

GUSTAVO NUNES BENTO

**Expressão de PD1, PD-L1, PD-L2 e CD8⁺ em
carcinomas escamocelulares cutâneos de alto
risco em cabeça e pescoço**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Anestesiologia, Ciências
Cirúrgicas e Medicina Perioperatória

Orientador: Prof. Dr. Claudio Roberto Cernea

**São Paulo
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bento, Gustavo Nunes

Expressão de PD1, PD-L1, PD-L2 e CD8+ em
carcinomas escamocelulares cutâneos de alto risco em
cabeça e pescoço / Gustavo Nunes Bento. -- São Paulo,
2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas
e Medicina Perioperatória.

Orientador: Claudio Roberto Cernea.

Descritores: 1.CD8+ 2.PD-1 3.PD-L1 4.PD-L2
5.Carcinoma de células escamosas 6.Neoplasias de
cabeça e pescoço 7.Neoplasias cutâneas 8.Linfócitos de
interstício tumoral 9.Microambiente tumoral

USP/FM/DBD-026/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Se vi mais longe, foi por estar sobre o ombro de gigantes.”

Isaac Newton

(Trecho de uma carta de Newton para Robert Hooke, em 5 de Fevereiro de 1676, baseado numa metáfora atribuída a Bernardo de Chartres).

À minha esposa Grazielle, meu sim diário.
Aquele que me estimula, apoia e traz um
carinho especial ao meu cotidiano.

Aos meus pais Tônio Cesar Bento e
Marlene Nunes Bento, por terem me dado
o mundo através da educação.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Cláudio Roberto Cernea**, professor da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, conhecedor profundo dos tumores de pele, que contribuiu para tornar real uma parceria entre duas grandes Universidades do mundo e ajudando a trazer à realidade brasileira a nova fronteira para tratamentos das neoplasias malignas da pele, as terapias imunológicas.

Ao **Dr. André Bandiera de Oliveira Santos**, colega de residência e amigo, pelo incentivo, aprimoramento da ideia do projeto e viabilização prática do mesmo.

À **Dra. Sara Pai**, minha mentora na Universidade de Harvard, que cedeu seu laboratório e lá me acolheu para que pudesse fazer a análise da amostra colhida no Brasil.

Ao amigo **Hyung-Jin Yoo**, com quem tive o prazer de trabalhar no laboratório em Boston, bioquímico responsável pela preparação e confecção das lâminas para imunofluorescência, assim como sua leitura e descrição dos dados obtidos.

Aos meus sócios e grandes amigos **Marcelo Belli**, **Kauê Milanez Lopes** e **Francisco Van de Sande Lee**, pelo trabalho extra nas minhas inúmeras ausências, durante a elaboração deste trabalho e por me inspirarem a tentar ser cada dia melhor.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
3 REVISÃO DA LITERATURA	9
4 MÉTODOS.....	26
4.1 Imunofluorescência	28
4.2 Microscopia e Análise.....	30
4.3 Análise Estatística	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Expressão de PD-1, PD-L1, PD-L2 e CD8 ⁺ e suas colocalizações em todo o tecido	42
5.2 Expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e suas colocalizações no infiltrado inflamatório tumoral habitado por CD8 ⁺	44
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	65
8 ANEXO	67
9 REFERÊNCIAS	73
APÊNDICES	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	-	Micrômetro
AJCC	-	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	-	Célula dendríticas apresentadora de antígenos.
CBC	-	Carcinoma basocelular
CD3+	-	Linfócito T imaturo
CD4+	-	Linfócito T helper
CD8+	-	Linfócito T citotóxico
CEC	-	Carcinoma de células escamosas
CTLA-4	-	Antígeno 4 associado ao linfócito T
DAPI	-	4',6'-diamino-2-fenil-indol
EUA	-	Estados Unidos da América
FDA	-	<i>Food and Drug Agency</i> (agência de drogas e alimentos dos Estados Unidos da América)
HCMFUSP	-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	-	Vírus da imunodeficiência adquirida
IC95%	-	Intervalo de confiança de 95%
ICESP	-	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
Ig	-	Imunoglobulina
IL	-	Interleucina
ITIM	-	Imunorreceptor inibitório de estrutura molecular secundária baseada na tirosina
ITSM	-	Imunorreceptor inibitório de estrutura molecular secundária de troca
kDa	-	Quilodalton
LTreg	-	Linfócito T regulador expressor de FOXP3
MGH	-	Massachusetts General Hospital

MHC	-	Complexo maior de histocompatibilidade
mm	-	Milímetro
mm ²	-	Milímetro quadrado
PD-1	-	Imunorreceptor morte programada 1
PD-L1	-	Imunorreceptor ligante de morte programada 1
PD-L2	-	Imunorreceptor ligante de morte programada 2
RR	-	Risco relativo
TILs	-	Infiltrado linfocitário tumoral (<i>tumor infiltrating lymphocytes</i>)
UV	-	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Corte histológico de carcinoma epidermoide cutâneo moderadamente diferenciado	11
Figura 2 - Ilustração representativa da zona H (maior risco para câncer de pele) em segmento cefálico	12
Figura 3 - Apresentação clínica de CEC avançado de pele. Fotografias autorizadas para fins acadêmicos.....	16
Figura 4 - Representação esquemática das vias de sinalização imune e terapia-alvo anti-PD1.....	19
Figura 5 - Representação esquemática da interação de sinais entre as APC e Linfócitos T	20
Figura 6 - Representação esquemática do DNA responsável pela formação do PD-1.....	21
Figura 7 - Ilustração da estrutura tridimensional das moléculas de PD-L1, PD-L2 e sua interação com PD-1	24
Figura 8 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pela coloração DAPI.....	32
Figura 9 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PDL-1 e DAPI.....	32
Figura 10 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações CD8 ⁺ e DAPI	33
Figura 11 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PDL-2 e DAPI.....	33

Figura 12 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PD-1 e DAPI.....	34
Figura 13 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PDL-1, CD8 ⁺ , PDL-2, PD-1 e DAPI	34
Figura 14 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PDL-1, CD8 ⁺ , PD-L2, PD-1 e DAPI	35
Figura 15 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PDL-1, CD8 ⁺ , PD-L2, PD-1 e DAPI	35
Figura 16 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PDL-1, CD8 ⁺ , PDL-2, PD-1 e DAPI	36
Figura 17 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PD-L1, CD8 ⁺ e PD-L2	36

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Intensidade de sinal das cores e suas sobreposições e área a ser considerada positiva em metodologia de imunofluorescência aplicada em série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016..... 31
- Gráfico 2 - Porcentagem de amostras com expressão dos imunorreceptores e suas colocalizações no tecido tumoral de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016..... 43
- Gráfico 3 - Porcentagem de amostras com expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e suas colocalizações no infiltrado inflamatório habitado pelo CD8+ observado em série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016..... 45
- Gráfico 4 - Curva de Kaplan Meyer: ocorrência de recidiva tumoral de acordo com estadiamento T de série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 ($p = 0,068$)..... 46
- Gráfico 5 - Curva de Kaplan Meyer: ocorrência de óbito de acordo com estadiamento T de série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 ($p = 0,032$) 46
- Gráfico 6 - Curva de Kaplan Meyer: ocorrência de óbito de acordo com o aparecimento de metástase à distância durante seguimento de série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 ($p = 0,039$) 47

- Gráfico 7 - Curva de Kaplan Meyer: expressão de PD-1 \geq 5,426% (imunofluorescência) em série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 e ocorrência de recidiva durante seguimento (p = 0,091) 51
- Gráfico 8 - Curva de Kaplan Meyer: expressão de PD1/PD-L1 \geq 3,345% (imunofluorescencia) em série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 e ocorrência de recidiva durante seguimento (p = 0,054) 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento T referente à casuística de pacientes operados por CECs cutâneos de cabeça e pescoço entre 2010 e 2016.....	40
Tabela 2 - Estadiamento linfonodal referente à casuística de pacientes operados por CECs cutâneos de cabeça e pescoço entre 2010 e 2016.....	40
Tabela 3 - Características clinicopatológicas clássicas e relação com risco de recidiva dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016.....	47
Tabela 4 - Características clinicopatológicas clássicas e relação com risco de óbito dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016.....	48
Tabela 5 - Risco de recidiva de acordo com expressão de imunorreceptores e suas colocalizações no tecido total dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016.....	49
Tabela 6 - Risco de óbito de acordo com expressão de imunorreceptores e suas colocalizações no tecido total dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016.....	50
Tabela 7 - Risco de recidiva de acordo com expressão de imunorreceptores e suas colocalizações no infiltrado inflamatório habitado por CD8 ⁺ dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016.....	52

Tabela 8 - Risco de óbito de acordo com expressão de imunorreceptores e suas colocalizações no infiltrado inflamatório habitado por CD8 ⁺ dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016.....	53
--	----

RESUMO

Bento GN. *Expressão de PD1, PD-L1, PD-L2 e CD8⁺ em carcinomas escamocelulares cutâneos de alto risco em cabeça e pescoço* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Objetivos: o carcinoma de células escamosas cutâneo (CEC) é o segundo câncer de pele mais comum entre os indivíduos de pele clara e é causado pela radiação UV. Os *immune checkpoints*, como PD-1 (*Programmed Death*) e seus ligantes, PD-L1 e PD-L2, são uma maneira eficaz de reativar a resposta imune antitumoral do hospedeiro em muitos tipos de câncer. O objetivo foi avaliar a presença do eixo PD-1: PD-L1 / PD-L2 e o infiltrado CD8⁺ associado no CEC de pele de cabeça e pescoço. **Métodos:** foram identificados 46 pacientes com CEC de alto risco. A coloração multiplex para PD-1, PD-L1, PD-L2 e CD8 foi realizada e as imagens foram capturadas por um microscópio de epifluorescência. As positivities PD-1, PD-L1 e PD-L2 foram pontuadas com base nos valores de corte determinados como > 1%, > 20% e > 50%. A curva ROC foi aplicada para definir o valor de corte estatisticamente mais significativo para recorrência e óbito. **Resultados:** todos os resultados abaixo se referem à expressão em > 1% das células. A expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 foi encontrada em 80,4% (37 de 46), 84,8% (39 de 46), 47,8% (22 de 46) pacientes, respectivamente. PD-1 / PD-L1, PD-1 / PD-L2 e PD-L1 / PD-L2 colocalizados em 80,4% (37 de 46), 45,7% (21 de 46) e 47,8% (22 de 46) pacientes, respectivamente. Todos os pacientes apresentaram infiltração de CD8⁺ em algum grau. Nesse infiltrado, PD-1 / PD-L1, PD-1 / PD-L2 e PD-1 / PD-L1 / PD-L2 foram colocalizados em 97,8% (45 de 46), 82,6% (38 de 46) e 82,6% (38 de 46) pacientes, respectivamente. **Conclusão:** o eixo PD-1: PD-L1 / PD-L2 é muito expresso no CEC de pele. Os presentes achados apoiam a investigação do bloqueio dessa via nesse tipo de tumor.

Descritores: CD8⁺; PD-1; PD-L1; PD-L2; Carcinoma de células escamosas; Neoplasias de cabeça e pescoço; Neoplasias cutâneas; Linfócitos de interstício tumoral; Microambiente tumoral.

ABSTRACT

Bento GN. *PD-1, PD-L1, PD-L2 and CD8 expression in advanced head and neck cutaneous squamous cell carcinomas* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Objectives: cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is the second most common skin cancer among caucasians and is caused by UV radiation. Blockade of immune checkpoint axes, such as programmed cell death 1 (PD-1) and its ligands, PD-L1 and PD-L2, is an effective way to reactivate the host anti-tumor immune response across many cancer types. Our aim was to assess the presence of the PD-1: PD-L1/PD-L2 axis and associated CD8⁺ infiltrate in cSCC of the head and neck. **Methods:** 46 patients with high-risk cSCC were identified. Multiplex staining for PD-1, PD-L1, PD-L2, and CD8 was performed and images were captured by an epifluorescence microscope. PD-1, PD-L1, and PD-L2 positivity were scored based on cutoff values of > 1%, > 20% and > 50%. ROC curve method was applied to define the most statistically significant cutoff value for recurrence and death. **Results:** all results below refer to the expression in > 1% of the cells. PD-1, PD-L1 and PD-L2 expression was found in 80.4% (37 of 46), 84.8% (39 of 46), 47.8% (22 of 46) patients, respectively. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2 and PD-L1/PD-L2 co-localized in 80.4% (37 of 46), 45.7% (21 of 46) and 47.8% (22 of 46) patients, respectively. All patients had CD8⁺ infiltration. In this infiltrated, PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2 and PD-1/PD-L1/PD-L2 co-localized in 97.8% (45 of 46), 82.6% (38 of 46) and 82.6% (38 of 46) patients, respectively. **Conclusion:** the PD-1:PD-L1/PD-L2 axis is highly activated in cSCC. Our findings support further studies on the use of pathway blockade in this tumor type.

Descriptors: CD8⁺; PD-1; PD-L1; PD-L2; Carcinoma, squamous cell; Head and neck neoplasms; Skin neoplasms; Lymphocytes, tumor-infiltrating; Tumor microenvironment.

1 INTRODUÇÃO

O câncer da pele é a neoplasia maligna mais comum do ser humano, com prevalência superior a todas as outras neoplasias malignas somadas. No Brasil, corresponde a 30% de todos os casos novos de câncer anualmente. Entre os tipos de câncer de pele, o mais frequente é o carcinoma basocelular, seguido pelo carcinoma de células escamosas (CEC). Esses dois tipos são classificados como tumores de pele não melanoma, e, juntos, têm uma estimativa de incidência anual no Brasil de mais de 180.000 casos¹. Essas neoplasias são doenças malignas originadas de tecido epitelial estratificado plano queratinizado, de origem do folheto embrionário denominado ectoderma. Sua origem no epitélio se dá na porção mais externa do tecido, próxima à camada de queratina².

Estima-se que em 2012, quase 10.000 pessoas tenham morrido por carcinomas de células escamosas de pele somente nos Estados Unidos da América (EUA)^{3,4}.

Os carcinomas de células escamosas são os segundos tumores de pele mais frequentes, com incidência crescendo acima da incidência dos carcinomas basocelulares. Esta discrepância entre incidências tem servido para diminuir a distância entre eles. Estudos nos EUA mostram taxas de incidência já muito semelhantes desde o início dos anos 2000. A Organização Mundial de Saúde estima uma incidência anual de dois a três

milhões de casos ao ano mundialmente, embora alguns estudos falem em até cinco milhões, podendo ter uma incidência anual de até 700.000 somente nos EUA⁵⁻⁷.

Apesar do aumento da incidência, que pode chegar em alguns Estados da Austrália e Sul dos EUA a 900 casos por 100.000 habitantes, essa tendência é mais importante na população acima de 60 anos e na população feminina, permanecendo estável e até diminuindo em populações mais jovens, notadamente aquelas abaixo dos 45 anos. Este dado parece estar relacionado ao maior engajamento deste grupo na proteção aos raios ultravioleta (UV), com utilização de proteção química e mecânica dos mais jovens⁷⁻⁹.

O fator de risco mais importante e comum é a exposição solar, especialmente relacionados à exposição aos raios UVB. A presença da exposição aos raios ultravioleta tem papel primordial na gênese do tumor, tanto na quantidade de tempo de exposição, quanto no número de queimaduras solares e sua intensidade, que acontecem geralmente no território da face e pescoço. A diminuição da camada de ozônio tem sido responsabilizada pelo aumento no número de casos pelo mundo¹⁰. O bronzeamento artificial é mais um fator que aumenta de forma significativa as chances de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas, chegando a um crescimento estimado na chance de desenvolvimento desta neoplasia de até 70%. Pessoas com peles, olhos e cabelos mais claros, ou seja, caucasianos, são mais suscetíveis ao desenvolvimento destas neoplasias¹¹⁻¹⁴.

Outros fatores envolvidos são úlceras crônicas (Doença de Marjolin), e síndromes genéticas como albinismo e xeroderma pigmentoso, estas, relacionadas à incapacidade de reparo do DNA após dano induzido pela radiação ultravioleta. Por fim, fator de risco de grande importância é a imunossupressão, desencadeada por doenças como linfoma e leucemia, infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) ou imunossupressão induzida por drogas em pacientes transplantados, como o FK506 (Tacrolimus)¹²⁻¹⁴.

A história natural da doença mostra aparecimento de lesões pré-tumorais, como a queratose actínica e a doença de Bowen. Esta, carcinoma *in situ*, quando tratada de forma adequada, pode evitar o aparecimento de doença invasiva^{15,16}.

