fonte: Autoria Própria (2024)

## Imunoexpressão de PD-1

No parênquima das lesões, foi observada imunoexpressão de PD-1 em todos os casos de CCEP e na maioria dos CCEAB (n = 9; 90,0%) (Fig 2). Constatou-se maior percentual mediano de imunopositividade para PD-1 nos CCEP (mediana: 37,0%; variação: 0,6% - 99,9%) em comparação aos CCEAB (mediana: 24,8%; variação: 0,0% - 85,0%), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p = 0,545$ ; Fig 2).

Em relação ao estroma, houve imunopositividade para PD-1 em todos os casos de CCEAB e CCEP (Fig 2). Foi identificado maior percentual mediano de positividade para PD-1 nos CCEP (mediana: 42,7%; variação: 1,3% - 87,8%) quando comparados

aos CCEAB ( mediana: 28,7%; variação: 10,7% - 41,0%), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p = 0,151$ ; Fig 2).

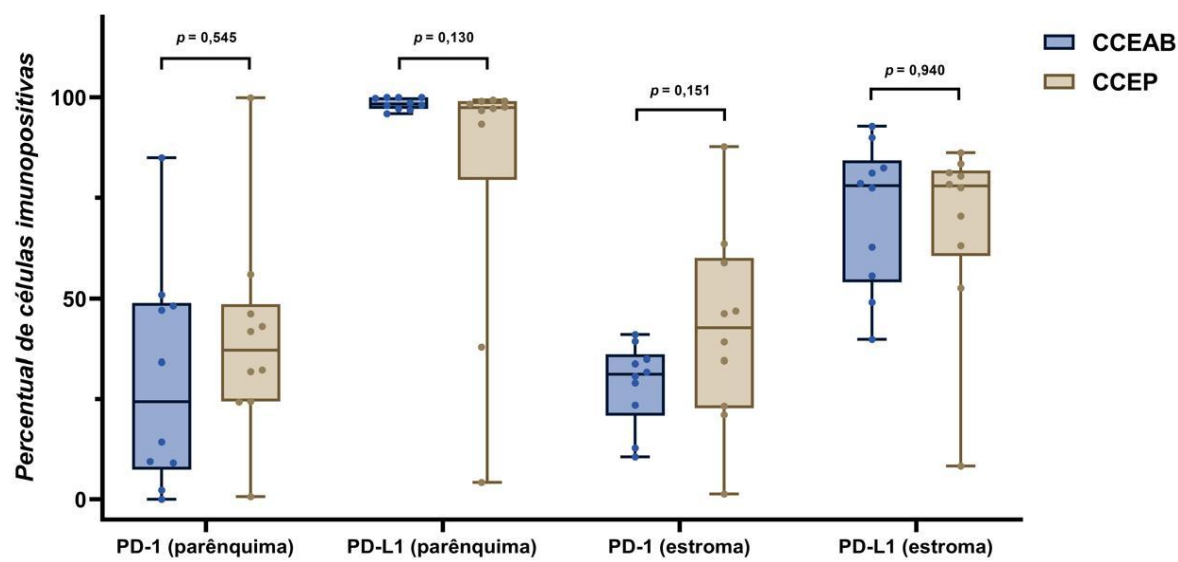
Os percentuais de imunopositividade para PD-1, em relação aos aspectos morfológicos dos CCEAB e CCEP, são apresentados nas Figs 3 e 4. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão de PD-1, tanto no parênquima quanto no estroma, em relação ao grau histopatológico de malignidade, ao grau de ceratinização, ao padrão de invasão, ao pleomorfismo nuclear e à intensidade do infiltrado inflamatório ( $p > 0,05$ ).

### **Imunoexpressão de PD-L1**

Todos os casos de CCEAB e CCEP demonstraram imunopositividade para PD-L1, tanto no parênquima quanto no estroma (Fig 2). No parênquima, foi constatado maior percentual mediano de imunopositividade para PD-L1 nos CCEAB (mediana: 98,4%; variação: 95,9% - 100,0%) em comparação aos CCEP (mediana: 82,3%; variação 4,2% - 99,4%), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p = 0,130$ ; Fig 2). No estroma, identificou-se maior percentual mediano de imunoexpressão para PD-L1 nos CCEAB (mediana: 71,0%; variação 39,8% - 92,8%) em relação aos CCEP (mediana: 68,2%; variação: 8,4% - 86,3%), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p = 0,940$ ; Fig 2).

Os percentuais de imunopositividade para PD-L1, em relação aos aspectos histopatológicos das lesões, são apresentados nas Figs 3 e 4. No estroma, carcinomas com infiltrado inflamatório escasso/ausente apresentaram maior percentual mediano de positividade para PD-L1 quando comparados a carcinomas com infiltrado inflamatório intenso/moderado ( $p = 0,017$ ). Quanto aos demais parâmetros, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão de PD-L1 ( $p > 0,05$ ).

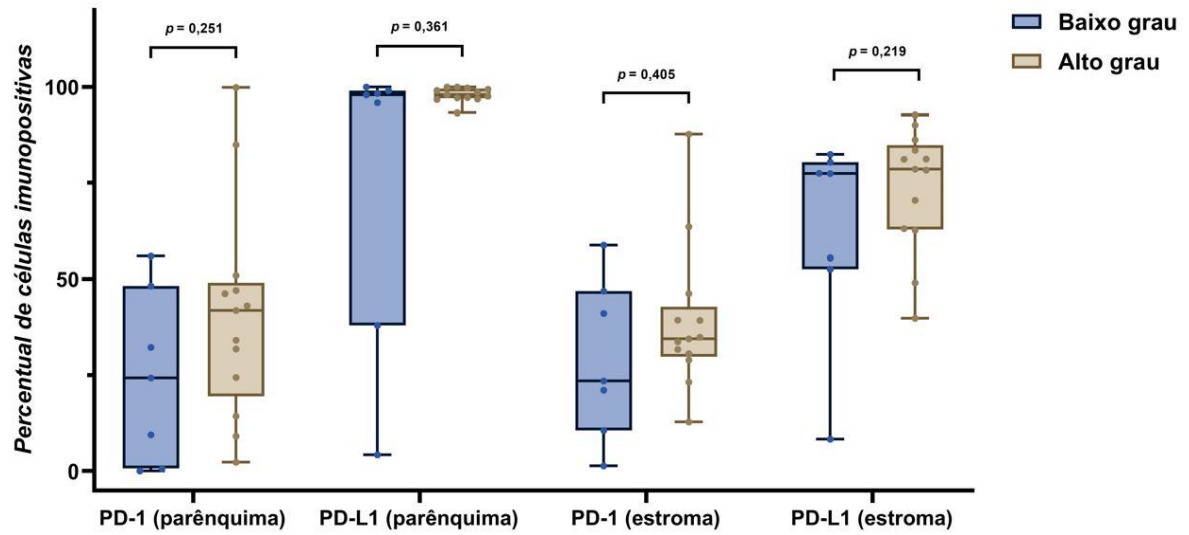
**Fig 2** Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma dos CCEAB e CCEP.



Fonte: Autoria própria (2024)

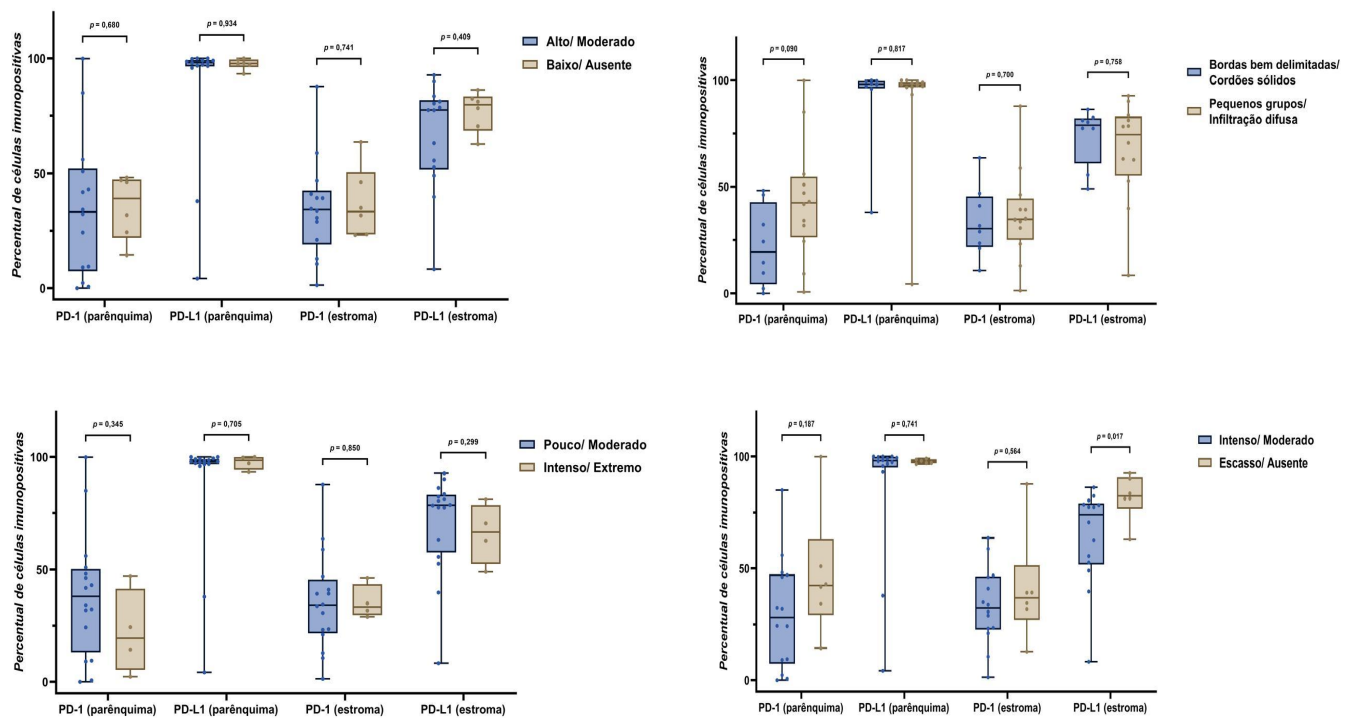


**Fig 3** Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células positivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em relação ao grau histopatológicos de malignidade das lesões.



Fonte: Autoria Própria (2024)

**Fig 4** Gráfico box-plot ilustrando os percentuais de células imunopositivas para PD-1 e PD-L1 no parênquima e no estroma em ao grau de ceratinização (A), ao padrão de invasão (B), ao pleomorfismo nuclear (C) e à intensidade do infiltrado inflamatório (D).



Fonte: Autoria Própria (2024)

A análise de correlação de Spearman em CCEP mostraram duas correlações estatisticamente significativas. A primeira foi PD-1 (parênquima) e PD-1 (estroma), esta correlação positiva apresenta  $r=0,842$  e  $p=0,002$ . Outra correlação forte encontrada foi entre PD-1 (parênquima) e PD-L1 (parênquima) onde observou-se os valores de  $r=0,685$  e  $p=0,029$ . Em CCEAB não houve nenhuma correlação estatisticamente significativa (Tabela 2).

**Tabela 2.** Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) e significância estatística ( $p$ ) para as imunexpressões de PD-1 e PD-L1 no parênquima e estroma dos CCEAB e CCEP.

Localização/ Correlações	CCEAB (n = 10)		CCEP (n = 10)	
	$r$	$P$	$r$	$p$
PD-1 (parênquima) x PD-L1 (parênquima)	0,436	0,208	<b>0,685</b>	<b>0,029</b>
PD-1 (parênquima) x PD-1 (estroma)	0,248	0,489	<b>0,842</b>	<b>0,002</b>
PD-L1 (parênquima) x PD-1 (estroma)	0,423	0,223	0,564	0,090
PD-L1 (parênquima) x PD-L1 (estroma)	-,0522	0,122	0,539	0,108

## Discussão

A localização anatômica é considerada um fator de influência no prognóstico, considerando-se que os tumores apresentam comportamento clínico diferente, conforme a sua localização. Dessa forma, se enfatiza a importância de estudar o perfil dessas lesões em diferentes localizações anatômicas da cavidade oral. Nessa pesquisa optou-se por estudar as lesões em assoalho bucal e palato, pois dentre os CCEO, os CCEAB apresentam incidência significativa e alta chance de fazer metástases linfonodais quando comparadas aos CCEP. Ao analisar o padrão de comportamento dessas lesões, o prognóstico se torna bastante duvidoso. Rodrigues *et al.* (2019) <sup>[35]</sup>, relataram que dentre os CCEO, o assoalho bucal é o segundo local mais comumente afetado, e afirmaram que a referida lesão nesta localização é uma das malignidades mais agressivas devido à sua alta tendência à invasão local e disseminação de linfonodos cervicais, o que a diferencia de outros locais na cavidade oral. O CCEP surge em uma área incomum para o aparecimento dessa lesão, sendo uma neoplasia rara, mas quando presente tem um potencial de agressividade por sua proximidade com estruturas anatômicas que facilitam a sua disseminação por infiltração dos tecidos circunjacentes.

No presente estudo, os casos de CCEAB e CCEP apresentaram idade mais avançada entre 50 a 87 anos, estando em consonância com o estudo de Amaral *et al.* (2022) <sup>[36]</sup> que afirmaram que CCEO afetam pacientes com mais idade, acima dos 40 anos. Chatzopoulos *et al.* (2021) <sup>[37]</sup> relataram que o MAT pode ser responsável por diferenças no comportamento clínico de CCEO, particularmente entre diferentes faixas etárias. Sundermann *et al.* (2018) <sup>[38]</sup> em seu estudo retrospectivo com 1501 casos de CCEO mostraram correlações positivas entre paciente com idade mais jovem, pacientes do sexo feminino e uma maior ocorrência de CCEP.

A análise estratificada por sexo revelou que nos CCEAB, os pacientes do sexo masculino apresentaram uma maior expressão de PD-L1, especificamente no estroma. Já nos CCEP, as pacientes do sexo feminino apresentaram maior expressão de PD-L1. Troiano *et al.* (2019) <sup>[39]</sup> e Lenouvel *et al.* (2020) <sup>[40]</sup> mostraram que a alta expressão de PD-L1 é mais frequente em pacientes do sexo feminino. A conclusão desses autores foi baseada na análise de dados que sugerem uma influência hormonal na regulação da expressão de PD-L1, o que pode explicar a maior incidência

desse marcador em mulheres, especialmente em tumores localizados na cavidade oral. Essa associação é mal compreendida, mas foi relatado que a expressão e a função de PD-L1 podem ser reguladas positivamente pelo estrogênio. Essa interpretação deve encorajar estudos futuros sobre o papel relacionado ao sexo neste biomarcador.

Cohen *et al.* (2019) <sup>[41]</sup> enfatizaram a alta expressão de PD-1 em CCEO, indicando que a presença desse marcador está associada à exaustão das células T e à evasão do sistema imunológico. A maior expressão de PD-1 no CCEP em comparação ao CCEAB observada nesta pesquisa pode refletir uma possível variabilidade biológica entre diferentes locais anatômicos, um fenômeno comum e relevante nos CCEO, pois isso pode acontecer devido a diferentes formas de exposição aos fatores de risco, assim como as diferenças quanto ao tipo de carcinogênese. Nessa pesquisa, embora não tenha apresentado relevância estatística, um achado importante encontrado foi uma menor expressão de PD-1 no CCEAB corroborando com um cenário de pior prognóstico através da presença de tumores mais agressivos que apresentaram alto grau histopatológico de malignidade, quando comparado ao CCEP.

Lenouvel *et al.* (2020) <sup>[40]</sup> analisaram a expressão de PD-L1 em CCEO e relataram ter sido maior em tumores avançados e associados a um pior prognóstico. Este achado é consistente com nossos resultados, que revelaram uma correlação entre a alta expressão de PD-L1 em tumores que histopatologicamente foram considerados de alto grau.

De acordo com Ratnakar *et al.* (2023) <sup>[42]</sup>, o exame histopatológico dos casos de CCEO revela a presença de atipias celulares, cuja predominância de algumas delas são características de tumores mais agressivos. Com relação ao grau de ceratinização, apenas 6 lesões foram consideradas com o grau de ceratinização baixo/ausente, e estas apresentaram uma maior expressão de PD-1 e PD-L1, quando comparado grupo alto/moderado. Com relação ao pleomorfismo nuclear, apenas 4 lesões apresentaram pleomorfismo nuclear intenso/extremo, mas nesses casos teve maior expressão de PD-1 no estroma e PD-L1 no parênquima. Essas informações podem sugerir que a interação PD-1/PD-L1 contribuiu para a obtenção dessas características de malignidade nesses casos.

Os resultados sobre a imunoexpressão de PD-1 e PD-L1 em CCEAB e CCEP contribui para um entendimento mais abrangente do papel desses marcadores na patogênese e na resposta imune tumoral. Segundo Chatzopoulos *et al.* (2021) <sup>[37]</sup>, a maioria dos pacientes avaliados por IHC, tiveram tumores positivos para PD-L1 e eles concordaram que o controle da interação PD-1/PD-L1 aumenta a eficácia da resposta imune antitumoral. Nosso trabalho revelou que tanto o CCEAB quanto o CCEP apresentaram elevada imunoexpressão de PD-1 e PD-L1, tanto no parênquima quanto no estroma. No entanto, a expressão de PD-1 é relativamente mais alta no CCEP em comparação com o CCEAB, já a expressão de PD-L1 é extremamente alta em ambos os tipos de carcinoma. Os resultados apontam que a expressão dos marcadores PD-1 e PD-L1 apresentam variações de acordo com as características histopatológicas (grau histopatológico, padrões de invasão, grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear e níveis de infiltrado inflamatório) e clínicas (sexo, idade, localização anatômica) dos tumores, embora muitas dessas variações não tenham alcançado significância estatística.

É possível perceber na presente pesquisa que a expressão elevada de PD-L1 no estroma foi correlacionada com uma menor intensidade da resposta inflamatória, corroborando com o estudo de Lenouvel *et al.* (2020) <sup>[40]</sup> que descreveram a superexpressão de PD-L1 em células cancerígenas, relatando que a mesma induziu a apoptose de células T e forneceu resistência à destruição tumoral. Os referidos autores afirmaram ainda que a terapia direcionada a PD-1 para CCECP metástáticos ou recorrentes melhorou a sobrevida geral, e em tumores que expressaram altos níveis de PD-L1, uma melhor taxa de resposta geral foi alcançada. Então, a base biológica para a evasão imune de PD-L1 está ligada à presença dessa proteína na membrana celular, destacando-se que um prognóstico negativo seria esperado em CCEO com superexpressão de PD-L1. Essa correlação, que foi estatisticamente significativa, sugere que a expressão de PD-L1 pode ter implicações consideráveis para o entendimento da resposta imunológica e do comportamento dessas proteínas no MAT, que direciona para o potencial uso desses marcadores como alvos em futuras estratégias terapêuticas.