A apresentação clínica caracteriza-se por lesões muitas vezes provenientes de áreas de queratoses prévias, que passam a apresentar um caráter nodular, doloroso, elevado e/ou infiltrativo. A lesão passa a ter crescimento mais rápido e com episódios de sangramento. Linfonomegalias em topografia de drenagem preferencial do tumor também podem estar presentes ao diagnóstico¹⁷⁻¹⁹.

A prevenção primária se faz pelos cuidados com a exposição solar, utilizando proteção mecânica com roupas e chapéus, além de proteção química, por uso de protetores solares. A proteção secundária se faz por diagnóstico precoce das lesões suspeitas para malignidade. Pacientes precisam ter toda a pele examinada a fim de encontrar lesões malignas de pele sincrônicas, uma vez que há risco aumentado para todos os tipos de

neoplasias malignas de pele. O diagnóstico é confirmado por biópsia incisional ou excisional, que precisa conter áreas de derme a fim de obter amostra suficiente^{6,18}.

A doença tem como tratamento principal a excisão cirúrgica com margens amplas, acompanhadas ou não de ressecção linfonodal. Pode haver a necessidade de complementação com radioterapia adjuvante, acompanhada de quimioterapia, embora com discutível benefício desta última.

O século XXI trouxe, com os trabalhos liderados por Allison e Honjo, um novo paradigma na definição da relação entre o sistema imunológico e as neoplasias malignas. Pela primeira vez na literatura, foram descritos mecanismos de inibição da atividade linfocitária que visam originalmente regular a atividade do sistema imune, e que de forma surpreendente é também utilizada por neoplasias malignas, promovendo um desligamento da atividade linfocitária dentro daquilo que passa a ser denominado de microambiente tumoral. Esse desligamento é feito por interações entre proteínas transmembrana que passam a ser então chamados de *immune checkpoints*, expressão em inglês sem tradução adotada para o português, sendo adotada nesta tese, assim como o termo imunorreceptor. Esses primeiros imunorreceptores foram chamados de *citotóxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) ou CD152 e de *Programmed Death 1* (PD-1) e seus ligantes, CD-80, PD-L1 e PD-L2²⁰⁻²⁴.

Inúmeros trabalhos na literatura visaram estabelecer a presença dos imunorreceptores no microambiente tumoral em múltiplas neoplasias malignas, inclusive nos carcinomas escamocelulares, além de tentar esclarecer sua relação com fatores prognósticos clássicos, evolução e desfecho final.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

- Identificar a presença dos marcadores denominados PD-1, PD-L1, PD-L2 e CD8+ no microambiente tumoral dos carcinomas de células escamosas cutâneos de alto risco em território de cabeça e pescoço.
- Estabelecer os critérios de colocação dos imunorreceptores.
- Correlacionar expressão de imunorreceptores, assim como dados de risco com a evolução clínica a longo prazo, definidos como tempo livre de recidiva e sobrevida global.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os carcinomas de células escamosas são provenientes de células que compõem o folículo piloso. Nesta porção do tecido, há células-tronco e células progenitoras que darão origem às células bem diferenciadas de acordo com a necessidade, e que tendem a permanecer viáveis durante toda a vida do indivíduo. Quanto mais tempo uma célula vive, maior a probabilidade de adquirir mutações que levarão ao desenvolvimento de neoplasias malignas. Desta forma, as células-tronco são consideradas aquelas com maior potencial de transformação maligna no corpo humano. Histologicamente, o tumor se apresenta com pleomorfismo nuclear e figuras de mitose variáveis, dependendo do seu grau de diferenciação, geralmente acompanhados de processo inflamatório crônico abundante, com presença de linfócitos T, B e células *Natural Killers* (Figura 1). Do ponto de vista genético, a supressão do gene *TP53*, que em última análise induz à apoptose, é a mutação mais comum neste tipo de tumor. Inibidores das quinases dependentes de ciclina (*CDKN2A* e *CDKN2B*) também estão presentes, assim como os oncogenes *KRAS* e *HRAS*. Receptores *NOTCH 1* a *4*, que promovem a diferenciação celular, também têm um efeito antitumoral, e estão frequentemente deletados nessas neoplasias. O efeito final da radiação, levando à deleção de *TP53* e ao surgimento de *KRAS* e *HRAS*, causa o aparecimento de genes tumorais, *AP1*, *NF1* e *ETS*^{7,25,26}.

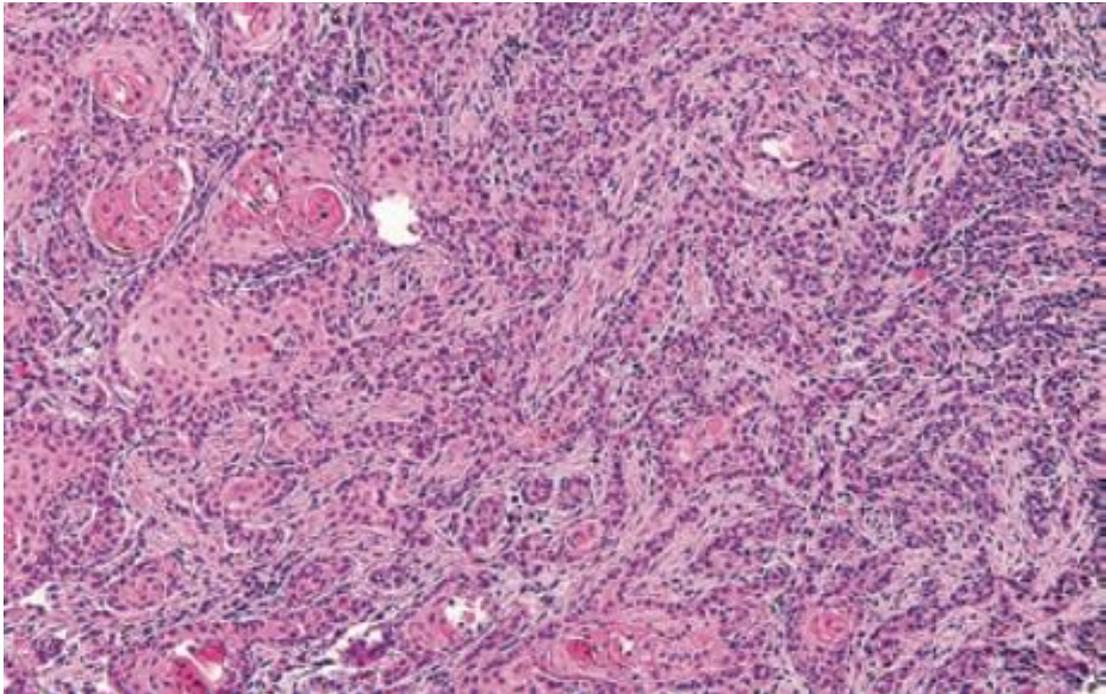


Figura 1 - Corte histológico de carcinoma epidermoide cutâneo moderadamente diferenciado [Fonte: acervo pessoal]

A avaliação dos pacientes com suspeita da doença deve ser feita por meio de exame físico minucioso, com exposição de toda a pele, para detectar outros tumores sincrônicos. São observados tamanho, espessura, infiltração de estruturas adjacentes, linfonodomegalias locorregionais e exame físico de diversos aparelhos e sistemas. Exames de imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética são empregados quando há suspeita de doença avançada, como invasão óssea ou invasão perineural, respectivamente^{18,19,27-29}.

Ao diagnóstico, os carcinomas escamocelulares de pele devem sempre ter seu risco estratificado. Esta estratificação deve ser feita levando-se em consideração grau de diferenciação, subtipos, tamanho, espessura, invasão local, disseminação perineural e disseminações linfática e hematogênica. Tumores localizados no território de cabeça e pescoço têm pior prognóstico,

principalmente na área “H” da chamada máscara facial (Figura 2). Descrita na década de 1980, engloba áreas anatômicas como orelhas, pálpebras, supercílios, nariz, lábio (pele e vermelhão), região pré-auricular e retroauricular^{30,31}. Tumores desta região apresentam taxas maiores de recidiva com qualquer tamanho, mas principalmente quando o diâmetro for superior a 6 mm. Regiões de risco intermediário e baixo risco apresentam maiores taxas de recidiva quando apresentam diâmetro superior a 2,0 cm^{28,29,32,33}. Os subtipos histológicos mais agressivos destas neoplasias são os acantolíticos, carcinossarcomas e carcinomas desmoplásicos^{27,28}.

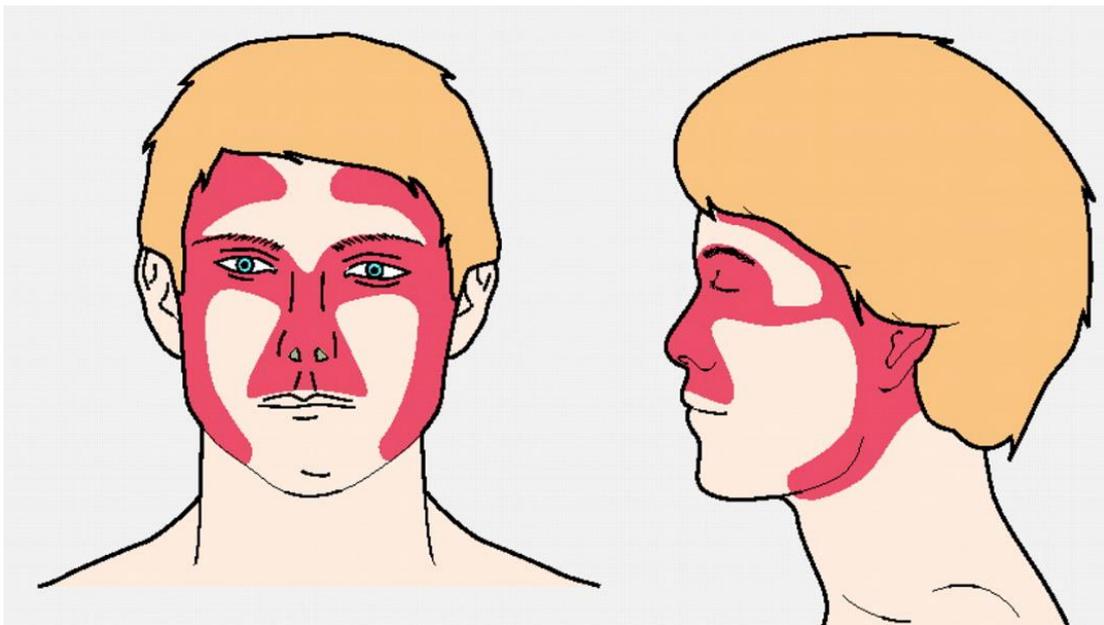


Figura 2 - Ilustração representativa da zona H (maior risco para câncer de pele) em segmento cefálico [Fonte: Baxter *et al.*³⁴]

A espessura tumoral também influencia prognóstico. A *National Comprehensive Cancer Network* considera a espessura um importante fator de pior prognóstico, onde aqueles tumores com menos de 2,0 mm de espessura têm virtualmente 0% de chance de metástase. Quando apresentam

espessura entre 2,0 mm e 6,0 mm, 4%, enquanto que aqueles com mais de 6,0 mm de espessura, têm 14% de chance de metástase hematogênica ou linfática³⁵. Alguns trabalhos mostram ainda que tumores com mais de 2,0 mm de espessura têm maiores chances de recidiva local e que para cada 1,0 mm de espessura a mais, o risco de recidiva ou metástase aumenta gradualmente^{2,32}. Tumores que chegam ou ultrapassam a derme reticular, chegando ou não ao tecido celular subcutâneo (Clark IV e V), também têm mais chances de pior evolução^{17,35}. A classificação TNM da *American Joint Committee* em sua 8ª edição, considera os tumores com mais de 6,0 mm de espessura como de alto risco, (Apêndice A).

Outro critério de classificação leva em consideração o grau de diferenciação da doença. Descrito inicialmente por Broders em (1920) *apud* Lund *et al.*³⁶. Esta classificação divide os tumores em bem diferenciados, moderadamente diferenciados, pouco diferenciados e indiferenciados. O grau histológico vem sendo modificado e foi simplificado em bem/moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, com implicações nas taxas de sobrevida, recidiva, tempo livre de doença e metástases locorregionais e à distância embora não seja usado na AJCC para definir estadiamento e também não seja utilizado na definição terapêutica. A presença de invasão angiolinfática e perineural têm também grande importância no risco de recidiva locorregional ou à distância, principalmente a última^{27,28,37-39} (Apêndice B).

Pacientes com CECs de pele dificilmente cursam com doença metastática. Menos de 5% de todos os pacientes com neoplasias de pele no território de cabeça e pescoço apresentam metástase linfonodal, geralmente

associada a outros fatores de pior prognóstico, como tumores espessos e invasão perineural. Quando ocorre a metástase linfonodal, as taxas de recidiva podem subir a 35% em algumas séries e a sobrevida global pode cair a até mesmo 53%¹⁰. A classificação TNM dos linfonodos cervicais feita pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* é a mesma utilizada para carcinomas escamocelulares de mucosa do território de cabeça e pescoço, levando em consideração o tamanho e número de linfonodos acometidos e a presença de extensão extranodal^{3,10,40} (Apêndice B).

A presença de metástase à distância, por via hematogênica, é ainda mais rara, aparecendo em 0,4% dos casos e é classificada como M1⁴⁰.

Baseados no TNM, a AJCC criou o estadiamento para câncer de pele em território de cabeça e pescoço, variando de I a IV (Apêndice C).

O CEC de pele apresenta altas taxas de cura, ultrapassando 90% dos casos. Apesar disso, mais de 20.000 pessoas morrem anualmente da doença no mundo, sendo 1.500 só no Brasil^{1,41,42}.

Há várias formas de tratamento para a doença. Os objetivos do tratamento consistem em remoção completa do tumor, manejo da função do órgão ou região acometida e resultado estético adequado. Para isso, tratamentos menos agressivos têm sido amplamente utilizados. Podem ser citadas aqui a eletrocauterização, a curetagem, a radioterapia exclusiva e, mais recentemente, a terapia fotodinâmica. Estas modalidades terapêuticas são reservadas preferencialmente para tumores de baixo risco, pacientes que não desejam cicatriz e para aqueles pacientes com condição clínica desfavorável à abordagem cirúrgica. Elas trazem como desvantagem, a

ausência de definição das margens e de outros fatores prognósticos. Considera-se, portanto, padrão ouro, o tratamento cirúrgico com margens adequadas. Sempre que possível, a congelação durante o ato operatório deve ser executada. Quando houver margens comprometidas tanto durante congelação, quanto tardiamente na análise sob Hematoxilina-eosina, nova operação é normalmente requerida. Esta modalidade garante a cura em aproximadamente 95% dos casos^{15,19,27,31}.

As margens ideais dependem dos critérios de risco recidiva da lesão e da localização do tumor, variando de 4 mm a 9 mm da borda tumoral. Naqueles pacientes com CECs em território de cabeça e pescoço, ou seja, usualmente tumores de alto risco, as margens devem ser definidas de acordo com o seu diâmetro. Tumores com menos de 1,0 cm de diâmetro devem ter margens não menores que 4 mm, para aqueles com diâmetro entre 1 cm e 1,9 cm, margens não menores que 6 mm e para aqueles com diâmetro maior ou igual a 2,0 cm, as margens devem ser idealmente maiores que 8 mm^{18,43,44}.

O tamanho das margens e ressecção incompleta podem ainda variar de acordo com o cirurgião e com o fato de a doença ser ou não uma recidiva. Doença recidivada confere pior prognóstico e exige maiores margens de segurança, idealmente acima de 9 mm. Existem várias técnicas de congelação intraoperatória, desde uma ressecção ampla e com congelação da peça em si ou até mesmo de margens em separado, até cirurgia micrográfica de Mohs, que oferece uma avaliação mais completa e tridimensional das margens, enquanto possibilita a preservação de tecidos normais adjacentes^{18,45}.

A linfadenectomia cervical está indicada para pacientes com acometimento linfonodal enquanto a parotidectomia superficial ou total está indicada quando a doença linfonodal encontra-se dentro desta glândula. A extensão da linfadenectomia depende da área onde o linfonodo se encontra, do tamanho e do número de linfonodos acometidos. Linfadenectomia cervical seletiva é normalmente feita para linfonodo único, com linfonodo menor que 3,0 cm de diâmetro e que se encontra na primeira estação de drenagem do tumor. Para linfonodos em localização incomum, com extensão extranodal ou linfonodos múltiplos, a abordagem mais amplamente utilizada é linfadenectomia cervical radical modificada. Quando localizadas em território de cabeça e pescoço, tumores volumosos e com metástases podem exigir ressecções e reconstruções complexas e com grandes sequelas funcionais e estéticas^{10,46,47} (Figura 3).