Este estudo revelou que tumores com infiltração inflamatória intensa ou moderada apresentaram uma menor expressão de PD-L1 no estroma. Esse resultado corrobora o estudo de Ortega *et al.* (2024) <sup>[43]</sup>, que destacaram o papel do eixo PD-

1/PD-L1 como um mecanismo de evasão imunológica mediada por células T. Esse resultado sugere que a intensidade da infiltração inflamatória pode estar diretamente relacionada à modulação da expressão de PD-L1 no MAT, revelando importantes implicações para a compreensão da resposta imunológica e para o desenvolvimento de terapias imunomoduladoras.

No entanto, a alta expressão de PD-1 no CCEAB e CCEP permite afirmar que o fenótipo das lesões poderia ser classificado como um fenótipo inflamado, pois a maioria das lesões apresentaram um infiltrado inflamatório intenso/moderado, e considerando o estudo de Gao *et al.* (2021) <sup>[25]</sup> que classificaram as lesões de câncer em humanos em fenótipos: imune-deserto, imune-excluído ou inflamado. O fenótipo inflamado tem um alto recrutamento de células T, consequentemente esse resultado é justificado pela elevada imunopositividade desse marcador.

Na análise de Spearman em CCEP observou-se duas correlações fortes e positivas relacionadas a imunoexpressão de PD-1 e PD-L1, na primeira correlação encontrada: PD-1 (parênquima) e PD-1 (estroma), interpreta-se que quando aumenta a expressão de PD-1 nas células tumorais vai existir um aumento também nas células estromais. Isso leva a imaginar um cenário em que o MAT, possivelmente através de mediadores químicos liberados, estimula os dois componentes celulares (parênquima e estroma) a ter uma maior expressividade de PD-1. Já na segunda correlação encontrada: PD-1 (parênquima) e PD-L1 (parênquima), verifica-se que a própria célula neoplásica quando aumenta a expressão de PD-1, aumenta também a expressão de PD-L1 como forma de provocar a evasão imunológica.

A alta expressão de PD-L1 particularmente sugere que os pacientes com esses tipos de carcinoma podem ser bons candidatos para terapias baseadas em ICI. Boschert *et al.* (2020) <sup>[44]</sup> em suas descobertas indicaram um papel potencial para PD-L1 como um marcador prognóstico para o tratamento de ICI em CCECP. Esse achado é consistente com os estudos de Suzuki *et al.* (2020) <sup>[20]</sup> e Ghosh, Long e Sun (2021) <sup>[17]</sup> que afirmaram que os tumores que expressam altos níveis de PD-L1 são mais propensos a responder positivamente aos ICI.

Payne *et al.* (2020) <sup>[13]</sup>; Liu *et al.* (2021) <sup>[26]</sup> e Xu *et al.* (2021) <sup>[16]</sup> investigaram a eficácia das terapias baseadas no bloqueio do eixo PD-1/PD-L1 em CCECP e CCEO e observaram que pacientes com alta expressão de PD-L1 respondem melhor a

terapias com ICI, ou seja a expressão de PD-L1 pode ser um biomarcador preditivo para a resposta à imunoterapia. Apesar desse estudo não ter avaliado diretamente a resposta terapêutica, os resultados sugerem que a alta expressão de PD-L1 pode ajudar a compreender melhor a patogênese do CCEAB e CCEP. A alta expressão desses marcadores fornece subsídios para a realização de estudos que visam a sua utilização como biomarcadores de prognóstico e preditivos à imunoterapia.

Cohen *et al.* (2019) <sup>[41]</sup> realizaram o estudo em CCECP e verificaram que 85% das células tumorais e as células imunes circundantes expressaram PD-L1, o que determinou a relevância preditiva da expressão de PD-L1, ou seja esse marcador foi determinante na escolha da terapia anti-PD-1. Se levar em consideração o presente estudo, a alta expressão de PD-L1 (100% em CCEAB e em CCEP) seria um fator a ser considerado na escolha da imunoterapia nesses casos. Esses achados também estão de acordo com os estudos de Suzuki *et al.* (2020) <sup>[20]</sup> e Lenouvel *et al.* (2021) <sup>[34]</sup> que afirmaram que a expressão de PD-L1 pode ser utilizada para selecionar pacientes que são mais propensos a responder a essas terapias, permitindo uma abordagem mais personalizada e eficaz.

Knochermann *et al.* (2021) <sup>[18]</sup> e Noccini *et al.* (2022) <sup>[45]</sup> explicaram que PD-L1 é uma proteína de membrana que pode ser expressa em células tumorais e inflamatórias, é um biomarcador essencial cuja expressão é determinada por meio de imunoistoquímica e é necessária para selecionar pacientes para imunoterapia. Então, a relevância clínica dos resultados apresentados nessa pesquisa é destacada pela potencial utilização de PD-1 e PD-L1 como alvos terapêuticos, considerando que a terapia com ICI, como anti-PD-1 e anti-PD-L1, tem demonstrado benefícios significativos em vários tipos de câncer, incluindo CCEO. De acordo com Chatzopoulos *et al.* (2021) <sup>[37]</sup>, o PD-L1 foi relatado como um biomarcador potencialmente útil de prognóstico favorável no carcinoma de CCE em língua, porém esta descoberta não foi validada em uma série de estudos subsequentes e até mesmo resultados conflitantes mostram a associação de alta expressão de PD-L1 com piores resultados, como os estudos de Zhong *et al.* (2020) <sup>[21]</sup> e Dong *et al.* (2021) <sup>[31]</sup>, que descreveram que a expressão de PD-L1 no MAT está associada a um pior prognóstico em CCEO. Portanto, evidências conclusivas sobre o papel prognóstico da expressão de PD-L1 no CCEO, e principalmente de forma isolada como em CCEAB e CCEP, precisam ser mais exploradas em pesquisas futuras.



## **Conclusão**

Através da metodologia empregada, a análise da imunoexpressão de PD-1 e PD-L1 relativa às características histopatológicas mostrou que as lesões com infiltrado inflamatório escasso/ausente foram associadas a uma alta expressão de PD-L1 no estroma, ou seja o microambiente tumoral sofreu alterações relacionadas a resposta imune. Isso sugere que a via PD-1 ou PD-L1 desempenha um papel significativo na evasão imune tumoral. Esses achados são relevantes, pois contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no CCEAB e CCEP. A expressão IHC positiva de PD-1 e PD-L1 em células tumorais e estromais foi confirmada em quase todos os casos. Esses dados são importantes, pois com a identificação de um padrão de expressão dessas proteínas em CCEAB e CCEP é possível fornecer subsídios para a elaboração de estratégias terapêuticas, como imunoterapias que visem esses marcadores. Então, nesse estudo PD-1 e PD-L1 tiveram alta imunoexpressão, portanto há possibilidade de utilizar os ICI. Estudos futuros com base nesta temática são necessários para auxiliar nas terapias baseadas em anticorpos monoclonais direcionados aos genes alvo relacionados com a carcinogênese oral.

## **Agradecimentos**

Ao Centro Integrado de Diagnóstico e Tratamento das Lesões da Região Craniofacial, unidade I do Centro Integrado Multiusuário de Referência em Saúde da Paraíba, por disponibilizar a infraestrutura e equipamentos necessários ao escaneamento das lâminas histológicas em alta resolução.

## **Referências**

1. Georgaki M, Theofilou VI, Pettas E, et al (2021) Understanding the complex pathogenesis of oral cancer: A comprehensive review. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology* 132(5):566-579. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2021.04.004>

2. Chang SR, Chou CH, Liu CJ, et al (2023) The concordant disruption of B7/CD28 immune regulators predicts the prognosis of oral carcinomas. *Int J Mol Sci* 24: 5931. <https://doi.org/10.3390/ijms24065931>
3. Jin Y, Wang Z, Huang S, et al (2023). Identify and validate circadian regulators as potential prognostic markers and immune infiltrates in head and neck squamous cell carcinoma. *Nature* 13:19939. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46560-8>.
4. Greeshma LR, Joseph AP, Sivakumar TT, et al (2023) Correlation of PD-1 and PD-L1 expression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Scientific Reports* 13: 21698. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48572-w>
5. Tarle M, Luksic I (2024) Pathogenesis and Therapy of Oral Carcinogenesis. *Int. J Mol Sci* 25:6343. <https://doi.org/10.3390/ijms25126343>
6. Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, et al (2018) Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomized, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. [https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31999-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31999-8)
7. Sekido K, Tomihara K, Tachinami H, et al (2019) Alterations in composition of immune cells and impairment of anti-tumor immune response in aged oral cancer-bearing mice. *Oral Oncol* 99:104462. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104462>
8. Kujan O, Schaijik BV, Farah CS. (2020) Immune checkpoint inhibition in oral cavity squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Cancers* 12:1937. <https://doi.org/10.3390/cancers1207193>
9. Olmos M, Glajzer J, Büntemeyer TO, et al (2021) Neoadjuvant immunotherapy of oral squamous cell carcinoma: Case report and assessment of histological response. *Frontiers Oncology* 11:720951. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.720951>
10. Poulouse JV, Kainickal CT (2022) Immune checkpoint inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review of phase-3 clinical trials. *World Journal of Clinical Oncology* 13(5):388-411. <https://doi.org/10.5306/wjco.v13.i5.388>
11. Dang S, Zhang S, Zhao J, et al (2023) Efficacy and safety of immune checkpoint inhibitors in recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Cancer Medicine* 12: 20277-20286. <https://doi.org/10.1002/cam4.6564>
12. Su J, Zhao M, Liu J, et al (2020) PD-L1 expression correlates with immune escape in oral squamous cell carcinoma. *Medical Oncology* 37(8):72. <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01393-8>
13. Payne K, Pugh M, Brooks J, et al (2020) Circulating tumour cell expression of immune markers as prognostic and therapeutic biomarkers in head and neck

squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci*,21:8229. <https://doi.org/10.3390/ijms21218229>