Figura 3 - Apresentação clínica de CEC avançado de pele. Fotografias autorizadas para fins acadêmicos [Fonte: acervo pessoal]

A adjuvância é geralmente condicionada aos pacientes com alto risco para recidiva, e a modalidade de escolha é a radioterapia^{10,48}.

A radioterapia adjuvante está reservada para pacientes com tumores com margens comprometidas, incluindo invasão perineural, invasão óssea ou de cartilagens e tumores com presença de metástase linfonodal. Pacientes submetidos a linfadenectomia cervical e/ou parotidectomia superficial total têm indicação de radioterapia adjuvante, havendo comprovação anatomopatológica da presença de células tumorais nos linfonodos (N+). O uso de quimioterapia, tanto com agentes citotóxicos, como cisplatina, quanto com inibidores do receptor de fator de crescimento epitelial, como o Cetuximab, parecem não trazer benefícios claros. Os protocolos de quimioterapia parecem ter melhores resultados quando utilizados para pacientes com doença linfonodal extensa, na presença de extravasamento extracapsular e também naqueles com doença metastática à distância^{13,40,49}.

Modalidades terapêuticas que vêm ganhando força na medicina moderna, inclusive no tratamento de neoplasias malignas, são as terapias imunológicas. A primeira descrição para o tratamento de neoplasias malignas se deu no final do século XIX, quando um cirurgião, Willam Coley inicialmente injetou antígenos bacterianos no interior de sarcomas, evidenciando uma diminuição no seu volume⁵⁰.

O sistema imune apresenta mecanismos de regulação da sua atividade a fim de modular a resposta inflamatória e evitar o dano tecidual inevitável na resposta imune. Esse balanço é feito por meio de um equilíbrio entre sinais estimulatórios e inibitórios⁵¹. Esse mecanismo é importante no combate às infecções, na tolerância ao trauma, no combate a tumores e para evitar doenças autoimunes⁵². Os linfócitos parecem ter um papel mais relevante

na determinação da intensidade da resposta imune, onde o Linfócito T *helper* (CD4⁺) parece ser o “maestro” na imunologia, e o linfócito T citotóxico (CD8⁺) o grande agente reconhecedor dos peptídeos que formam a maioria dos antígenos. A ativação destes linfócitos acontece inicialmente pela apresentação de antígenos como um primeiro sinal, feito pelas células dendríticas apresentadoras de antígeno (APC), por meio do sistema complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Depois disso, geralmente faz-se necessário um segundo sinal, como aquele oferecido pela interação entre CD28, presente nos linfócitos e a família B7, presente nas células dendríticas apresentadoras de antígenos, também estimulatório^{22,50}.

Por outro lado, encontra-se a sinalização negativa, que regula a atividade imune. Este mecanismo é importante para evitar resposta imune exagerada nos processos infecciosos e tem papel importante até mesmo na gravidez^{23,50,53,54}.

Dois autores receberam o prêmio Nobel de medicina em 2018 por descreveram esses mecanismos de sinalização. James P. Allison recebeu o prêmio pelo trabalho em que descreveu, em 1996, a presença de uma proteína na membrana das células T, que funciona como um sinalizador ou imunorreceptor, inibindo a atividade celular, chamado CTLA-4, ou CD152. Esta sinalização negativa tem efeito importante na regulação da atividade inflamatória, mediando a relação entre células do sistema imune e células tumorais. O mecanismo pelo qual esse sinal negativo é dado não está completamente esclarecido, mas sabe-se que o CTLA-4 compete com CD28, sinalizador positivo expresso na membrana celular quando o antígeno é

apresentado por meio do sistema MHC pela célula dendrítica. Esta interação é um dos grandes sinalizadores e mediadores da atividade linfocitária. Embora o CTLA-4 seja expresso na parede do Linfócito CD8⁺, o grande efeito fisiológico parece acontecer com as células CD4⁺, diminuindo a atividade do Linfócito T *helper* e aumentando a atividade inibitória do Linfócito T *reg* (expressa fortemente FoxP3). É preciso lembrar que a atividade linfocitária pode ser medida de várias formas, desde a proliferação celular e liberação de mediadores, como citocinas, até a morte celular programada. O CTLA-4 não parece ter um papel na morte celular programada, restando então, proliferação e liberação de mediadores. Surgiram, então, estudos com o uso de anticorpos que bloqueiam a sinalização negativa, a fim de aumentar resposta imune no combate a infecções e tumores. As Figuras 4 e 5 ilustram as várias formas de interação dos sinalizadores imunes^{21,23,24,55,56}.

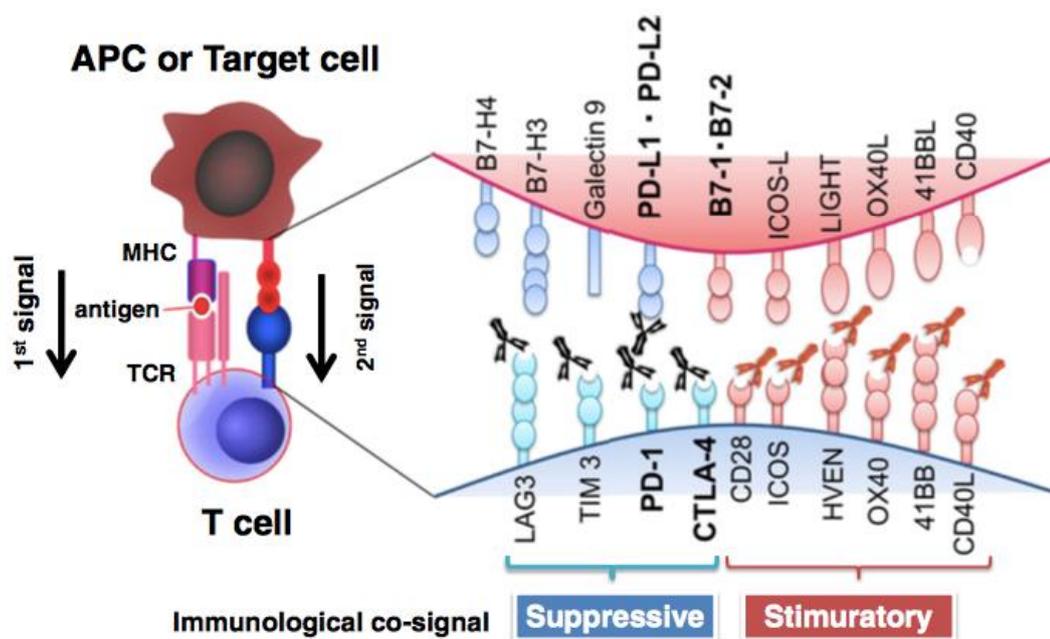


Figura 4 - Representação esquemática das vias de sinalização imune e terapia-alvo anti-PD1 [Fonte: Iwai *et al.*⁵⁰]

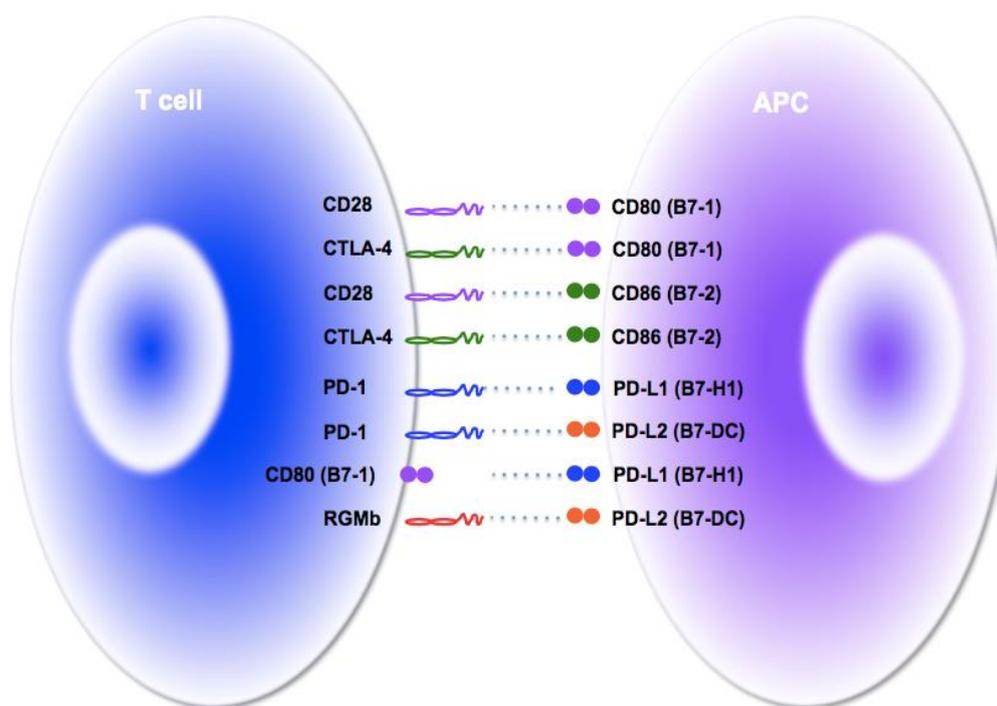


Figura 5 - Representação esquemática da interação de sinais entre as APC e Linfócitos T [Fonte: Pai *et al.*⁵⁴]

O segundo imunorreceptor mais estudado é o PD-1, da família CD28. Apesar do nome, assim como o CTLA-4, ele tem pouca ou nenhuma relação com morte celular programada, tendo maior papel no controle da atividade celular. Descrito inicialmente em 1992, na Universidade de Kyoto, no Japão, também rendeu a Tasuko Honjo, prêmio Nobel de medicina em 2018. O PD-1 é expresso após ativação do linfócito e tem como função limitar a atividade imune. Foi encontrada a presença deste sinalizador em células CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B da periferia, inclusive no citoplasma de linfócitos T regulatórios periféricos, embora seu papel no citoplasma ainda seja incerto^{21,22,50}.

O PD-1 parece estar mais envolvido nas fases mais tardias da resposta imune nos tecidos, longe das regiões de concentração de tecido linfático como timo e linfonodos. É uma proteína transmembrana, com peso estimado de 50-

55 quilodaltons (kDa), com 288 aminoácidos. O DNA responsável pela sua transcrição foi ilustrado na Figura 6. Ele apresenta na sua porção extracelular, um domínio semelhante aos domínios variáveis dos anticorpos (IgV). Até 33% do seu domínio é igual àquele presente na molécula do CTLA-4 e do CD28^{23,57}.

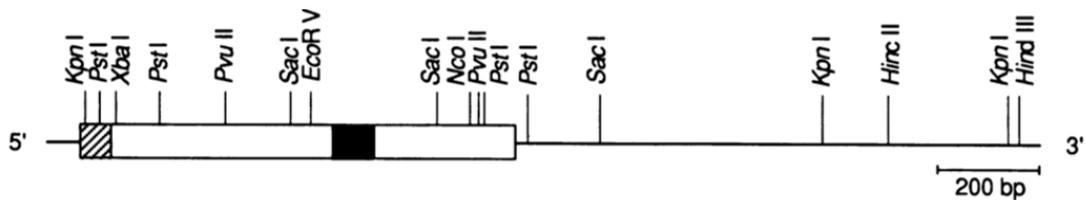


Figura 6 - Representação esquemática do DNA responsável pela formação do PD-1 [Fonte: Ishida *et al.*²²]

Os domínios de imunoglobulina são estruturas moleculares compostas por um número variável de aminoácidos, que varia de 70 até 110, formando duas fitas beta pregueadas e antiparalelas e ligadas por pontes dissulfeto. Esses domínios juntam-se para formar cadeias pesadas e leves de peptídeos, que quando juntos, formam os anticorpos. Os domínios podem ser constantes (IgC), intermediários (IgI) ou variáveis (IgV), sendo que os domínios variáveis são muito importantes para interação com os antígenos. Esses domínios podem ser a base para outras estruturas moleculares no sistema imune, como o próprio sistema MHC e outros mediadores da atividade imunológica, como o CD28 e CTLA-4. Essas estruturas moleculares semelhantes entre si formam as superfamílias Ig e denotam um ancestral imune comum na escala evolutiva⁵⁷.

Já a porção citoplasmática do PD-1 se apresenta com domínios baseados em dois resíduos de tirosina. Um proximal, que consiste num imunorreceptor inibitório de estrutura molecular secundária baseada na tirosina (ITIM), e outro mais longe da membrana, com estrutura molecular secundária de troca (ITSM). Ambas estruturas secundárias deste domínio parecem exercer papel fundamental no efeito inibitório do PD-1. A partir do momento que estão conectados aos ligantes PD-L1 e PD-L2, há uma sinalização negativa. A porção mais distal do domínio promove a desfosforilação, pela ativação da tirosina fosfatase SHP-2, de moléculas efetoras como Syk e PI3K nos linfócitos B e ZAP70 nos linfócitos T, que em última análise, inibem a proliferação e a atividade linfocitária. Exemplo de inibição da atividade é a diminuição na produção de citocinas, como o IFN γ . Naqueles pacientes com linfócitos ativados cronicamente (exaustos), há um aumento gradual da expressão de PD-1 na parede celular destas células^{21,22}. Antígenos exógenos produzidos principalmente por bactérias e macrófagos têm papel importante na diminuição da expressão de PD-1 na parede das células dos linfócitos T e B⁵⁸. Por outro lado, a estimulação com autoantígenos parece aumentar a expressão nos linfócitos, diminuindo danos autoimunes. Ainda existem interrogações sobre todos os mecanismos de ação entre essas sinalizações, sua interação entre as diferentes células e seus efeitos por completo. Por exemplo, não se sabe por que a presença de sinalizadores de perigo como interleucinas 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alpha (TNF α) são incapazes de inibir a expressão de PD-1, enquanto que a interleucinas 4 (IL-4), sinalizadores de resposta antigênica autógena diminuem sua expressão^{21,22,58}.

O PD-1 se liga a duas moléculas muito semelhantes entre si, PD-L1 (B7-H1) e PD-L2 (B7-DC). Essas duas moléculas pertencem à superfamília B7, que ainda têm B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Elas são glicoproteínas transmembrana com domínios externos tipo IgC e IgV. Essas glicoproteínas compartilham 20% dos aminoácidos dos ligantes do CTLA-4, B7-1, B7-2 e PD-L1, enquanto o PD-L1 e PD-L2 compartilham 40% dos aminoácidos entre si. Quando comparados com roedores, compartilham até 70% dos aminoácidos com aqueles presentes na espécie humana, comprovando um papel importante na modulação do controle da resposta imune na evolução das espécies. Essas moléculas têm uma pequena porção citoplasmática sem domínio evidente, o que pressupõe a ausência de transdução de sinais no interior das células que as expressam, apesar de alguns estudos demonstrarem um sinal estimulatório em células dendríticas, promovendo aumento da apresentação de antígenos nas mesmas^{21,57}.

Apesar de poder se ligar ao CD80 e ao CD86, cujos sinais são estimulatórios, o papel final do PD-1 é inibitório. Tanto PD-L1 quanto PD-L2 estão presentes em células T, B, células dendríticas, macrófagos pulmonares, células renais, coração e placenta. Estão ausentes no cérebro. A expressão de PD-L2 é predominante nas células apresentadoras de antígenos e algumas células tumorais. A interação tridimensional entre essas moléculas é demonstrada na Figura 7^{21-23,59}.

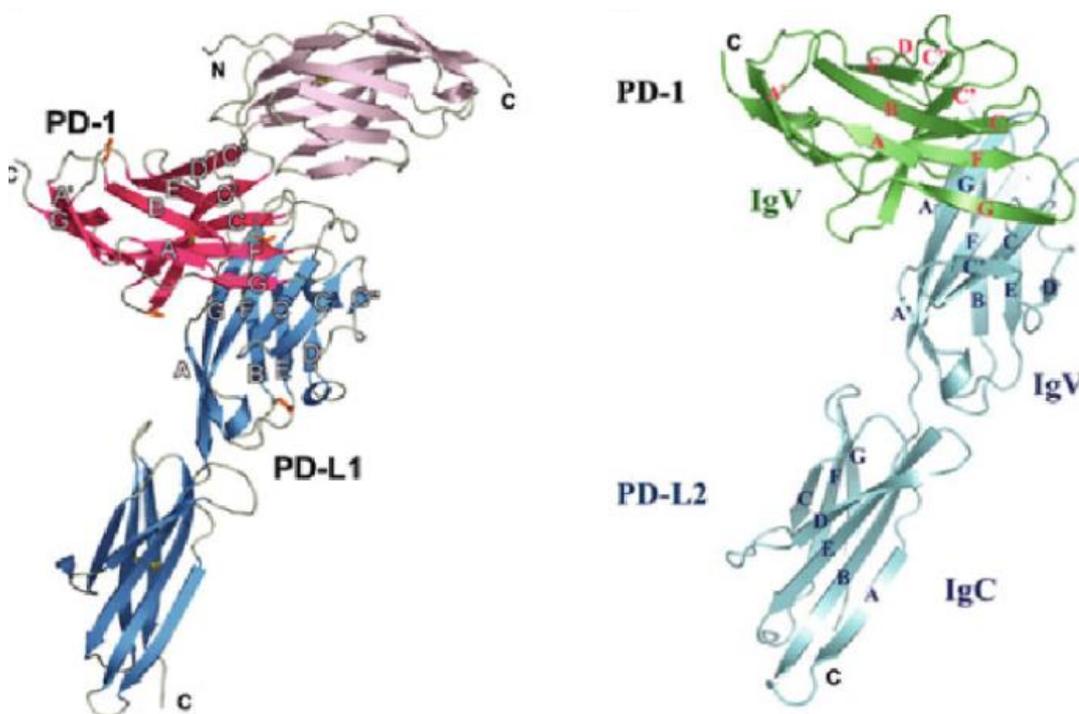


Figura 7 - Ilustração da estrutura tridimensional das moléculas de PD-L1, PD-L2 e sua interação com PD-1 [Fonte: Lin *et al.*⁶⁰]

O PD-1 está muito presente nos linfócitos T *reg* do processo inflamatório na periferia dos tumores e reflete um infiltrado tumoral importante por células CD4⁺; quando expresso em CD8⁺, reflete um estado de anergia ou exaustão. A presença de interação PD-1/PD-L1 interfere na proliferação dos linfócitos CD8⁺, assim como na sua atividade citotóxica. Esta interação já foi descrita em vários tumores como melanoma maligno, tumores de origem pulmonar e carcinomas de células renais^{21-23,54-56}.

A expressão do PD-L1 pode ser inata, chegando a até 10% dos casos, ou adaptativa, envolvendo aspectos epigenéticos e de transcrição, presentes tanto nas células tumorais quanto nos infiltrados linfocitários peritumorais. O microambiente tumoral pode ainda aumentar a expressão de PD-L1 por meio de moléculas como interleucinas e interferon^{3,22,23,54,59}.

A presença do PD-L1 ainda pode ser medida de acordo com o percentual de células que expressam a molécula, assim como a quantidade de expressão na parede delas. A simples expressão dos *immune checkpoints*, assim como sua quantidade, sua concentração e sua relação com o infiltrado inflamatório, têm sua relação com prognóstico e repostas aos seus bloqueadores a ser esclarecida^{55,56,58,61-65}.

Baseado no recente sucesso do tratamento com as terapias-alvo, já descritos para carcinomas de células escamosas de mucosa em cabeça e pescoço, neoplasias de pulmão não-pequenas células, carcinomas de células renais e para melanomas malignos, com várias drogas em uso na prática clínica diária, com resultados excelentes, inclusive para doença estágios III e IV, e muitas outras em estudo, surgiu o interesse em avaliar esta via no controle do carcinoma escamocelular de pele de alto risco. Tenta-se ainda, estabelecer a presença de células CD8⁺ e sua relação com a concentração de imunorreceptores e sua localização específica dentro do microambiente tumoral^{3,53,66-68}.

4 MÉTODOS

O estudo teve aprovação do Comitê de Ética para Análise em Projetos de Pesquisa (CAPPesq, protocolo de pesquisa nº 2.022526), com envio ao Comissão Nacional de ética em Pesquisa (CONEP) com registro CAAE número 55131416.0.0000.0065, e número do parecer número 1.635.269, cuja área temática é pesquisa com coordenação originados no Estado de São Paulo em cotutela na Universidade de Harvard (Anexo A). Os fundos para execução do projeto são originados dos gastos cotidianos de ambas as instituições.

Foi realizada revisão de prontuários médicos de pacientes atendidos por carcinomas de células escamosas em território de cabeça e pescoço, com risco aumentado no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), no serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, entre janeiro de 2010 e dezembro de 2016. Foram utilizados os seguintes dados:

- Identificação do paciente: gênero, idade ao diagnóstico e data da operação.
- Características clínicas: topografia do tumor primário.
- Características anatomopatológicas: tipo histológico, tamanho, espessura, invasão angiolinfática, invasão perineural, margens, invasão de cartilagem/óssea, metástase linfonodal e metástase hematogênica.
- Desfecho: tempo livre de doença e sobrevida global.

Após levantamento dos registros hospitalares, 120 casos foram elegíveis. Por problemas administrativos e de identificação cadastral, 46 pacientes foram inicialmente selecionados a fazerem parte do estudo. O departamento de Patologia do ICESP selecionou os blocos de parafina com presença de tumor e fez duas lâminas para cada caso, que foram posteriormente revisadas pelo médico patologista da instituição norte-americana. Essas lâminas foram encaminhadas ao *Massachusetts General Hospital*, pertencente à Universidade de Harvard, para análise.

4.1 Imunofluorescência

A lâminas foram desparafinadas com xileno por 10 minutos por duas vezes e desidratadas no álcool em soluções graduais de etanol. Duas vezes em etanol a 100% por 5 minutos, uma vez com etanol 95% por 5 minutos, uma vez com etanol 90% por 5 minutos, uma vez com etanol 80% por 5 minutos, uma vez com etanol 70% por 5 minutos e finalmente com água destilada por duas vezes por 5 minutos. Todas as lâminas foram submetidas a uma preparação com solução de alto pH (9,0), induzidas pelo calor de alta pressão denominada Envision FLEX target Retrieval solution (DAKO, Gloustrup, Dinamarca) a 120° Celsius por 20 minutos e peroxidases endógenas foram suprimidas pela incubação em peróxido de hidrogênio a 3% por sete minutos de acordo com orientação do fabricante (DAKO, An Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Os anticorpos utilizados na imunofluorescência estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Lista de anticorpos utilizados na imunofluorescência

Anticorpo	Doador	Empresa	Catálogo	Clone	Concentração
PDL-1	Coelho	Cell Signaling	13864	E1L3N®	1:200
PDL-2	Coelho	Cell Signaling	82723	D7U8C®	1:200
PD-1	Rato	Cell Signaling	43248	EH33®	1:200
CD8 ⁺	Coelho	AbCam	Ab4055	POLICLONAL	1:200

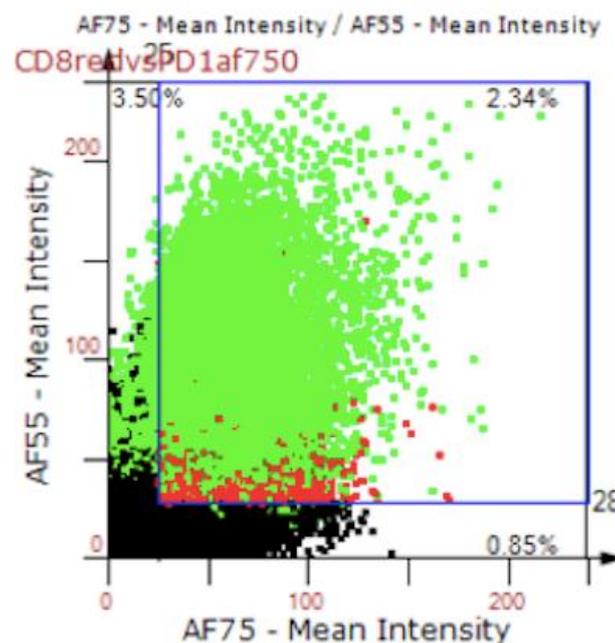
Os anticorpos foram diluídos num diluente específico (DAKO, An Agilent Technologies, Santa Clara, CA), incubados numa câmara umidificada por um período que variava de uma hora a uma noite num ambiente a 4^o Celsius dependendo do anticorpo utilizado. Anticorpos secundários originados de cabra foram utilizados para se ligarem aos anticorpos primários. A ligação antígeno/anticorpo foi visualizada e amplificada pela aplicação do sistema de polímero FLEX+ (DAKO, An Agilent Technologies, Santa Clara, CA), que permite várias análises numa mesma amostra. O sinal foi amplificado pelos Kits de magnificação com tiramida de anticorpos secundários denominados AlexaFluor 488 (verde), AlexaFluor 555 (laranja) e AlexaFluor 647 (vermelho), Invitrogen, Carlsbad, Califórnia. O sinal foi também magnificado com AlexaFluor 750 (bordô) conjugado com anticorpo anti-coelho IgG, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. Os núcleos foram visualizados pelo reagente Prolong Diamond Antifade com 4',6-diamidino-2-phenylindole (azul-DAPI), Invitrogen, Carlsbad, Califórnia.

4.2 Microscopia e Análise

A imagens de imunofluorescência foram obtidas pelo microscópio de epifluorescência Zeiss 20X Axio Imager Z2. As imagens foram capturadas por uma objetiva plano-apocromática Zeiss 20x (0,5NA) por meio de um sistema de captura de imagens das lâminas chamado TissueFAXS (TissueGnostics, GmbH, Viena, Áustria). Este sistema identifica e une as partes de tecido nas lâminas, excluindo as partes de artefatos e ausência tecidual. A análise foi feita utilizando o *software* TissueQuest (TissueGnostics, Viena, Áustria), que identifica células por meio da coloração por DAPI dos núcleos das células e interposição de intensidade destes sinais. Partindo do núcleo, o *software* calcula uma distância específica de 10 μm de forma radial por meio do citoplasma da célula até o seu limite celular, que são coradas acima de um limiar mínimo de intensidade de coloração determinado por bases de amostras de controles não específicas, detectando cada canal de fluorescência e criando uma máscara para cada padrão. A partir daí procurou-se a presença de PD-1, PD-L1, PD-L2 e CD8⁺ em cada uma das células detectadas nas lâminas. A intensidade da imunofluorescência foi determinada para cada célula, baseada na média de pixels presentes em toda superfície desta célula utilizando uma escala de cinza de 8-bits. Para determinar a positividade da imunofluorescência, limiares mínimos foram determinados a partir de amostras controle não específicas para cada canal de análise. Números totais de células, intensidade média de sinal do tecido, percentual de células positivas para os marcadores em questão, colocalização dos marcadores e densidade de células positivas foram obtidos pela plataforma

de análise do TissueQuest. Portões foram criados em gráficos de dispersão para células duplamente positivas e depois comparadas em todas as combinações de marcadores para definição a que grupo pertenciam. O computador calcula ainda interposição de sinais nos diferentes espectros de cor a fim de diminuir sobreposição dos dados (Gráfico 1). Colocalização se define a proximidade dos sinalizadores a uma distância de 10 μm , ou seja, o raio da célula, fazendo com que esses marcadores pertençam à mesma célula ou estejam em íntimo contato. As Figuras 8 a 17 ilustram os resultados de imunofluorescência obtidos pelo microscópio, tanto nas suas unidades quanto na soma das imunofluorescências. As figuras tentam facilitar o entendimento de como o computador captura essas imagens e calcula a colocalização dos sinalizadores em questão.

Gráfico 1 - Intensidade de sinal das cores e suas sobreposições e área a ser considerada positiva em metodologia de imunofluorescência aplicada em série de carcinomas escamoelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016



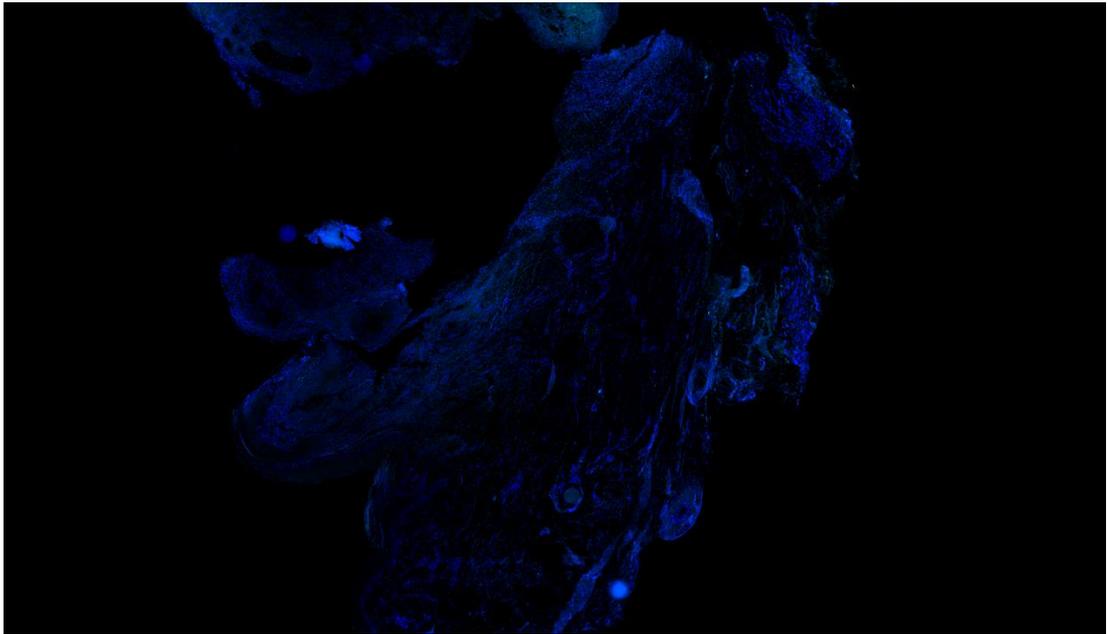


Figura 8 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pela coloração **DAPI**

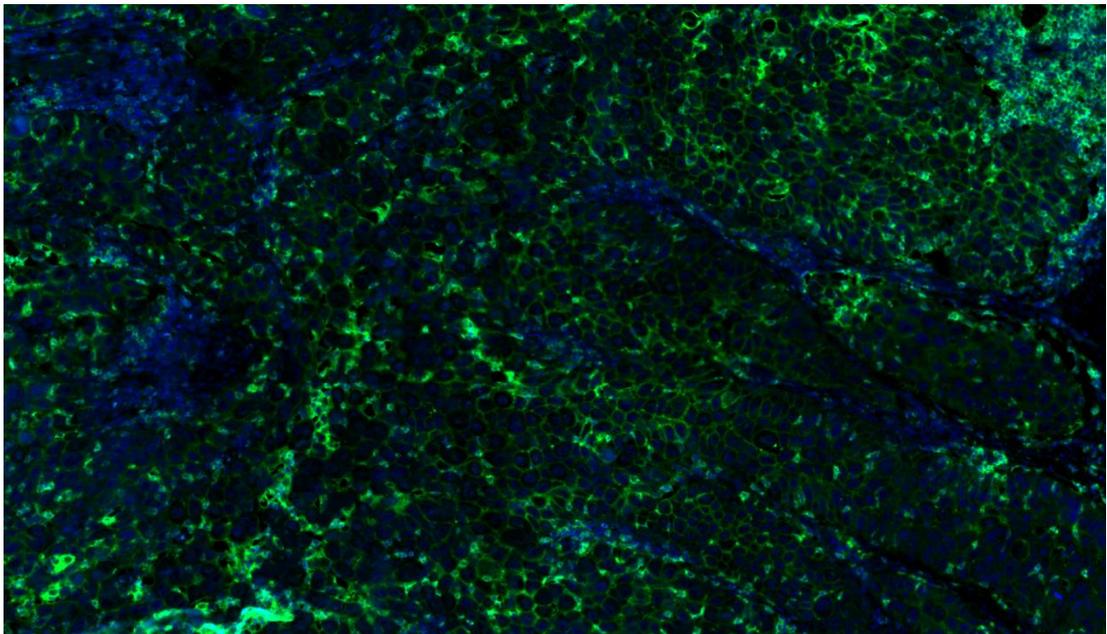


Figura 9 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações **PDL-1** e **DAPI**