14. Hu C, Tian S, Lin L, et al (2020) Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 102:104560. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104560>
15. Rotman J, Otter LAS, Bleeker MCG, et al. (2020) PD-L1 expression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology* 102:104548. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104548>
16. Xu Y, Wen N, Sonis ST, Villa A (2021) Oral side effects of immune checkpoint inhibitor therapy (ICIT): An analysis of 4683 patients receiving ICIT for malignancies at Massachusetts General Hospital, Brigham & Womens's Hospital, and the Dana- Farber Cancer Institute, 2011 to 2019. *Cancer* 127:1796-1804. <https://doi.org/10.1002/cncr.33436>
17. Ghosh C, Luong G, Sun Y (2021) A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *Journal of Cancer* 12(9):2735-2746. <https://doi.org/10.7150/jca.57334>
18. Knochelmann HM, Horton JD, Liu S, et al (2021) Neoadjuvant preurgical Pd-1 inhibition in oral cavity squamous cell carcinoma. *Cell Reports Medicine* 2:100426. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100426>
19. Starzynska A, Sejda A, Adamski T, et al (2022) The B7 family molecules in oral squamous cell carcinoma: a systematic review. Part I: B7-H1 (PD-L1) and B7-DC (PD-L2). *Adv Dermatol Allergol* 39(2):265-274. <https://doi.org/10.5114/ada.2020.98522>
20. Suzuki S, Ogawa T, Sano R, et al (2020) Immune-checkpoint molecules on regulatory T-cells as a potential therapeutic target in head and neck squamous cell cancers. *Cancer Science* 111:1943-1957. <https://doi.org/10.1111/cas.14422>
21. Zhong C, Lang Q, Yu J, et al (2020) Phenotypical and potential functional characteristics of different immune cells expressing CD28H/B7-H5 and their relationship with cancer prognosis. *The Journal of Translational Immunology* 200:12-21. <https://doi.org/10.1111/cei.13413>
22. He J, Chen XF, Xu MG, et al (2020) Relationship of programmed death ligand-1 expression with clinicopathological features and prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *Archives of Oral Biology* 114:104717. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104717>
23. Huang W, Zhou X, Liao Q, et al (2020) Clinicopathological and prognostic significance of PD-1/PD-L1 axis expression in patients with tongue squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol* 1(12). <https://doi.org/10.1002/jcp.29590>
24. Akisada N, Nishimoto K, Takao S, et al (2021) PD-L1 expression in tongue squamous cell carcinoma. *Medical Molecular Morphology* 54:52-59. <https://doi.org/10.1007/s00795-020-00261-7>

25. Gao A, Pan X, Yang X, Lin Z (2021) Predictive factors in the treatment of oral squamous cell carcinoma using PD-1/PD-L1 inhibitors. *Investigational New Drugs*,39(4):1132-1138. <https://doi.org/10.1007/s10637-021-01082>
26. Liu S, Knochelmann HM, Lomeli SH, et al (2021) Response and recurrence correlates in individuals treated with neoadjuvant anti-PD-1 therapy for resectable oral cavity squamous cell carcinoma. *Cell Reports Medicine* 2:100411. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100411>
27. Harrington KJ, Burtress B, Greil R, et al (2022) Pembrolizumab with or without chemotherapy in recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Updated results of the phase III KEYNOTE-48 study. *J Clin Oncol* 41(4):790-802. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02508>
28. Parvez A, Choudhary F, Mudgal P, et al. (2023) PD-1 and PD-L1: architects of immune symphony and immunotherapy breakthroughs in cancer treatment. *Front Immunol* 1:1296341. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1296341>
29. Liu D, Wen C, Chen L, et al (2024) The emerging roles of PD-L1 subcellular localization in tumor immune evasion. *Biochemical Pharmacology* 220:115984. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115984>
30. Gao M, Shi J, Xiao X, et al (2024) PD-1 regulation in immune homeostasis and immunotherapy. *Cancer Letters* 588: 216726. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216726>
31. Dong Y, Wang Z, Mao F, et al (2021) PD-1 blockade prevents the progression of oral carcinogenesis. *IOP Publishing Physics Web*. <https://academic.oup.com/carcin/advance-article/doi/10.1093/carcin/bgab035/6276535>. Accessed 30 May 2024.
32. Bugshan A, Farooq I (2020) The role of PD-L1 expression in oral cancer: A systematic review. *Oral Diseases* 24(3):321-329. <http://doi.org/10.12688/f1000research.22941.1>
33. Bryne M, Koppang HS, Lilleng, R., Kjaerheim A (1992) Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 166 (4):375-81.
34. Lenouvel D, González-Moles MA, Ruiz-Ávila I, et al (2021) Clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 in oral cancer: A preliminary retrospective immunohistochemistry study. *Oral Diseases* 27 (2):173-182. <https://doi.org/10.1111/odi.13509>
35. Rodrigues RM, Bernardo VG, Silva SD, et al (2019). How pathological criteria can impact prognosis of tongue and floor of the mouth squamous cell carcinoma. *Journal of Applied Oral Science* 28:e20190198. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0198>
36. Amaral RC, Andrade RAR, Couto GR, et al (2022) Tendências de mortalidade por câncer bucal no Brasil por regiões e principais fatores de risco. *Revista*

Brasileira de Cancerologia 68 (2). <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2022v68n2.1877>

37. Chatzopoulos GS, Sotiriou S, Collins AR, et al (2021) Transcriptomic and immunophenotypic characterization of tumor immune microenvironment in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Head and Neck Pathology* 15:509-522. <https://doi.org/10.1007/s12105-020-01229-w>
38. Sundermann BV, Uhlmann L, Hoffmann J, et al (2018) The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 46:177-182. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.10.019>
39. Troiano G, Caponio VCA, Zhurakivska K, et al (2019) High PD-L1 expression in the tumor cells did not correlate with poor prognosis of patients suffering for oral squamous cells carcinoma: A meta-analysis of the literature. *Cell Proliferation* 52:e12537. <https://doi.org/10.1111/cpr.12537>
40. Lenouvel D, González-Moles MA, Ruiz-Ávila I, et al (2020) Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 overexpression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncology* 106:104722. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104722>
41. Cohen EE, Bell RB, Bifulco CB, et al (2019) The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7(1):184. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0662-5>
42. Ratnakar S, Kumar M, Maurya MK, et al (2023) Expression of immune checkpoint protein in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological correlation: A tertiary care center cross-sectional study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 27:3. [https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp\\_169\\_22](https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_169_22)
43. Ortega MA, Boaru DL, Leon-Oliva DL, et al (2024) PD-1/ PD-L1 axis: implications in immune regulation, cancer progression, and translational applications. *Journal of Molecular Medicine* 102: 987-1000. <https://doi.org/10.1007/s00109-024-02463-3>
44. Boschert S, Teusch J, Aljasem A, et al (2020) HGF-Induced PD-L1 expression in head and neck cancer: Preclinical and clinical findings. *Int J Mol Sci* 21:8770. <http://doi.org/10.3390/ijms21228770>
45. Nocini R, Vianini M, Girolami I, et al (2022) PD-L1 in oral squamous cell carcinoma: A key biomarker from the laboratory to the bedside. *Clin Exp Dent Res* 8:690-698. <https://doi.org/10.1002/cre2.590>

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da metodologia empregada, a análise da imunoexpressão de PD-1 e PD-L1 relativa às características histopatológicas mostrou que as lesões com infiltrado inflamatório escasso/ausente foram associadas a uma alta expressão de PD-L1 no estroma, ou seja o microambiente tumoral sofreu alterações relacionadas a resposta imune. Isso sugere que a via PD-1 ou PD-L1 desempenha um papel significativo na evasão imune tumoral. Esses achados são relevantes, pois contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no CCEAB e CCEP.

A expressão IHC positiva de PD-1 e PD-L1 em células tumorais e estromais foi confirmada em quase todos os casos. Esses dados são importantes, pois com a identificação de um padrão de expressão dessas proteínas em CCEAB e CCEP é possível fornecer subsídios para a elaboração de estratégias terapêuticas, como imunoterapias que visem esses marcadores. Então, nesse estudo PD-1 e PD-L1 tiveram alta imunoexpressão, portanto há possibilidade de utilizar os ICI. Estudos futuros com base nesta temática são necessários para auxiliar nas terapias baseadas em anticorpos monoclonais direcionados aos genes alvo relacionados com a carcinogênese oral.

## REFERÊNCIAS

AKISADA, N. *et al.* PD-L1 expression in tongue squamous cell carcinoma. **Medical Molecular Morphology**, v.54, n.52-59, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00795-020-00261-7>

AMARAL, R.C. *et al.* **Tendências de mortalidade por câncer bucal no Brasil por regiões e principais fatores de risco.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.68, n.2, 2022. DOI: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2022v68n2.1877>

BOSCHERT, S. *et al.* HGF-Induced PD-L1 expression in head and neck cancer: Preclinical and clinical findings. **Int J Mol Sci**, v.21, p.8770, 2020. DOI: <http://doi.org/10.3390/ijms21228770>

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Inca estima 704 mil novos casos de câncer por ano até 2025.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 24 nov. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em: 30 maio 2024.

BUGSHAN, A., FAROOQ, I. The role of PD-L1 expression in oral cancer: A systematic review. **Oral Diseases**, v.24, n.3, p.321-329, 2020. DOI: <http://doi.org/10.12688/f1000research.22941.1>

CABRERA, M.B., VILLAR, N.M., RIVERA, C.B.R. Perspectiva social del autocuidado en los pacientes con cáncer bucal. **Humanidades Médicas**, v.20, n.1, p.167-188, 2020.

CHANG, S.R. *et al.* The concordant disruption of B7/CD28 immune regulators predicts the prognosis of oral carcinomas. **Int J Mol Sci**, v.24, p.5931, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24065931>

CHATZOPOULOS, G. S. *et al.* Transcriptomic and immunophenotypic characterization of tumor immune microenvironment in squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Head and Neck Pathology**, v.15, p.509-522, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12105-020-01229-w>

COHEN, E. E. *et al.* The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and

neck (HNSCC). **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v.7, n1, p.184, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0662-5>

CRAMER, J. D., BURTNESSE, B., FERRIS, R. L. Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions. **Oral Oncology**, v.99, p.104460, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104460>

CUNHA, A.R., PRASS, T. S., HUGO, F.N. Mortalidade por câncer bucal e de orofaringe no Brasil, de 2000 a 2013: Tendências por estratos sociodemográficos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.25, n.8, p.3075-3086, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232020258.31282018>

DANG, S. *et al.* Efficacy and safety of immune checkpoint inhibitors in recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Cancer Medicine**, v.12, p.20277-20286, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.6564>

DERMANI, F.K. *et al.* PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. **J Cell Physiol**, v.234, p.1313-1325, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.27172>

DONG, Y. *et al.* PD-1 blockade prevents the progression of oral carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.42, n.6, p.891-902, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgab035>

EVRARD, D. *et al.* PD-L1 expression in the microenvironment and the response to checkpoint inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncoimmunology**, v.9, n.1, p.1844403, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1844403>

FREIRE, A.R. *et al.* Influence of Public Oral Health Services and Socioeconomic Indicators on the Frequency of Hospitalization and Deaths due to Oral Cancer in Brazil, between 2002-2017. **Int J Environ Res Public Health**, v.18, n.1, p.238, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18010238>

GAO, A. *et al.* Predictive factors in the treatment of oral squamous cell carcinoma using PD-1/PD-L1 inhibitors. **Investigational New Drugs**, v.39, n.4, p.1132-1138, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10637-021-01082>



GAO, M. *et al.* PD-1 regulation in immune homeostasis and immunotherapy. **Cancer Letters**, v.588, p.216726, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216726>

GAO, Y. *et al.* Acetylation-dependent regulation of PD-L1 nuclear translocation dictates the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy. **Nature Cell Biology**, v.22, n.9, p.1064-1075, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0562-4>

GEORGAKI, M. *et al.* Understanding the complex pathogenesis of oral cancer: A comprehensive review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v.132, n.5, p.566-579, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2021.04.004>

GHOSH, C., LUONG, G., SUN, Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. **Journal of Cancer**, v.12, n.9, p.2735-2746, 2021. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.57334>

GREESHMA, L.R. *et al.* Correlation of PD-1 and PD-L1 expression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **Scientific Reports**, v.13, p.21698, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48572-w>

GROCHOT, R. M. *et al.* Expression of PD-L1 in cervical carcinoma and its impact on survival associated with T-cell infiltration and FoxP3 expression. **Cancer Management and Research**, v.11, p.4597-4605, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2147CMAR.S194597>

HARRINGTON, K.J. *et al.* Pembrolizumab with or without chemotherapy in recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Updated results of the phase III KEYNOTE-48 study. **J Clin Oncol**, v.41, n.4, p.790-802, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02508>

HE, J. *et al.* Relationship of programmed death ligand-1 expression with clinicopathological features and prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma : A meta-analysis. **Archives of Oral Biology**, v.114, p.104717, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104717>

HEATH, B. R. *et al.* Head and neck cancer immunotherapy beyond the checkpoint blockade. **Journal of Dental Research**, v.98, n.10, p.1073-1080, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034519864112>

HU, C. *et al.* Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.102, p.104560, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104560>

HUANG, W. *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of PD-1/PD-L1 axis expression in patients with tongue squamous cell carcinoma. **J Cell Physiol**, v.1, n.12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.29590>

JIANG, S. *et al.* Prognostic value of PD-1, PD-L1 and PD-L2 deserves attention in head and neck cancer. **Frontiers in Immunology**, v.13, p.988416, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.988416>

JIN, Y. *et al.* Identify and validate circadian regulators as potential prognostic markers and immune infiltrates in head and neck squamous cell carcinoma. **Nature**, v.13, p.19939, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46560-8>.

JOHNSON, N.W. *et al.* **Editorial 25th anniversary of oral diseases.** *Oral Diseases*, v.27, p.1339-1342, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.13709>

KNOCHELMANN, H.M. *et al.* Neoadjuvant presurgical PD-1 inhibition in oral cavity squamous cell carcinoma. **Cell Reports Medicine**, v.2, p.100426, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100426>

KUJAN, O., SCHAIJIK, B.V., FARAH, C.S. Immune checkpoint inhibition in oral cavity squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders: A systematic review. **Cancers**, v.12, p.1937, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12071937>

LENOUVEL, D. *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 in oral cancer: A preliminary retrospective immunohistochemistry study. **Oral Diseases**, v.27, n.2, p.173-182, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.13509>

LENOUVEL, D. *et al.* Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 overexpression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and comprehensive meta-analysis. **Oral Oncology**, v.106, p.104722, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104722>

LIU, C. *et al.* PD-1/PD-L1 inhibitors in the treatment of head and neck cancer: A meta-analysis of efficacy and safety. **Clinical Otolaryngology**, v.47, n.1, p.79-87, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/coa.13860>

LIU, D. *et al.* The emerging roles of PD-L1 subcellular localization in tumor immune evasion. **Biochemical Pharmacology**, v.220, p.115984, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115984>

LIU, S. *et al.* Response and recurrence correlates in individuals treated with neoadjuvant anti-PD-1 therapy for resectable oral cavity squamous cell carcinoma. **Cell Reports Medicine**, v.2, p.100411, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100411>

LOPES, V. A., LIMA, R. A., GOMES, M. A. PD-1/PD-L1 pathway and oral cancer: A review. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.85, n.5, p.617-624, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2018.06.005>

MACHIELS, J.P. *et al.* Pembrolizumab given concomitantly with chemoradiation and as maintenance therapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: Keynote-412. **Future Oncology**, jun, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0184>

MIRANDA-FILHO, A.; BRAY, F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. **Oral Oncology**, v.102, p.104551, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104551>

MIRANDA-GALVIS, M.M. *et al.* PD-L1 expression patterns in oral cancer as an integrated approach for further prognostic classification. **Oral Diseases**, v.27, p.1699-1710, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.13714>

NOCINI, R. *et al.* PD-L1 in oral squamous cell carcinoma: A key biomarker from the laboratory to the bedside. **Clin Exp Dent Res**, v.8, p.690-698, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cre2.590>

ORTEGA, M.A. *et al.* PD-1/PD-L1 axis: implications in immune regulation, cancer progression, and translational applications. **Journal of Molecular Medicine**, v. 102, p.987-1000, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00109-024-02463-3>

PARVEZ, A. *et al.* PD-1 and PD-L1: architects of immune symphony and immunotherapy breakthroughs in cancer treatment. **Front Immunol**, v.1, p.1296341, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1296341>

PAYNE, K. *et al.* Circulating tumour cell expression of immune markers as prognostic and therapeutic biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **Int J Mol Sci**, v.21, p.8229, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21218229>

PERUMAL, E. *et al.* Exosomal immune checkpoint protein (PD-L1): Hidden player in PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy resistance in oral cancer. **Oral Oncology**, v.151, p.106748, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2024.106748>

Polesel, J. *et al.* Prognostic significance of PD-L1 expression in patients with primary oropharyngeal squamous cell carcinoma: A meta-analysis. **Frontiers in Oncology**, v.11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.339/fonc.2021.787864>

POULOSE, J.V., KAINICKAL, C.T. Immune checkpoint inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review of phase-3 clinical trials. **World Journal of Clinical Oncology**, v.13, n.5, p.388-411, 2022. DOI: <https://doi.org/10.5306/wjco.v13.i5.388>

PUNTIGAM, L.K. *et al.* Immune checkpoint expression on immune cells of HNSCC patients and modulation by chemo- and immunotherapy. **Int J Mol Sci**, v.21, p.5181, 2020. DOI: <https://doi.org/doi:10.3390/ijms21155181>

RATNAKAR, S. *et al.* Expression of immune checkpoint protein in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological correlation: A tertiary care center cross-sectional study. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v.27, n.3, 2023. DOI: [https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp\\_169\\_22](https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_169_22)

RODRIGUES, R.M. *et al.* How pathological criteria can impact prognosis of tongue and floor of the mouth squamous cell carcinoma. **J App Oral Sci**, v.28, p. e20190198, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0198>