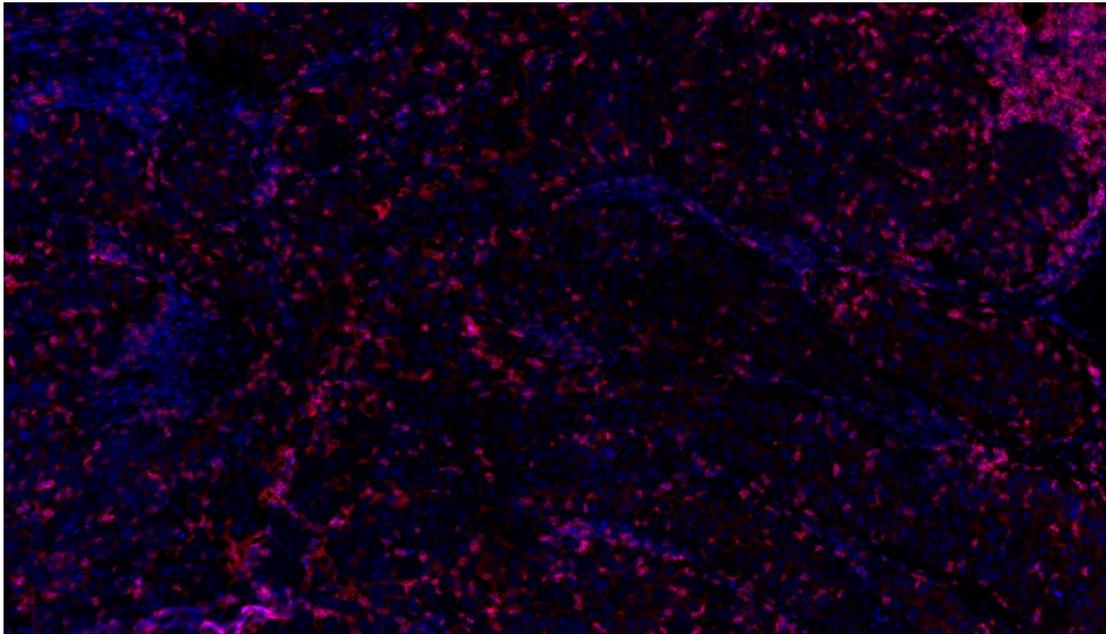


Figura 10 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações **CD8+** e **DAPI**

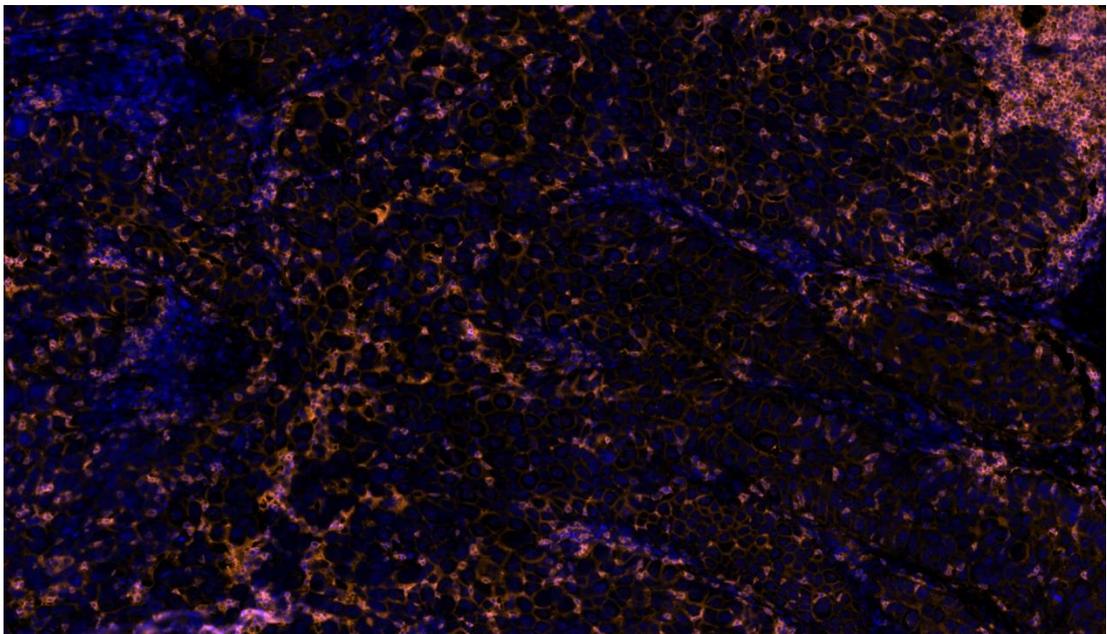


Figura 11 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações **PDL-2** e **DAPI**

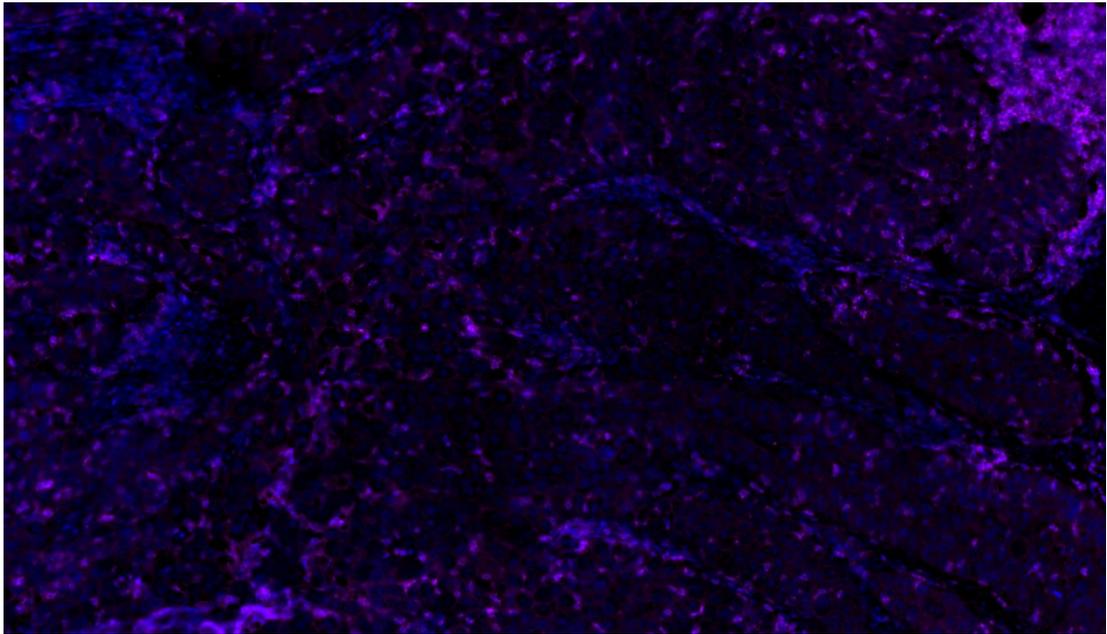


Figura 12 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PD-1 e DAPI

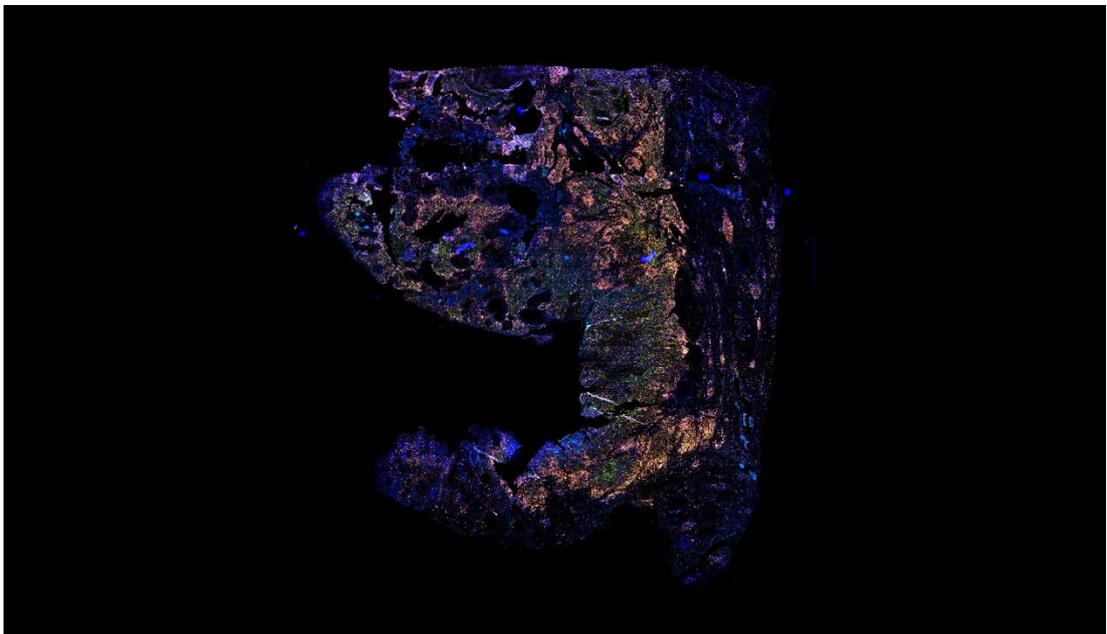


Figura 13 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações PDL-1, CD8+, PDL-2, PD-1 e DAPI

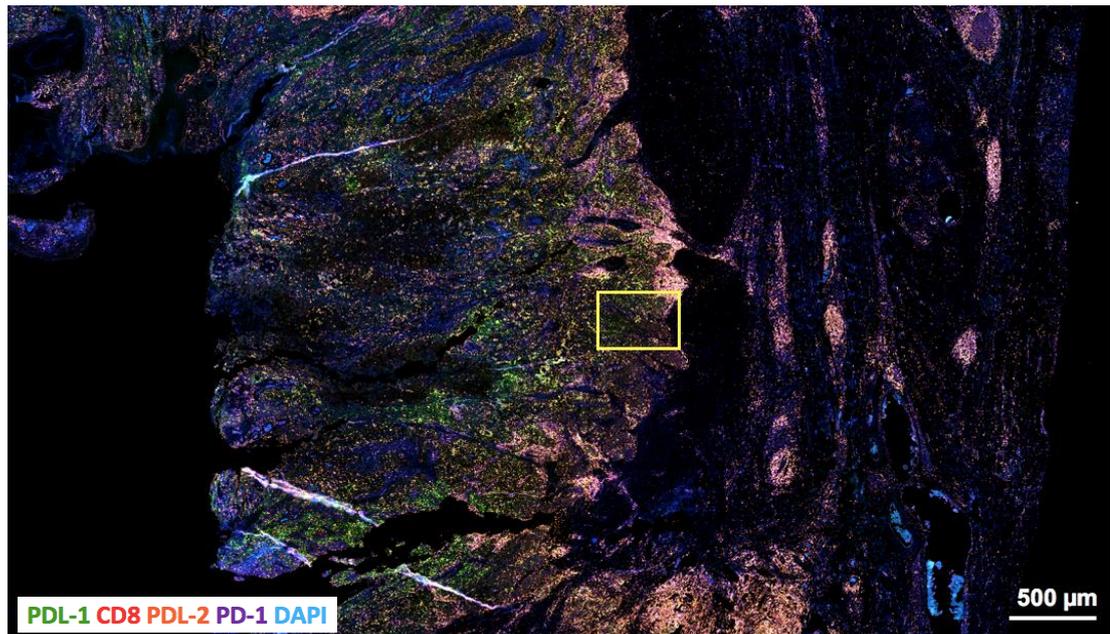


Figura 14 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações **PDL-1**, **CD8⁺**, **PD-L2**, **PD-1** e **DAPI**

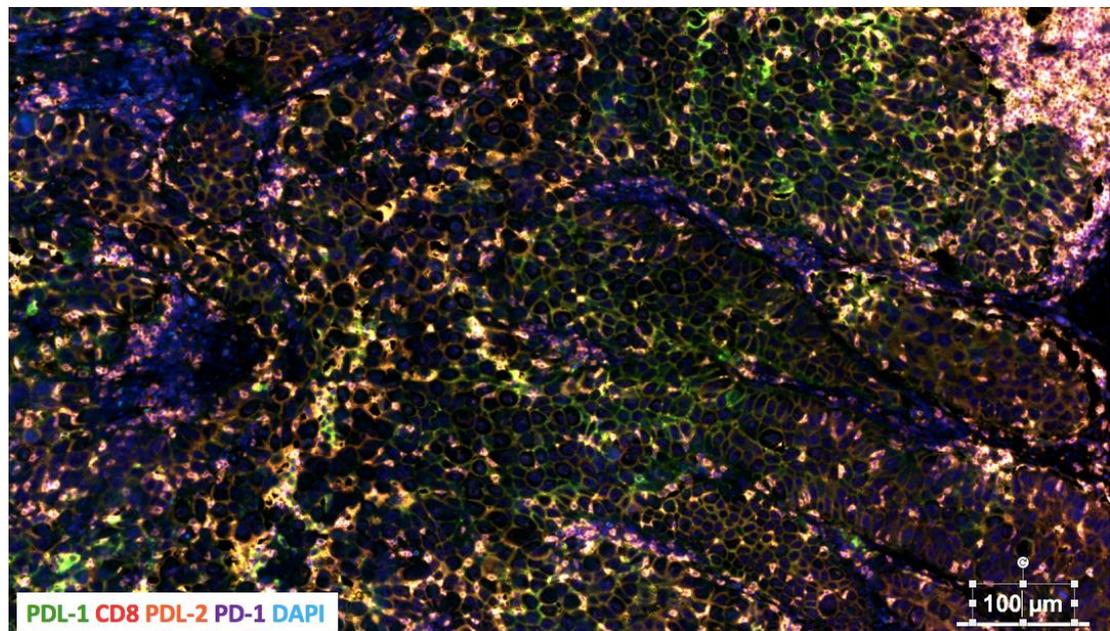


Figura 15 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações **PDL-1**, **CD8⁺**, **PD-L2**, **PD-1** e **DAPI**

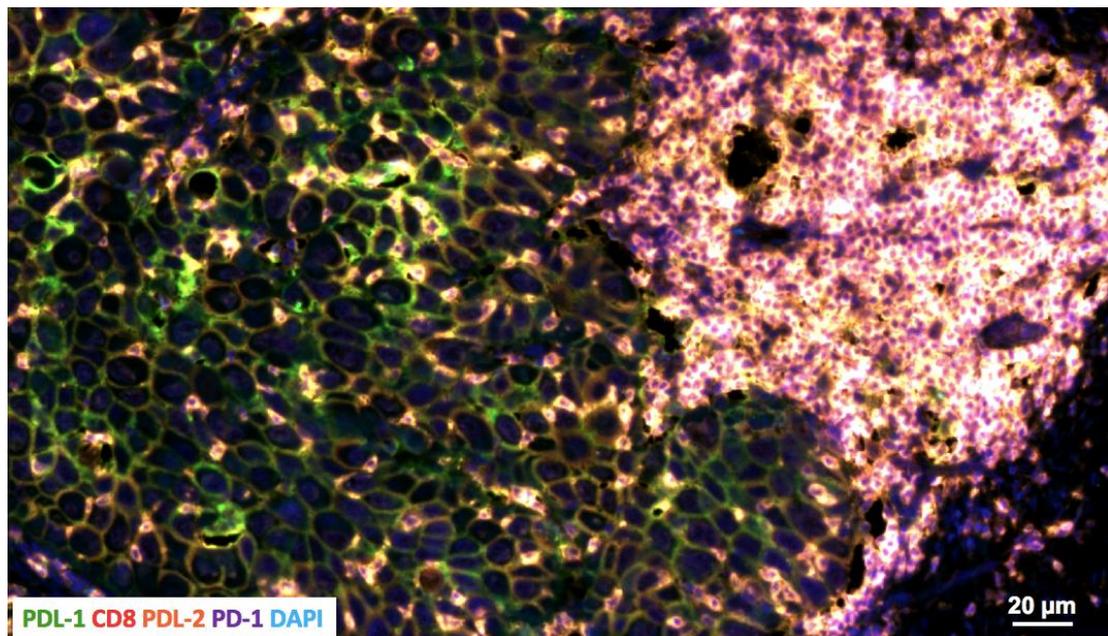


Figura 16 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações **PDL-1**, **CD8⁺**, **PDL-2**, **PD-1** e **DAPI**

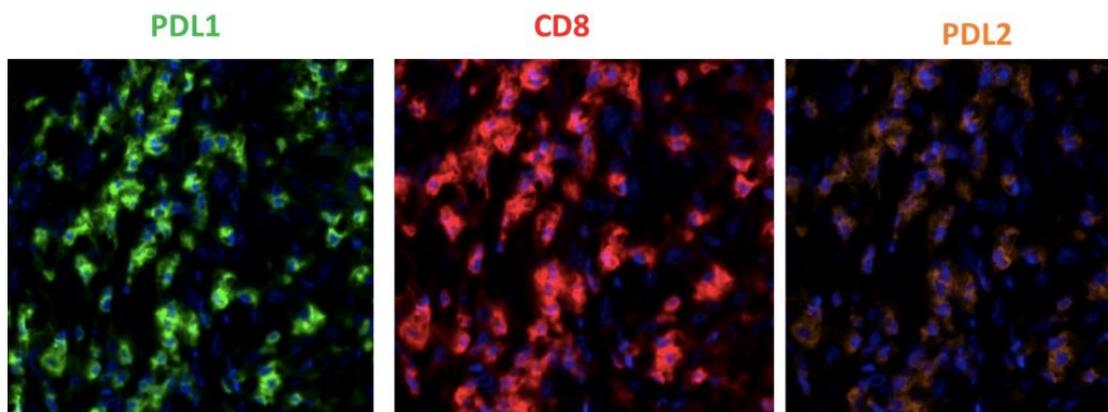


Figura 17 - Fotomicroscopia de caso 17 da série de carcinomas escamocelulares cutâneos preparados com imunofluorescência pelas colorações **PD-L1**, **CD8⁺** e **PD-L2**

4.3 Análise Estatística

Os valores obtidos pelo estudo de cada variável quantitativa foram organizados e descritos pela média, mediana e desvio padrão. Para as qualitativas, foram utilizadas frequências absolutas e relativas. O método de regressão de Cox com cálculos da relevância estatística ($p < 0,05$), do risco relativo (RR) e do respectivo intervalo de confiança de 95% (IC95%) foram empregados nesta análise.