ROHL, L. *et al.* Immune checkpoint blockade induced shifts in cytokine expression patterns in peripheral blood of head and neck cancer patients are linked to outcome. **Frontiers in Immunology**, v.14, p.1237623, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1237623>

ROTMAN, J. *et al.* PD-L1 expression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **Oral Oncology**, v.102, p.104548, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104548>

ROTTE, A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.38, n.1, p.255, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1252-8>

Ruiter, E. J. *et al.* PD-L1 expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma is associated with HPV status and patient prognosis. **Journal of Surgical Oncology**, v.121, n.2, p.117-126, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jso.25702>

SEKIDO, K. *et al.* Alterations in composition of immune cells and impairment of anti-tumor immune response in aged oral cancer-bearing mice. **Oral Oncol**, v.99, p.104462, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104462>

SEKIDO, K. *et al.* Successful treatment with nivolumab in a patient with unresectable oral squamous cell carcinoma following ineffective chemoradiotherapy. **Clin Case Rep**, v.11, p.8219, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/ccr3.8219>

SIEVILÄINEN, M. *et al.* The prognosis value of immune checkpoints in oral squamous cell carcinoma. **Oral Diseases**, v.25, p.1435-1445, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.12991>

SIM, F., LEIDNER, R., BELL, R.B. Immunotherapy for head and neck cancer. **Hematol Once Clin N Am**, v.33, p.301-321, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.12.006>

STARZYNSKA, A. *et al.* The B7 family molecules in oral squamous cell carcinoma: a systematic review. Part I: B7-H1 (PD-L1) and B7-DC (PD-L2). **Adv Dermatol Allergol**, v.39, n.2, p.265-274, 2022. DOI: <https://doi.org/10.5114/ada.2020.98522>

STEEN, S. *et al.* Dynamic up-regulation of PD-L1 in the progression of oral squamous cell carcinoma. **Int J Mol Sci**, v.24, p.16386, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms242216386>

STIRLING, E.R. *et al.* Metabolic implications of immune checkpoint proteins in cancer. **Cells**, v.11, p.179, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11010179>

SU, J. *et al.* PD-L1 expression correlates with immune escape in oral squamous cell carcinoma. **Medical Oncology**, v.37, n.8, p.72, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01393-8>

SUZUKI, S. *et al.* Immune-checkpoint molecules on regulatory T-cells as a potential therapeutic target in head and neck squamous cell cancers. **Cancer Science**, v.111, p.1943-1957, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/cas.14422>

TARLE, M., LUKSIC, I. Pathogenesis and Therapy of Oral Carcinogenesis. **Int J Mol Sci**, v.25, p.6343, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25126343>

TROIANO, G. *et al.* High PD-L1 expression in the tumor cells did not correlate with poor prognosis of patients suffering for oral squamous cells carcinoma: A meta-analysis of the literature. **Cell Proliferation**, v.52, p.e12537, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/cpr.12537>

VEIGAS, F. V., VARMA, S. R., KONDAIAH, P. Immune checkpoint inhibitors in head and neck cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.10, p.5231, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22105231>

WEBER, M. *et al.* Beyond PD-L1- Identification of further potential therapeutic targets in oral cancer. **Cancers**, v.14, p.1812, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14071812>

WEBER, M. *et al.* Prognostic significance PD-L2 expression in patients with oral squamous cell carcinoma- A comparison to the PD-L1 expression profile. **Cancer Medicine**, v.8, p.1124-1134, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.1929>

WEHRHAN, F. *et al.* PD-1 expression and correlation with its ligands in oral cancer species and peripheral blood. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.49, p.118-125, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2020.12.007>

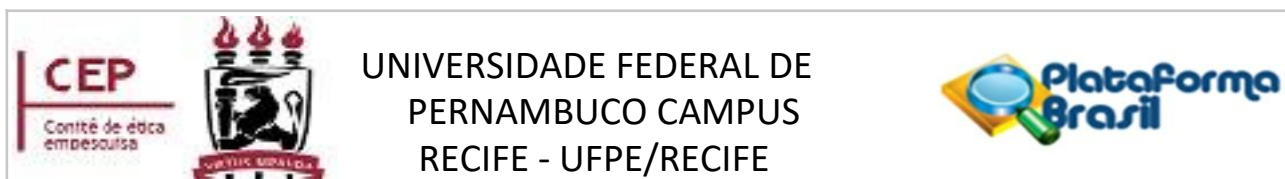
WU, Y. *et al.* PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy- Blockade, Knockdown, or Inhibition. **Frontiers in Immunology**, v.10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02022>

XU, Y. *et al.* Oral side effects of immune checkpoint inhibitor therapy (ICIT): An analysis of 4683 patients receiving ICIT for malignancies at Massachusetts General Hospital, Brigham & Womens's Hospital, and the Dana- Farber Cancer Institute,

2011 to 2019. **Cancer**, v.127, p.1796-1804, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.33436>

ZHONG, C. *et al.* Phenotypical and potential functional characteristics of different immune cells expressing CD28H/B7-H5 and their relationship with cancer prognosis. British Society for Immunology. **Clinical and Experimental Immunology**, v.200, p.12-21, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/cei.13413>

## ANEXOS



## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES PD-1, PD-L1 E PD-L2 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

**Pesquisador:** ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO **Área**

**Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 66322122.6.0000.5208

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.144.733

**Apresentação do Projeto:**

O Projeto submetido para a apreciação do Comitê de Ética refere-se à Tese de Doutorado da discente ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO, vinculada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, projeto este sob a orientação do Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy e co-orientação do Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka. Trata-se de um estudo retrospectivo, transversal de abordagem quantitativa e descritiva a ser realizado com material coletado de pacientes atendidos no Hospital do Câncer e Pernambuco, com diagnóstico de Carcinoma Espinocelular em lábios, língua, palato e assoalho bucal, segundo biópsia prévia, em procedimento de remoção do tumor. O objetivo será avaliar a imunexpressão de PD-1, PDL-1 e PDL-2 nas células tumorais em carcinomas espinocelulares de lábios, língua, assoalho bucal e palato e analisar associações com as características clínico-patológicas. Para isso, a pesquisa utilizará além destas amostras, informações como idade, sexo, cor, consumo de fumo e/ou álcool, oriundas de uma entrevista antes da cirurgia, estas inseridas em estudo realizado anteriormente pela pesquisadora, com aprovação pelo Comitê de Ética da UFPE com parecer n. 3.982.514. A amostra será composta por 40 pacientes e a amostragem será por conveniência. Serão excluídos da pesquisa os pacientes que apresentarem falta de dados clínicos, falta de quantidade suficiente de tecido tumoral no bloco de



parafina e com carcinoma prévio de cabeça e pescoço. As informações coletadas serão armazenadas em formulário de pesquisa desenvolvido especificamente para este objetivo.

### **Objetivo da Pesquisa:**

#### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a imunoexpressão de PD-1, PDL-1 e PDL-2 nas células tumorais em carcinomas espinocelulares de lábios, língua, assoalho bucal e palato e analisar associações com as características clínico-patológicas.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a imunoexpressão de PD-1, PDL-1 e PDL-2 de acordo com cada região anatômica estudada.
- Determinar a imunoexpressão de PD-1, PDL-1 e PDL-2 de acordo com a classificação histológica.
- Determinar a imunoexpressão de PD-1, PDL-1 e PDL-2 de acordo com o estágio de malignidade.
- Analisar a associação entre imunoexpressão de PD-1, PDL-1 e PDL-2 de acordo com a idade.
- Analisar a associação entre imunoexpressão de PD-1, PDL-1 e PDL-2 de acordo com o gênero.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

#### **RISCOS**

A pesquisadora apresenta análise de riscos e, uma vez que pretenda utilizar dados e amostras de uma pesquisa anterior, salienta que o projeto de pesquisa apresenta riscos, o que inclui possibilidade de quebra de sigilo e vazamento de informações. A pesquisadora destaca ainda tomará todas as medidas para minimizar os riscos. Sendo assim, a análise de benefícios está adequada à metodologia proposta.

#### **BENEFÍCIOS**

A pesquisadora apresenta apenas como benefícios os indiretos uma vez que salienta que os resultados obtidos contribuirão para a definição de um melhor prognóstico e um diagnóstico mais adequado, estabelecendo medidas preventivas e formas de tratamento mais eficazes, a fim de diminuir os efeitos colaterais e os recursos financeiros. Além de possibilitar uma melhora da qualidade de vida dos pacientes ao analisar a relação do comportamento das lesões e o padrão de imunoexpressão desses marcadores imunoistoquímicos. Sendo assim, os benefícios estão adequados à metodologia proposta.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta excelente referencial teórico, além de um rigor no detalhamento metodológico, no entanto, apesar de todo o detalhamento da metodologia, apresenta lacunas capazes de gerar

entendimento dúbio e, conseqüentemente, comprometer a análise ética do trabalho. O texto apresenta correta análise dos riscos e benefícios da pesquisa. Apesar do orçamento no valor de R\$ 18.462,20, a pesquisadora, após questionamento do CEP expõe que o valor desse orçamento será obtido através de parceria com o Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) que possui o fomento garantido e que é uma instituição parceira do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os documentos numerados abaixo estão de acordo com as recomendações do CEP:

- A Folha de Rosto está assinada e carimbada digitalmente;
- O Termo de Confidencialidade foi devidamente assinado pelo pesquisador;• O Currículo Lattes de todos os envolvidos na referida pesquisa foram anexados ;
- Declaração de Solicitação de dispensa de TCLE.
- Declaração de autorização de uso de arquivos/dados de pesquisa;• Apresentou carta de Anuência do laboratório responsável pelas análises;
- As informações básicas da Plataforma Brasil.
- O projeto detalhado.

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Conforme as instruções do Sistema CEP/CONEP, ao término desta pesquisa, o pesquisador tem o dever e a responsabilidade de garantir uma devolutiva acessível e compreensível acerca dos resultados encontrados por meio da coleta de dados a todos os

voluntários que participaram deste estudo, uma vez que esses indivíduos têm o direito de tomar conhecimento sobre a aplicabilidade e o desfecho da pesquisa da qual participaram.

Informamos que a aprovação definitiva do projeto só será dada após o envio da NOTIFICAÇÃO COM O RELATÓRIO FINAL da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final disponível em [www.ufpe.br/cep](http://www.ufpe.br/cep) para enviá-lo via Notificação de Relatório Final, pela Plataforma Brasil.

Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado. Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2068619.pdf	13/06/2023 00:10:25		Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTADERESPOSTAPENDENCIAS_AdrianaFirmo.pdf	13/06/2023 00:09:39	ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PDFPROJETOFINALDoutorado_AdrianaFirmo.pdf	13/06/2023 00:07:57	ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	14/05/2023 22:52:37	ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DISPENSATCLE.pdf	26/12/2022 13:00:22	ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO	Aceito
Parecer Anterior	PARECERCOMITEETICACEP_3982514.pdf	26/12/2022 12:57:49	ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	VinculoDoutorado.pdf	26/12/2022 12:57:09	ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacaoinstitucional_LaboratorioUE PB_1.pdf	26/12/2022 12:26:26	ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMODECONFIDENCIALIDADE.pdf	26/12/2022 12:25:55	ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO	Aceito
Declaração de concordância	DeclUsoDadosAssinado.pdf	21/12/2022 17:13:57	ADRIANA CARLA BARBOSA FIRMO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 27 de Junho de 2023

---

**Assinado por:**  
**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
**(Coordenador(a))**

<b>Endereço:</b>	Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde		
<b>Bairro:</b>	Cidade Universitária	<b>CEP:</b>	50.740-600
<b>UF:</b>	PE	<b>Município:</b>	RECIFE
<b>Telefone:</b>	(81)2126-8588	<b>Fax:</b>	(81)2126-3163
		<b>E-mail:</b>	cephumanos.ufpe@ufpe.br

## ANEXO B – INSTRUÇÕES AOS AUTORES

### EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARINGOLOGY

ISSN 1434-4726

#### Instructions for Authors

---

##### Types of papers

##### Original Article

Limited to 5000 words, 45 references, no more than 5 figures. In case of multicentric studies, authorship must include no more than 2 authors per each center that contributes to the study

##### Review Article

Limited to 7000 words, 50 references, no more than 5 figures

##### Comment

The article type denotes an authoritative, informed and often provocative expert piece on topical issues relevant to the journal's readership. Max 1000-1500 words, 10 references, 1 figure.

##### Short Communication

Limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures

##### Letter to the Editor

Up to 600 words, no more than 5 references

Please note: If the Letter to the Editor comments on a previously published article, the following conditions must be met:

1. The article the Letter to the Editor refers to must have been published in the European Archives of Otorhinolaryngology.
2. The article the Letter to the Editor refers to must be no more than 6 months old (since the date of online first publication).

For **all** Letters to the Editor, the same rule applies: they must provide something significant and new for the reader.

## **How I do It**

This new section in the journal is for showing how surgical procedures are carried out. Limited to 1200 words, 6 figures, 10 key references. Please submit your paper following to the instructions in the download below.

"How I do it" instructions (Download pdf, 183 kB)

Visit the website below to check your connection speed prior to uploading:

[Connection speed check](#)

The final categorization of an accepted submission is the responsibility of the Editor in Chief.

## **Case reports/series**

They are accepted only in exceptional cases, provided that they demonstrate new scientific findings that add value to the scientific community. Case reports should follow the CARE guidelines. Limited to 1000-1500 words, figures should be included.

## **General information**

The Journal accepts manuscripts dealing with all subspecialties of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck. Manuscripts dealing with Plastic Surgery of the Head and Neck are welcome, whereas manuscripts focusing on Aesthetic and Cosmetic Surgery will only be accepted in very rare cases, if they are of particular importance to the field.

- The journal does not offer pre-evaluation. Therefore please directly submit your manuscript to EditorialManager at the below link. The Editorial Office will then contact you.

<https://www.editorialmanager.com/eaor/default.aspx>.

## **Editorial procedure**

### **Double-blind peer review**

This journal follows a double-blind reviewing procedure. This means that the author will remain anonymous to the reviewers throughout peer review. It is the responsibility of the author to anonymize the manuscript and any associated materials.

- Author names, affiliations and any other potentially identifying information should be removed from the manuscript text and any accompanying files (such as figures of supplementary material);

- A separate Title Page should be submitted, containing title, author names, affiliations, and the contact information of the corresponding author. Any acknowledgements, disclosures, or funding information should also be included on this page;
- Authors should avoid citing their own work in a way that could reveal their identity.

This journal also publishes special/guest-edited issues. The peer review process for these articles is the same as the peer review process of the journal in general.

Additionally, if a guest editor authors an article in their issue/collection, they will not handle the peer review process.

## **Manuscript Submission**

### **Manuscript Submission**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

## **Permissions**

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

## **Online Submission**

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

## **Source Files**

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

## **ORCID ID**

This publication requires that the corresponding author provides his/her ORCID ID before proceeding with submission.

For more information about this journal’s ORCID policy, please visit the [ORCID FAQ](#)

## **Reviewer Suggestion**

Authors will be kindly asked to suggest up to 5 potential reviewers for their papers. These recommendations will help to ensure the journal's high scientific level and support a quick review process, thus reducing the time from manuscript submission to publication. Please note that only reviewer suggestions from internationally respected institutions other than the corresponding author's institution will be taken into consideration. In addition, the correspondence author should not have previously published any articles together with the suggested reviewers.

## **Title Page**

Please make sure your title page contains the following information.

### **Title**

The title should be concise and informative.

### **Author information**

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as ChatGPT, do not currently satisfy our authorship criteria. Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript.

## **Abstract**

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusion

*For life science journals only (when applicable)*



- Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
- Trial registration number and date of registration followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

## Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

## Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

- **Competing Interests:** Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to “Competing Interests and Funding” below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

## Text

### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature’s LaTeX template](#).

## Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

## Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

## References

### Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738.  
<https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN.org LTWA](https://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file `sn-basic.bst` which is included in the [Springer Nature Article Template](#).

## Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

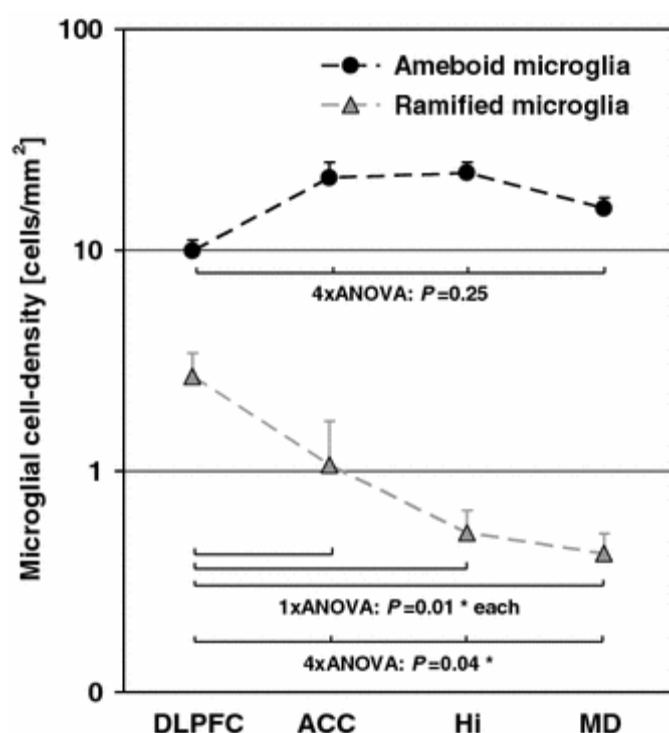
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## Artwork and Illustrations Guidelines

### Electronic Figure Submission

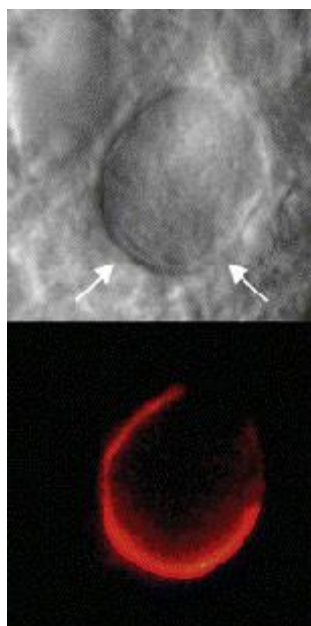
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### Line Art