Os valores de corte das variáveis contínuas para óbito e recorrência foram determinados por análise de curva *receiver operator characteristics* (ROC), por meio do índice de Youndex.

Em todas as análises foi utilizado o programa estatístico SPSS® versão 24.0 (SPSS® Inc; Ilinois, EUA) e em todas as comparações adotou-se nível de significância estatística inferior a 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Foram incluídos 46 pacientes com carcinomas de células escamosas cutâneos de alto risco em território de cabeça e pescoço. A amostra apresentava 35 (76,0%) homens e 11 (24%) mulheres. As idades variaram entre 48 e 96 anos com média de 70,39, mediana de 70,00 e desvio padrão de 11,69.

Múltiplas localizações foram encontradas, sendo elas as regiões descritas como: cervical (1), lábio (7), orelha (3), frontal (1), couro cabeludo (13), temporal (2), pré-auricular (12) e zigomática (7). Todos os pacientes apresentaram espessura acima de 2 mm e 26 (59,1%) pacientes apresentaram espessura maior ou igual a 10 mm. A espessura máxima encontrada foi de 55 mm, com média de espessura de 175 mm, mediana de 130 e com desvio padrão de 139. Em dois pacientes, não foi possível definir espessura total por motivo de invasão óssea. Não foi encontrada significância estatística para espessura na tentativa de prever risco de recidiva ($p = 0,330$, IC95% entre 0,219 e 1,667) ou morte ($p = 0,396$, IC95% entre 0,208 e 1,862).

Dezenove (41,3%) pacientes apresentavam invasão perineural, mas não houve significância estatística ao se estratificar risco de óbito ou recorrência para esta variável ($p = 0,261$, IC95% entre 0,598 e 11,803).

De acordo com a classificação do TNM, obteve-se o resultado exposto nas Tabelas 1 e 2. Tumores localmente mais avançados (T3 e T4) foram detectados em 43,5% dos casos.

Tabela 1 - Estadiamento T referente à casuística de pacientes operados por CECs cutâneos de cabeça e pescoço entre 2010 e 2016

Tumor	Frequência	%
1	8	17,4
2	18	39,1
3	17	37,0
4	3	6,5
Total	46	100,0

Tabela 2 - Estadiamento linfonodal referente à casuística de pacientes operados por CECs cutâneos de cabeça e pescoço entre 2010 e 2016

Metástase linfonodal (N)	Frequência	%
0	37	80,4
1	4	8,7
2	5	10,9
Total	46	100,0

A presença de metástase linfonodal ocorreu em 9 (19,6%) pacientes, enquanto a presença de metástases à distância ocorreu em 2 (4,3%) dos pacientes, como demonstra a Tabela 2.

Dos 46 pacientes, 15 (32,6%) cursaram com recorrência da doença enquanto 14 evoluíram para óbito (30,4%) no período. Pacientes foram seguidos por um período mínimo de um mês e máximo de 99 meses. A média foi de 45,52 meses, a mediana foi 44,50 meses e o desvio padrão de 27,62 meses. Quando analisados os pacientes que evoluíram com recorrência da doença, a média de tempo para o evento foi de 37,91 meses, com mediana

de 33 meses e desvio padrão de 28,83 meses. A média de tempo para morte foi de 30,07 meses, mediana de 30 meses e desvio padrão de 18,2 meses.

Ao serem avaliadas as expressões e colocalizações dos imunorreceptores (*immune checkpoints*) nesta análise, os resultados foram divididos em duas categorias:

- Expressão de PD-1, PD-L1, PD-L2 e CD8⁺ e suas colocalizações em todo o tecido.
- Expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e suas colocalizações no infiltrado inflamatório tumoral habitado por CD8⁺.

As expressões individuais dos imunorreceptores (*immune checkpoints*) e suas colocalizações tiveram como pontos de corte adotados os valores acima de 1%, 20% e 50% de expressão nas amostras. Nesses pontos de referência, assim como no ponto de corte estabelecidos pela curva ROC, que define o ponto de maior relevância estatística, calculou-se a significância estatística (p), o risco relativo e o intervalo de confiança (IC95%) para óbito e recorrência em cada uma das variáveis, tanto no tecido total, quanto no ambiente habitado por CD8⁺.

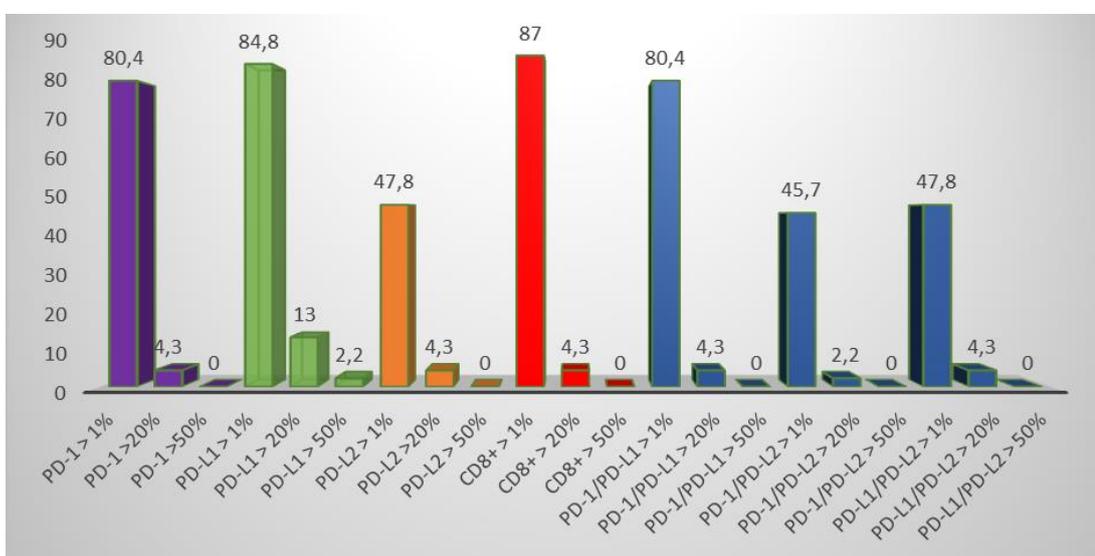
5.1 Expressão de PD-1, PD-L1, PD-L2 e CD8⁺ e suas colocalizações em todo o tecido

Quando analisado o tecido inteiro, identificadas como células marcadas pelo DAPI, trinta e sete amostras (80,4%) apresentavam expressão maior que 1% de PD-1. Somente dois (4,3%) pacientes, apresentavam expressão superior a 20% e nenhum apresentou expressão maior do que 50%. Trinta e nove (84,8%) pacientes apresentaram expressão de PD-L1 em mais de 1% das células, seis (13%) apresentaram expressão maior que 20% e apenas um (2,2%) apresentou expressão superior a 50%. Obteve-se 22 (47,8%) pacientes com expressão maior ou igual a 1% de PD-L2, dois (4,3%), com expressão superior a 20% e nenhum com expressão maior que 50%. Todas as amostras apresentaram a expressão de CD8⁺ e algum grau. Destas, 40 (87%) amostras mostraram expressão maior que 1%, duas (4,3%) mostraram presença de CD8⁺ em mais de 20% da amostra e nenhuma delas mostrou incidência maior que 50%.

Ao tentar estabelecer um padrão de colocalização de expressão destes imunorreceptores, encontramos a presença de PD-1/PD-L1 em mais 1% das células em 37 (80,4%) amostras. Em duas (4,3%), esta colocalização apareceu em mais de 20% das células e em nenhum paciente, ultrapassou 50%. Vinte e um pacientes (45,7%) tinham na sua amostra tumoral a presença de colocalização entre PD-1/PD-L2 sendo expressa em mais de 1% das células. Uma amostra (2,2%) apresentou essa expressão em mais de 20% das células e nenhuma delas em mais de 50% das mesmas. Na análise de colocalização entre PD-L1/PD-L2, foi encontrada essa presença em 22

(47,8%) pacientes quando o número mínimo exigido de expressão era acima de 1%. Apenas dois pacientes expressavam colocalização quando acima de 20% das células eram coradas e nenhum paciente quando acima de 50% (Gráfico 2).

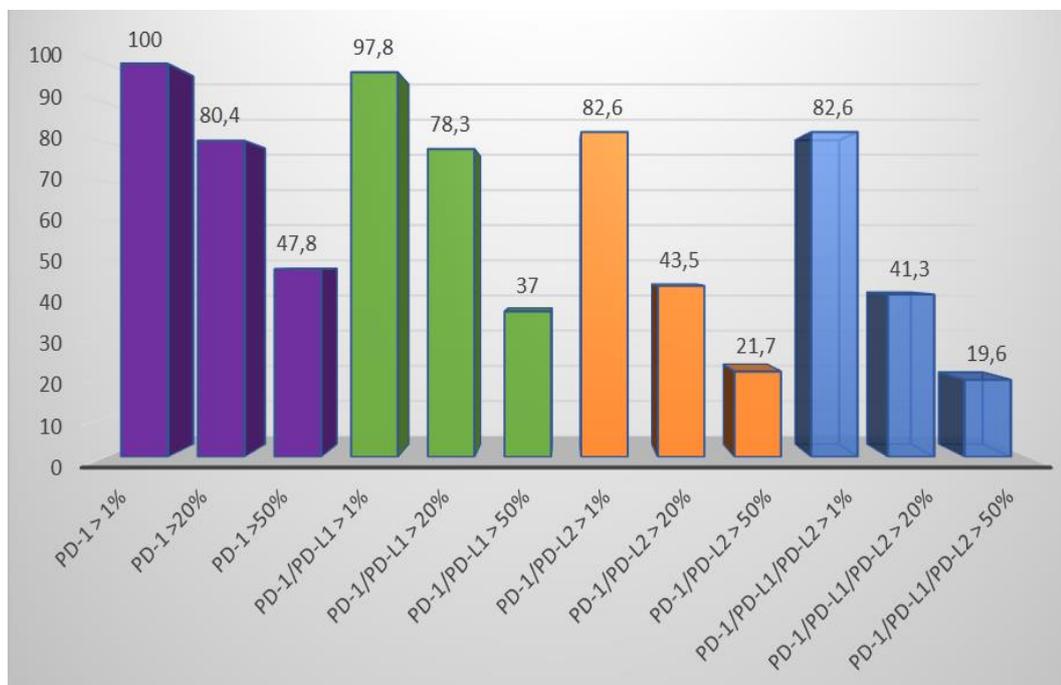
Gráfico 2 - Porcentagem de amostras com expressão dos imunorreceptores e suas colocalizações no tecido tumoral de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016



5.2 Expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e suas colocalizações no infiltrado inflamatório tumoral habitado por CD8⁺

Ao se analisar o ambiente tumoral das amostras povoadas somente pelos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), foram encontrados dados diferentes. Todas as amostras (100%) tinham, em seu subsítio corado pelo CD8⁺, a expressão de PD-1 em pelo menos 1% das células. Trinta e sete (80,4%) amostras tinham mais de 20% das células expressando PD-1 e 22 (47,8) amostras apresentavam expressão em mais de 50% das células. A interação PD-1/PDL-1 neste ambiente acontece em 45 (97,8%) pacientes em mais de 1% das células das amostras estudadas. Em 36 pacientes, essa colocalização de expressão aconteceu em mais de 20% das células e em 17 (37%) casos, mais de 50% das células apresentavam esta característica. Trinta e oito (82,6%) amostras apresentaram colocalização de PD-1/PD-L2 em mais de 1% das células. Vinte (43,5%) lâminas apresentam colocalização em mais de 20% das células e 10 (21,7%) a apresentaram em mais de 50% das células. Ao avaliar a presença simultânea de PD-1/PD-L1/PD-L2 neste microambiente, foi encontrada em mais de 1% das células em 38 (82,6%) amostras. Dezenove (41,3%) amostras mostraram essa expressão em mais de 20% das células. Nove (19,6%) amostras expressam simultaneamente em mais de 50% das células (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Porcentagem de amostras com expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e suas colocalizações no infiltrado inflamatório habitado pelo CD8+ observado em série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016



Dos fatores prognósticos clássicos, a variável T4 ($p = 0,068$; RR = 6,241; IC95% entre 0,874 e 44,580), foi a que mais mostrou significância estatística ao prever chances de recidiva locorregional. Tanto a classificação T4 ($p = 0,04$; RR = 31,827; IC95% entre 3,009 e 336,588), quanto a presença de metástase à distância ($p = 0,039$; RR = 5,257; IC95% entre 1,087 e 25,428), foram as variáveis de maior impacto também para óbito. Esses padrões estão demonstrados nas curvas de Kaplan Mayer, representadas nos Gráficos 4 a 6. As outras variáveis como idade, gênero, espessura, metástase linfonodal e invasão perineural não apresentaram relevância estatística na amostra, como mostrados nas Tabelas 3 e 4.

Gráfico 4 - Curva de Kaplan Meyer: ocorrência de recidiva tumoral de acordo com estadiamento T de série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 (p = 0,068)

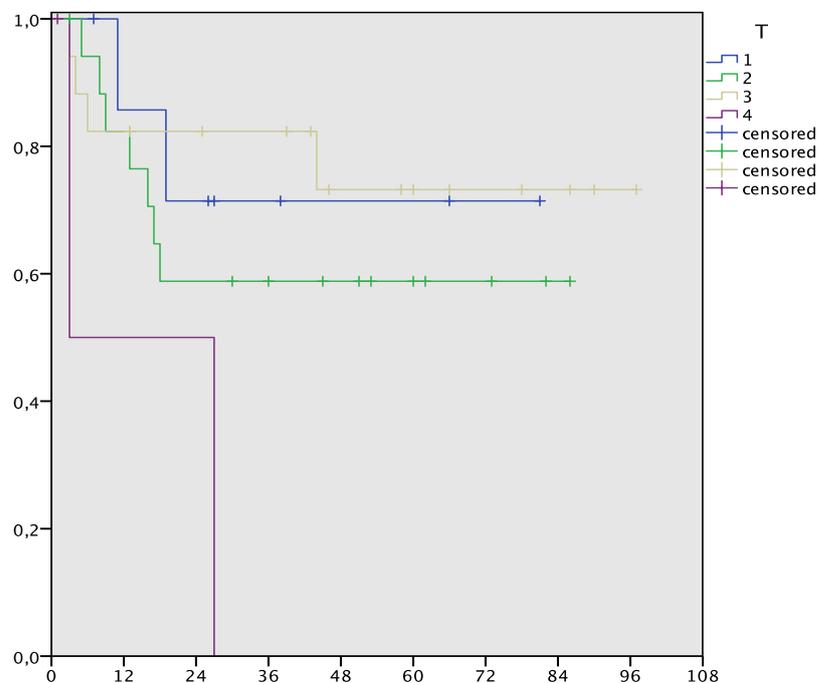


Gráfico 5 - Curva de Kaplan Meyer: ocorrência de óbito de acordo com estadiamento T de série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 (p = 0,032)

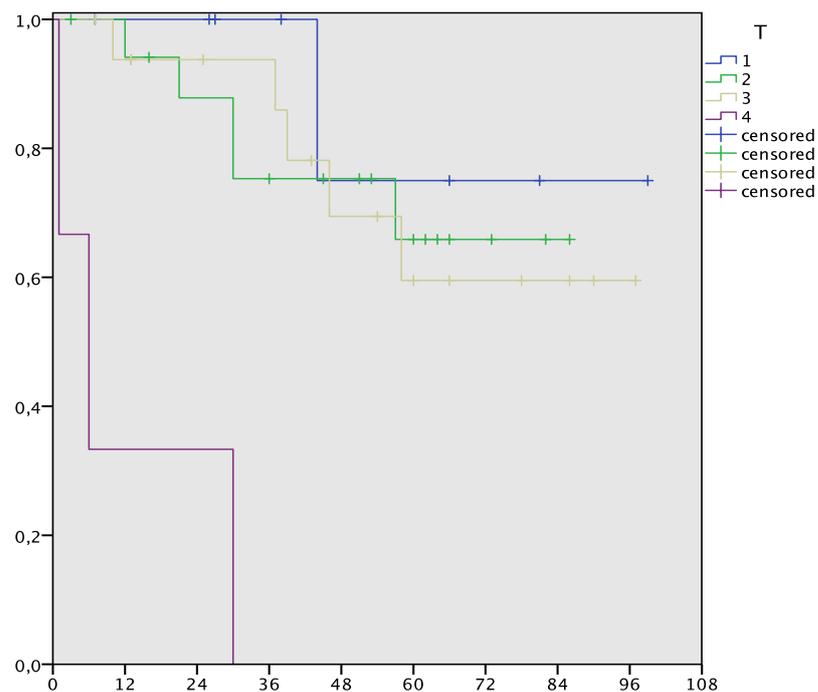


Gráfico 6 - Curva de Kaplan Meyer: ocorrência de óbito de acordo com o aparecimento de metástase à distância durante seguimento de série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 (p = 0,039)

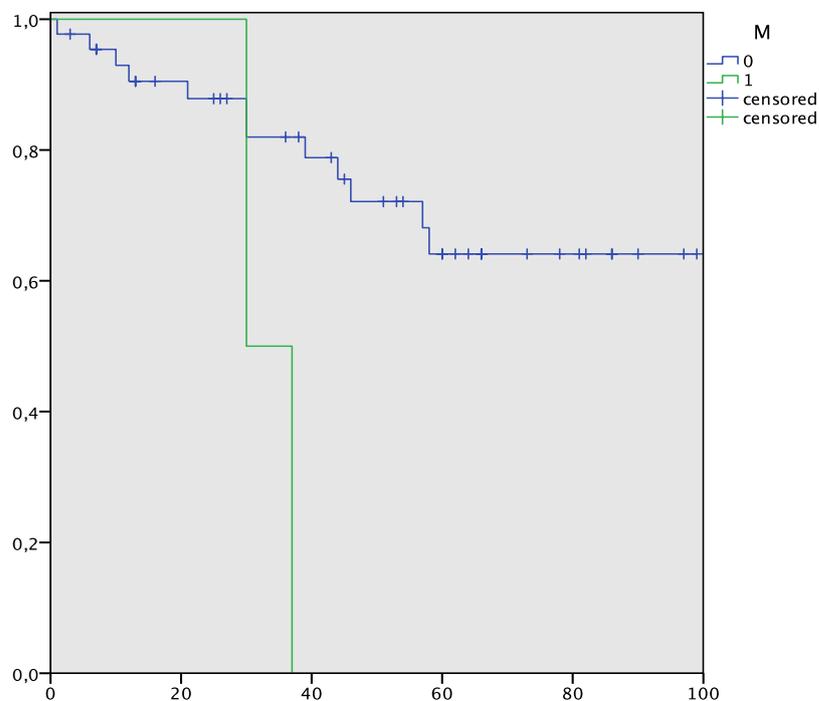


Tabela 3 - Características clinicopatológicas clássicas e relação com risco de recidiva dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016

Variável	Valor P	RR	IC95% inferior	IC95% superior
<i>T1</i>	-	-	-	-
<i>T2</i>	0,558	1,601	0,332	7,723
<i>T3</i>	0,926	0,923	0,168	5,054
<i>T4</i>	0,068	6,241	0,874	44,580
<i>T (T3/T4)</i>	0,864	0,914	0,325	2,570
<i>N0</i>	-	-	-	-
<i>N1</i>	0,711	1,328	0,296	5,944
<i>N2</i>	0,546	0,534	0,069	4,108
<i>N (+)</i>	0,853	0,887	0,250	3,146
<i>M</i>	0,032	5,144	1,146	23,082
<i>Espessura (> 1,0)</i>	0,330	0,604	0,219	1,667
<i>Invasão Perineural</i>	0,261	0,519	0,165	1,630
<i>AGE (> 60)</i>	0,199	2,658	0,958	11,803
<i>SEX (M)</i>	0,711	1,271	0,358	4,512

Tabela 4 - Características clinicopatológicas clássicas e relação com risco de óbito dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016

Variável	Valor P	RR	IC95% inferior	IC95% superior
T1	-	-	-	-
T2	0,540	1,957	0,228	16,770
T3	0,492	2,125	0,248	18,202
T4	0,004	31,827	3,009	336,588
T (T3/T4)	0,224	1,929	0,669	5,562
N0	-	-	-	-
N1	0,916	0,895	0,116	6,928
N2	0,583	0,564	0,073	4,352
N (+)	0,630	0,692	0,155	3,097
M	0,039	5,257	1,087	25,428
Espessura (> 1,0)	0,396	0,622	0,208	1,862
Invasão Perineural	0,583	1,346	0,466	3,888
Idade (> 60)	0,252	2,409	0,536	10,835
Sexo (M)	0,634	0,754	0,236	2,412

Na tentativa de estabelecer uma conexão entre os imunorreceptores e desfecho clínico dos pacientes, definidos como recidiva locorregional e morte, aplicou-se o método de regressão COX naqueles pontos de corte estabelecidos como > 1%, > 20% e > 50%, assim como nos pontos de corte estabelecidos pela curva ROC. O melhor ponto de corte foi calculado para todos os *immune checkpoints* e suas colocalizações, tanto na amostra de tecido total, quanto nas porções povoadas pelos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺).

Ao definir chances de recidiva e sobrevida global, não foi encontrado valor significativo (< 0,05) para nenhuma das variáveis. Variáveis mais promissoras são PD-1 \geq 5,426% (p = 0,091; RR = 2,444; IC95% entre 0,867 e 6,893) e a colocalização PD-1/PD-L1 \geq 3,345% (p = 0,054; RR = 2,892; IC95% entre 0,983 e 8,505) para todo o tecido e relacionadas ao risco para recidiva, como definidas nas Tabelas 5 e 6, e ilustrados nos Gráficos 7 e 8.

Tabela 5 - Risco de recidiva de acordo com expressão de imunorreceptores e suas colocações no tecido total dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016

	Valor - P	RR	IC 95% inferior	IC95% superior
%PD-L1 (> 1,0)	0,360	2,580	0,339	19,627
%PD-L1 (> 20)	0,979	1,020	0,230	4,526
%PD-L1 (> 50)	0,671	0,048	0,000	61064,531
%PD-L1 (\geq 11,955) R =SG	0,303	1,723	0,612	4,850
%PD-L2 (> 1,0)	0,865	1,092	0,396	3,016
%PD-L2 (> 20)	0,520	0,045	0,000	572,035
%PD-L2 (> 50)	-	-	-	-
%PD-L2 (\geq 2,374) R=SG	0,481	1,442	0,521	3,989
%CD8 (> 1,0)	0,481	2,075	0,273	15,794
%CD8 (> 20)	0,792	1,314	0,172	10,010
%CD8 (> 50)	-	-	-	-
%CD8 (\geq 6,973) R	0,238	1,864	0,662	5,246
%CD8 (\geq 1,927) SG	0,663	1,393	0,314	6,181
%PD-1 (> 1,0)	0,686	1,360	0,307	6,030
%PD-1 (> 20)	0,520	0,045	0,000	572,035
%PD-1 (> 50)	-	-	-	-
%PD-1 (\geq 5,426) R	0,091	2,444	0,867	6,893
%PD-1 (\geq 1,896) SG	0,359	2,007	0,453	8,898
%PD1 PD-L1 (> 1,0)	0,686	1,360	0,307	6,030
%PD1 PD-L1 (> 20)	0,520	0,045	0,000	572,035
%PD1 PD-L1 (> 50)	-	-	-	-
%PD1 PD-L1 (\geq 3,345) R	0,054	2,892	0,983	8,505
%PD1 PD-L1 (\geq 9,080) SG	0,554	1,568	0,353	6,955
%PD1 PDL2 (> 1,0)	0,687	1,232	0,446	3,402
%PD1 PDL2 (> 20)	0,651	0,047	0,000	26322,715
%PD1 PDL2 (\geq 0,035) R	0,228	2,180	0,615	7,736
%PD1 PDL2 (\geq 2,275) SG	0,377	1,594	0,566	4,491
%PD-L1 PD-L2 (> 1,0)	0,865	1,092	0,396	3,016
%PD-L1 PD-L2 (> 20)	0,520	0,045	0,000	572,035
%PD-L1 PD-L2 (> 50)	-	-	-	-
%PD-L1 PD-L2 (\geq 0,066) R	0,735	1,196	0,425	3,362
%PD-L1 PD-L2 (\geq 0,054) SG	0,915	1,058	0,376	2,975

SG = ponto de corte na curva de ROC para óbito; R = ponto de corte na curva de ROC para recorrência.

Tabela 6 - Risco de óbito de acordo com expressão de imunorreceptores e suas colocalizações no tecido total dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016

	Valor - P	RR	IC95% inferior	IC95% superior
%PD-L1 (> 1,0)	0,823	0,842	0,187	3,793
%PD-L1 (> 20)	0,359	1,818	0,506	6,527
%PD-L1 (> 50)	0,736	0,048	0,000	2281585,345
%PD-L1 ($\geq 11,955$) R =SG	0,128	2,285	0,788	6,626
%PD-L2 (> 1,0)	0,783	0,862	0,302	2,466
%PD-L2 (> 20)	0,985	1,020	0,132	7,859
%PD-L2 (> 50)	-	-	-	-
%PD-L2 ($\geq 0,083$) R	0,596	0,753	0,264	2,149
%PD-L2 ($\geq 2,374$) SG	0,316	1,712	0,598	4,900
%CD8 (> 1,0)	0,642	1,620	0,212	12,399
%CD8 (> 20)	0,934	1,090	0,142	8,383
%CD8 (> 50)	-	-	-	-
%CD8 ($\geq 6,973$) R	0,460	1,511	0,505	4,520
%CD8 ($\geq 1,927$) SG	0,299	2,941	0,384	22,522
%PD-1 (> 1,0)	0,849	1,157	0,258	5,183
%PD-1 (> 20)	0,985	1,020	0,132	7,859
%PD-1 (> 50)	-	-	-	-
%PD-1 ($\geq 5,426$) R	0,637	1,291	0,447	3,728
%PD-1 ($\geq 1,896$) SG	0,431	1,826	0,408	8,167
%PD1 PD-L1 (> 1,0)	0,849	1,157	0,258	5,183
%PD1 PD-L1 (> 20)	0,985	1,020	0,132	7,859
%PD1 PD-L1 (> 50)	-	-	-	-
%PD1 PD-L1 ($\geq 3,345$) R	0,476	1,465	0,512	4,193
%PD1 PD-L1 ($\geq 9,080$) SG	0,199	2,317	0,642	8,358
%PD1 PDL2 (> 1,0)	0,990	0,993	0,348	2,838
%PD1 PDL2 (> 20)	0,469	2,125	0,276	16,364
%PD1 PDL2 (> 50)	-	-	-	-
%PD1 PDL2 ($\geq 0,035$) R	0,648	1,310	0,410	4,183
%PD1 PDL2 ($\geq 2,275$) SG	0,292	1,768	0,612	5,109
%PD-L1 PD-L2 (> 1,0)	0,783	0,862	0,302	2,466
%PD-L1 PD-L2 (> 20)	0,985	1,020	0,132	7,859
%PD-L1 PD-L2 (> 50)	-	-	-	-
%PD-L1 PD-L2 ($\geq 0,066$) R	0,596	0,753	0,264	2,149
%PD-L1 PD-L2 ($\geq 0,054$) SG	0,422	0,650	0,228	1,859

SG = ponto de corte na curva de ROC para óbito; R = ponto de corte na curva de ROC para recorrência.

Gráfico 7 - Curva de Kaplan Meyer: expressão de PD-1 $\geq 5,426\%$ (imunofluorescência) em série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 e ocorrência de recidiva durante seguimento (p = 0,091)

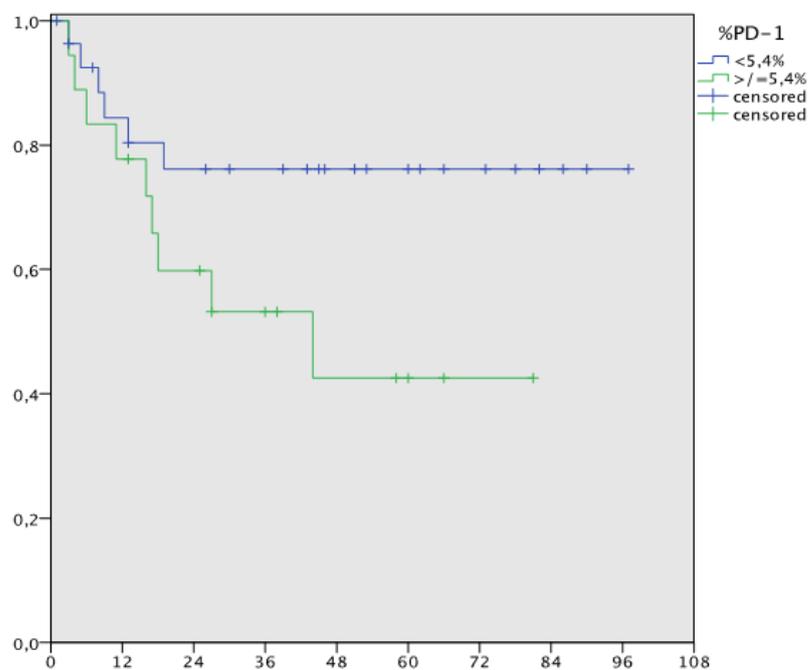
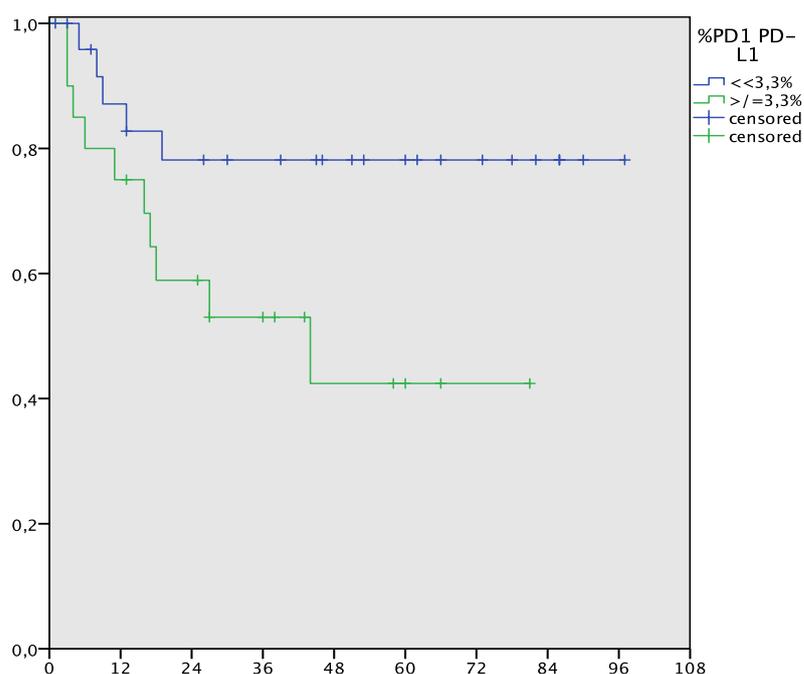


Gráfico 8 - Curva de Kaplan Meyer: expressão de PD1/PD-L1 $\geq 3,345\%$ (imunofluorescencia) em série de carcinomas escamocelulares cutâneos operados entre 2010 e 2016 e ocorrência de recidiva durante seguimento (p = 0,054)



Ao se avaliar as regiões tumorais povoadas por linfócitos, também não foi encontrada relevância estatística na relação com recidiva ou sobrevida global. Os resultados mais promissores encontrados na tentativa de relacionar expressão dos imunorreceptores e suas colocalizações foram o PD-1 \geq 49,32% ($p = 0,138$; RR = 1,040; IC95% entre 0,365 e 2,967) e a colocalização PD-1/PD-L2 \geq 8,974% ($p = 0,138$; RR = 2,606; IC95% entre 0,735 e 9,242) para definir chances de recidiva. Todos os resultados relacionados às regiões habitadas pelos linfócitos citotóxicos estão ilustrados nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Risco de recidiva de acordo com expressão de imunorreceptores e suas colocalizações no infiltrado inflamatório habitado por CD8⁺ dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016

	Valor - P	RR	IC95% inferior	IC95% superior
%CD8 PD1(> 1)	-	-	-	-
%CD8 PD-1 (> 20)	0,720	1,313	0,296	5,821
%CD8 PD-1 (> 50)	0,138	2,253	0,770	6,595
%CD8 PD-1 (\geq 49,32) R	0,138	2,253	0,770	6,595
%CD8 PD-1 (\geq 9,890) SG	0,650	1,601	0,210	12,206
%CD8 PD-1 PD-L1 (> 1,0)	0,651	21,095	0,000	11713225,695
%CD8 PD-1 PD-L1 (> 20)	0,793	0,844	0,238	2,993
%CD8 PD-1 PD-L1 (> 50)	0,586	1,326	0,480	3,662
%CD8 PD-1 PD-L1 (\geq 43,816) R	0,207	1,998	0,682	5,848
%CD8 PD-1 PD-L1 (\geq 4,134) SG	0,728	0,768	0,173	3,413
%CD8 PD-1 PD-L2 (> 1,0)	0,340	2,684	0,353	20,421
%CD8 PD-1 PD-L2 (> 20)	0,935	1,043	0,378	2,880
%CD8 PD-1 PD-L2 (> 50)	0,776	0,832	0,235	2,953
%CD8 PD-1 PD-L2 (\geq 8,974) R	0,138	2,606	0,735	9,242
%CD8 PD-1 PD-L2 (\geq 0,137) SG	0,453	2,174	0,286	16,554
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (> 1,0)	0,340	2,684	0,353	20,421
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (> 20)	0,697	0,814	0,289	2,291
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (> 50)	0,966	0,973	0,274	3,452
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (\geq 9,271) R	0,298	1,838	0,584	5,781
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (\geq 0,125) SG	0,340	2,684	0,353	20,421

SG = ponto de corte na curva de ROC para óbito; R = ponto de corte na curva de ROC para recorrência.