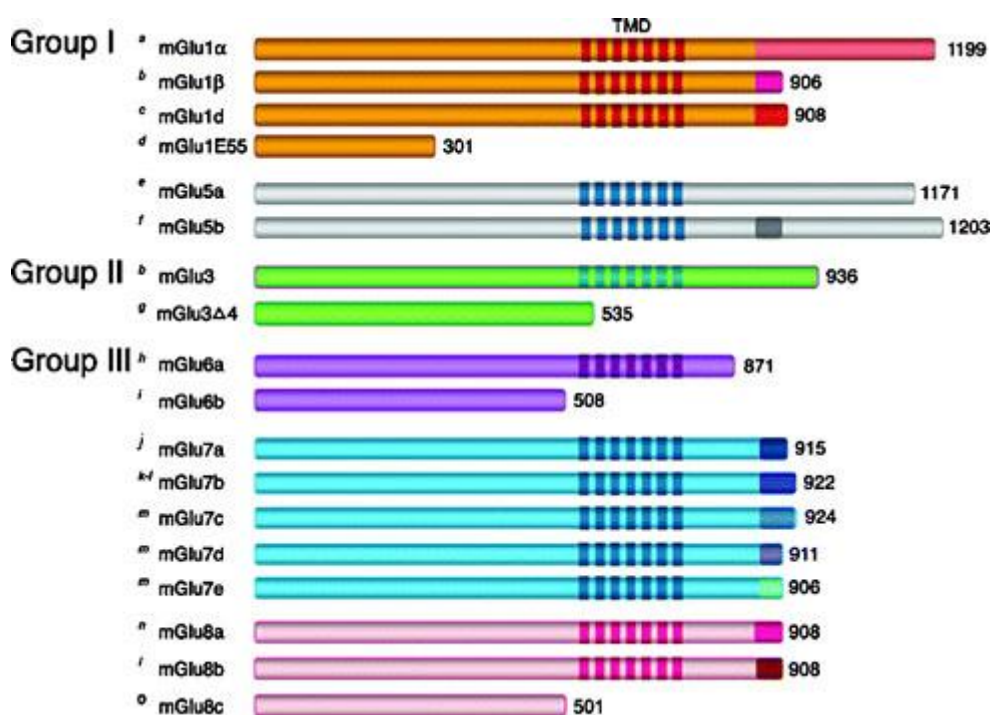
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.

- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### **Figure Lettering**

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### **Figure Numbering**

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

### **Figure Captions**

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### **Figure Placement and Size**

- Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

## Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

## Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

## Generative AI Images

Please check [Springer's policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

## Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

## Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
- High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

## Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

### **Text and Presentations**

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### **Spreadsheets**

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

### **Specialized Formats**

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### **Collecting Multiple Files**

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### **Numbering**

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

### **Captions**

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### **Processing of supplementary files**

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### **Accessibility**

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

### **Generative AI Images**

Please check [Springer’s policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

### **Editing Services**



## English

How can you help improve your manuscript for publication?

Presenting your work in a well-structured manuscript and in well-written English gives it its best chance for editors and reviewers to understand it and evaluate it fairly. Many researchers find that getting some independent support helps them present their results in the best possible light. The experts at Springer Nature Author Services can help you with manuscript preparation—including **English language editing, developmental comments, manuscript formatting, figure preparation, translation**, and more.

Get started and save 15%

You can also use our free Grammar Check tool for an evaluation of your work.

Please note that using these tools, or any other service, is not a requirement for publication, nor does it imply or guarantee that editors will accept the article, or even select it for peer review.

## Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include\*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.

- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

**Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.**

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

\*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

- an erratum/correction may be placed with the article
- an expression of concern may be placed with the article
- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked “retracted” and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author’s institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author’s and article’s bibliographic record.

### **Fundamental errors**

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

### **Suggesting / excluding reviewers**

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

### **Authorship principles**

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

### **Authorship clarified**

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their

specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines\*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

\* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,

Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018

### **Disclosures and declarations**

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

### **Data transparency**

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

### **Role of the Corresponding Author**

**One author** is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;\*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

\* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

### **Author contributions**

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

### **Examples of such statement(s) are shown below:**

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

### **Affiliation**

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

### **Changes to authorship**

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

### **Author identification**

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

### **Deceased or incapacitated authors**

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

### **Authorship issues or disputes**

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

### **Confidentiality**

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

### **Compliance with Ethical Standards**

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

### **Competing Interests**

**Authors** are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

**Editorial Board Members and Editors** are required to declare any competing interests and may be excluded from the peer review process if a competing interest exists. In addition, they should exclude themselves from handling manuscripts in cases where there is a competing interest. This may include – but is not limited to – having previously published with one or more of the authors, and sharing the same institution as one or more of the authors. Where an Editor or Editorial Board Member is on the author list we recommend they declare this in the competing interests section on the submitted manuscript. If they are an author or have any other competing interest regarding a specific manuscript, another Editor or member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review. These submissions are subject to the exact same review process as any other manuscript. Editorial Board Members are welcome to submit papers to the journal. These submissions are not given any priority over other manuscripts, and Editorial Board Member status has no bearing on editorial consideration.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

**Funding:** Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

**Employment:** Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

**Financial interests:** Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

**Non-financial interests:** In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book



reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential competing interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is **not added** to the manuscript itself. Under ‘summary of requirements’ (see below) funding information should be included in the ‘**Declarations**’ section.

### Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and included on a **title page that is separate from the manuscript** with a section entitled “**Declarations**” when submitting a paper.

Having all statements in one place allows for a consistent and unified review of the information by the Editor-in-Chief and/or peer reviewers and may speed up the handling of the paper. Declarations include Funding, Competing interests, Ethics approval, Consent, Data, Materials and/or Code availability and Authors’ contribution statements. **Please use the title page for providing the statements.**

Once and if the paper is accepted for publication, the production department will put the respective statements in a distinctly identified section clearly visible for readers.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) competing interests and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

### Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].
- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

### Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.
- No funding was received for conducting this study.

- No funds, grants, or other support was received.

**Examples of statements to be used when there are interests to declare:**

- **Financial interests:** Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company W and owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.  
**Non-financial interests:** Author C is an unpaid member of committee Z.
- **Financial interests:** The authors declare they have no financial interests.  
**Non-financial interests:** Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.
- **Financial interests:** Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.  
**Non-financial interests:** none.
- **Financial interests:** Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.  
**Non-financial interests:** Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

**Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:**

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.
- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

**Research involving human participants, their data or biological material**

**Ethics approval**

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the

study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

### **Retrospective ethics approval**

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

### **Ethics approval for retrospective studies**

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

### **Ethics approval for case studies**

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on **Informed Consent**.

### **Cell lines**

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the [NCBI database](#) for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the [International Cell Line Authentication Committee](#) (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

### **Research Resource Identifiers (RRID)**

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

### Examples:

**Organism:** *Filip1<sup>tm1a(KOMP)Wtsi</sup>* **RRID:MMRRC\_055641-UCD**

**Cell Line:** RST307 cell line **RRID:CVCL\_C321**

**Antibody:** Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, **RRID:AB\_2722109**

**Plasmid:** mRuby3 plasmid **RRID:Addgene\_104005**

**Software:** ImageJ Version 1.2.4 **RRID:SCR\_003070**

RRIDs are provided by the [Resource Identification Portal](#). Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly [register a new resource](#) and obtain an RRID.

### Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) or any of the primary registries that participate in the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#).

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

## Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the [EQUATOR Network](#) when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials ([CONSORT](#)) and Study protocols ([SPIRIT](#))

Observational studies ([STROBE](#))

Systematic reviews and meta-analyses ([PRISMA](#)) and protocols ([Prisma-P](#))

Diagnostic/prognostic studies ([STARD](#)) and ([TRIPOD](#))

Case reports ([CARE](#))

Clinical practice guidelines ([AGREE](#)) and ([RIGHT](#))

Qualitative research ([SRQR](#)) and ([COREQ](#))

Animal pre-clinical studies ([ARRIVE](#))

Quality improvement studies ([SQUIRE](#))

Economic evaluations ([CHEERS](#))

## Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Ethics approval'.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of D (Ethics approval number: ...).

Examples of statements to be used for a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

### **Informed consent**

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent/guardian if the participant is a minor or incapable or legal representative) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

### **Consent and already available data and/or biologic material**

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

## **Data protection, confidentiality and privacy**

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made aware what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered “informed”. However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

## **Consent to Participate**

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

## **Consent to Publish**

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies.

## **Summary of requirements**

The above should be summarized in a statement and placed in a ‘Declarations’ section before the reference list under a heading of ‘Consent to participate’ and/or ‘Consent to publish’. Other declarations include Funding, Competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors’ contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Sample statements for "**Consent to participate**":

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Informed consent was obtained from legal guardians.



Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

Sample statements for **“Consent to publish”**:

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

### **Research Data Policy**

This journal operates a type 1 research data policy. The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature’s list of repositories and research data policy.

### List of Repositories

### Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

## DataCite

If the journal that you're submitting to uses double-blind peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also blinded. There are [data repositories that can assist with this](#) and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Authors who need help understanding our data sharing policies, help finding a suitable data repository, or help organising and sharing research data can access our [Author Support portal](#) for additional guidance.

## **After Acceptance**

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Shortly after this you will receive two e-mails. One contains a request to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article, as well as to arrange rights and payment of any associated publication cost. A second e-mail containing a link to your article's proofs will be sent once typesetting is completed.

## **Article publishing agreement**

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

## **Offprints**

Offprints can be ordered by the corresponding author.

## **Color illustrations**

Publication of color illustrations is free of charge.

## **Proof reading**

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

## **Online First**

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

## Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average\*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

\*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

## Open Choice

## Funding and Support pages

## Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

## **Open access publishing**

---

To find out more about publishing your work Open Access in *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, including information on fees, funding and licenses, visit our [Open access publishing page](#).