Tabela 8 - Risco de óbito de acordo com expressão de imunorreceptores e suas colocalizações no infiltrado inflamatório habitado por CD8⁺ dos pacientes tratados com carcinoma escamocelular cutâneo entre 2010 e 2016

	Valor - P	RR	IC95% inferior	IC95% superior
%CD8 PD-1 (> 1,0)	-	-	-	-
%CD8 PD-1 (> 20)	0,862	1,143	0,255	5,120
%CD8 PD-1 (> 50)	0,941	1,040	0,365	2,967
%CD8 PD-1 (≥ 49,32)	0,941	1,040	0,365	2,967
%CD8 PD-1 (≥ 9,890)	0,369	24,690	0,023	27029,295
%CD8 PD-1 PD-L1 (> 1,0)	0,636	21,323	0,000	6890691,558
%CD8 PD-1 PD-L1 (> 20)	0,648	0,742	0,206	2,673
%CD8 PD-1 PD-L1 (> 50)	0,761	0,844	0,282	2,523
%CD8 PD-1 PD-L1 (≥ 43,816)	0,850	0,904	0,317	2,580
%CD8 PD-1 PD-L1 (≥ 4,134)	0,525	1,935	0,253	14,809
%CD8 PD-1 PD-L2 (> 1,0)	0,402	2,387	0,312	18,275
%CD8 PD-1 PD-L2 (> 20)	0,787	1,155	0,405	3,300
%CD8 PD-1 PD-L2 (> 50)	0,770	0,826	0,229	2,978
%CD8 PD-1 PD-L2 (≥ 8,974)	0,946	1,038	0,347	3,102
%CD8 PD-1 PD-L2 (≥ 0,137)	0,346	25,131	0,031	20541,831
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (> 1,0)	0,402	2,387	0,312	18,275
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (> 20)	0,840	0,897	0,310	2,590
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (> 50)	0,907	0,926	0,256	3,355
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (≥ 9,271)	0,676	0,797	0,276	2,304
%CD8 PD-1 PD-L1 PD-L2 (≥ 0,125)	0,402	2,387	0,312	18,275

SG = ponto de corte na curva de ROC para óbito; R = ponto de corte na curva de ROC para recorrência.

6 DISCUSSÃO

Foi demonstrada que a expressão de imunorreceptores nos carcinomas de células escamosas de pele é alta, especialmente dentro do microambiente inflamatório tumoral. Até onde se sabe, este é o primeiro trabalho a quantificar a expressão de PD-1, PD-L1, PD-L2 e CD8⁺, e a estudar suas interações. As agências sanitárias dos EUA e do Brasil aprovaram recentemente o uso do anti-PD-1, Cemiplimab, para CECs de pele avançados considerados irresssecáveis ou metastáticos^{3,69}. No entanto, o papel da interação entre o sistema imunológico e esses tumores ainda não foi totalmente elucidado.

A partir da descoberta dos receptores imunológicos conhecidos como *immune checkpoints* em 1992 por Honjo *et al.*²², iniciou-se uma nova era no entendimento da interação entre sistema imunológico e as neoplasias malignas. Seu efeito como um regulador autoimune só conseguiu ser demonstrado em 1999 pelo mesmo grupo⁷⁰. Ao mesmo tempo, a atividade do PD-1 na gênese de doenças autoimunes em laboratório foi rapidamente estabelecida por experimentos em animais. A deficiência de expressão de PD-1 pode levar a quadros semelhantes ao Lúpus, a glomerulonefrites, a miocardites e até mesmo ao diabetes mellitus do tipo I em ratos. Começaram, então, os estudos na tentativa de encontrar os ligantes do PD-1 e seus mecanismos de funcionamento. Em 2000 e em 2001, foram descritos pelos

grupos da Clínica Mayo e por um grupo de genética de Cambridge, Massachusetts, os ligantes chamados PD-L1 (B7-H1) e PD-L2 (B7-DC)²¹. Essas glicoproteínas foram relacionadas a uma conexão com PD-1, inativando a atividade linfocitária. Algumas células neoplásicas têm a capacidade de expressar na parede das suas células esses sinalizadores^{21,22,61,65}.

É preciso lembrar que o PD-1 é expresso numa variedade grande de células, dentre elas os linfócitos T, CD4⁺ (*helper*) e CD8⁺ (citotóxico). Sua expressão pode ser induzida por interleucinas de cadeia γ em comum, como as IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21, que são liberadas no microambiente inflamatório. A partir do momento em que o linfócito T é ativado, estes mecanismos de mediação da atividade imune estimulam a expressão do PD-1, com finalidade de limitar a atividade inflamatória. Essa expressão é feita principalmente por meio de alguns fatores de transcrição, cujo mais importante é o NFATc1. As proteínas de transcrição são aquelas que se ligam ao DNA da célula, no gene promotor, ativando a RNA polimerase, promovendo a transcrição deste gene⁶¹.

Já os PD-L1 e PD-L2, estão expressos em várias células do sistema hematopoiético ou não. O PD-L1 se expressa em células dendríticas, linfócitos, macrófagos, células dos ossos, pâncreas, baço, fígado, olhos, vasos, placenta, dentre outros. O PD-L2 está expresso em células dendríticas apresentadoras de antígenos, macrófagos, linfócitos e células da medula óssea. PD-L1 é mais expresso no córtex do Timo, enquanto o PD-L2 é mais expresso na sua medula. Interleucinas com cadeia γ em comum como IL-2,

IL-7, IL-15 e IL21, assim como IL-4, IL-10 e IFN- γ estimulam sua expressão. Dentro dos linfócitos, a sinalização do PD-1 inibe a atividade do CD28 e da apresentação de antígeno, sinais positivos que tiram o linfócito da fase G0 e estimulam sua progressão para fase G1 da divisão celular, inibindo a proliferação celular, mas também diminuindo a atividade do linfócito em questão. Ao falarmos da atividade do linfócito T CD8⁺, há uma diminuição da sua atividade citotóxica e liberação de interleucinas^{54-56,61}.

Fica claro no presente estudo que houve uma detecção importante de CD8⁺ e de todos os imunorreceptores. A relação entre eles parece ser muito próxima e notadamente presente no ambiente inflamatório habitado por CD8⁺.

Aparentemente, a expressão de PD-L1 é mais abundante do que a de PD-L2, e a presença deste está relacionada com a presença do primeiro, tanto no tecido como um todo, quanto somente naquelas áreas teciduais habitadas pelo CD8⁺. Nota-se, ainda, uma rica relação dos imunorreceptores da família B7, PD-L1 e PD-L2, com a presença de PD-1.

Foi observada, também, a presença do linfócito T citotóxico no tecido em 100% dos pacientes em algum grau, juntamente com a expressão do PD-1, confirmando a característica inflamatória deste tipo de neoplasia maligna e definido um padrão de regulação da atividade inflamatória.

O presente estudo confirmou os últimos relatos disponíveis na literatura que serão discutidos a seguir, ou seja, que PD-1 e PD-L1 parecem ter um papel na evolução das neoplasias malignas de pele em território de cabeça e pescoço, embora não fosse possível obter significância estatística, possivelmente pelo tamanho da casuística.

As suspeitas de que havia algum mecanismo de bloqueio por parte das células tumorais em relação ao sistema imune foram comprovadas no início do século XXI. Em 2002, surgiram os primeiros trabalhos descrevendo sucesso da atividade antitumoral ao se bloquear o PD-1 em ratos⁷⁰. A partir de 2006, apareceram os primeiros bloqueadores desta sinalização inibitória^{50,61}. Nasceu a nova era do tratamento para neoplasias malignas na história da humanidade, que passou pelo século dos cirurgiões em meados do século XIX, atravessando o século XX por meio do advento da radioterapia e das drogas citotóxicas, entrando agora, então, na era dos anticorpos bloqueadores dos *immune checkpoints* neste século.

Nos últimos anos, as terapias-alvo que visam intervir na relação câncer-sistema imune têm ganhado força. Estudos clínicos e de laboratório ganharam importância na projeção de melhores desfechos em pacientes com vários tipos de neoplasias malignas por meio do bloqueio dos vários imunorreceptores.

Muitos tumores sólidos têm expressão aumentada de PDL-1. Esta expressão está associada à superexpressão de linfócitos citotóxicos exaustos dentro do microambiente tumoral e, portanto, a uma menor resposta imune no combate a estas neoplasias malignas. Alguns tumores podem já expressar PD-L1 de forma inata como uma forma de resistência, outros podem necessitar uma cadeia inflamatória para serem ativados e então passarem a expressar esses ligantes. Novos estudos têm mostrado a presença de PD-L2 em algumas células B, inclusive na Doença de Hodgkin, mas o papel do PD-L2 na interação tumor e hospedeiro não é totalmente compreendida. Algumas

drogas bloqueadoras de PD-1 influenciaram a sobrevida global e o controle da doença tumoral, mesmo sem expressão demonstrável de PD-L1. A resposta poderia estar na expressão de PD-L2 (B7-DC), também ligante de PD-1^{23,55, 56}.

As expressões de PD-1, PD-L1, PD-L2 e CD8⁺ têm sido avaliadas, não só na amostra tumoral (biópsia ou peça cirúrgica), mas também nas células do sangue periférico. O percentual de presença desses marcadores e também sua localização no microambiente tumoral podem não somente prever resposta aos agentes bloqueadores, como também estabelecer prognóstico e predisposição a algumas características clínicas como crescimento locorregional, metástases linfonodais, e metástase à distância. No entanto, os resultados dos trabalhos que tentaram correlacionar as expressões dos imunorreceptores com a evolução e prognóstico ainda são conflitantes^{53-56,61,71-73}.

Mesmo em tumores onde o uso de drogas que bloqueiam a interação entre imunorreceptores já está em uso clínico há mais tempo e com resultados mais bem estabelecidos, como melanoma maligno e neoplasias de pulmão não-pequenas células, o grau e localização da expressão dos imunorreceptores, a presença de infiltrado inflamatório tumoral, e suas relações, ainda falham em prever comportamento clínico e grau de resposta aos bloqueadores na sua totalidade. Vários trabalhos já com casuísticas grandes, agrupando pacientes segundo subtipo tumoral, ou simplesmente pelo fato de serem sólidos, tentaram estabelecer relações prognósticas. Exemplo é uma metanálise com mais de 3200 pacientes que foram avaliados

segundo a presença de expressão de PD-L2 em tumores sólidos de vários tipos e de várias origens embriológicas²³. Embora não tenha havido relação com características clinicopatológicas como espessura, invasão perineural, invasão vascular, metástase linfonodal ou à distância, grau de diferenciação, sexo ou idade, pareceu haver relação entre expressão de PD-L2 e sobrevida global e também com sobrevida livre de doença^{3,23,51,54-56,59,62,63,68,72,74-76}.

Na abordagem dos carcinomas escamocelulares de território de cabeça e pescoço, há como nos CECs de pele, abundante infiltrado inflamatório, notadamente CD8⁺, assim como a presença de PD-1 e PD-L1, principalmente nos tumores originados pelo HPV16. Por isso, há interesse no entendimento do mecanismo de mediação imune em resposta à presença tumoral. Tem-se tentado quantificar as expressões desses imunorreceptores, assim como estabelecer uma relação entre eles e os tipos de células inflamatórias presentes no microambiente tumoral. Uma outra grande metanálise mostrou, como valor de referência mais analisado, a expressão de PD-L1 acima de 5% e uma média de positividade de 42% das amostras^{54,63,64}. A expressão de PD-L1 foi obtida tanto das células tumorais quanto do infiltrado linfocitário, muitas vezes em ambos, dependendo do estudo em questão. A expressão de PD-L1 e a densidade de CD8⁺ nesta metanálise não influíram na sobrevida global e nas taxas de recidiva para os tumores de território de cabeça e pescoço. Os autores sugeriram a discriminação dos tumores entre aqueles com infiltrado linfocitário com CD8⁺ presente e aqueles com CD8⁺ ausente. O primeiro grupo teria uma evolução mais favorável, expressando ou não PD-1 e PD-L1. A ausência da expressão desses sinalizadores com melhor

prognóstico leva-nos a pensar em uma segunda rota de interação imune. O segundo grupo, com CD8⁺ escassos no microambiente teria pior prognóstico, podendo ser ainda pior com expressão intrínseca de PD-L1. A agência de regulamentação de drogas no EUA, autorizou o uso de bloqueadores anti-PD-1 em pacientes com carcinomas de células escamosas de mucosa de território de cabeça e pescoço com expressão de PD-L1 e falha no tratamento clínico de primeira linha^{53-56,63,64,77-79}.

Até o momento, há poucos estudos que avaliaram a relevância da presença de PD-L1 e PD-L2 em pacientes com carcinomas escamocelulares de pele de alto risco, não só em território de cabeça e pescoço, mas em qualquer topografia. Não foi encontrado (até o momento) qualquer artigo tentando detectar a presença de PD-L1, PD-L2, PD-1 e CD8⁺ e sua localização simultânea em pacientes com estes tumores.

Um trabalho encontrou a presença de PD-1 e PD-L2 no microambiente tumoral de 38 casos, com maior expressão notadamente em pacientes com tumores invasivos e naqueles com invasão perineural. Este mesmo trabalho mostrou resposta completa com uso de anti-PD-1 em um paciente cuja lesão apresentava invasão óssea (T4), e estava em seguimento sem indícios de recidiva após 11 meses de tratamento⁴.

Um outro estudo desenvolvido na Austrália, com 74 pacientes, encontrou expressão de PD-L1 em mais de 1% das células em 52,7% das amostras, sendo que se obteve expressão de PD-L1 em mais de 5% em 39,2% dos pacientes. Setenta e sete por cento das amostras tinham infiltrado linfocitário presente. Destes, 93% expressavam PD-L1, e em 70,2%, a

expressão acontecia em mais de 5% dessas células. Este estudo encontrou melhor prognóstico naqueles que expressavam PD-L1⁷⁴. Este achado pode ser explicado ao se associar a expressão deste sinalizador com um fenótipo inflamatório, muito comum nos CECs de pele, inclusive na nossa amostra, que continha linfócitos CD8⁺ em todos os casos. Apesar das expressões de PD-L1 e PD-1 já terem sido relacionadas com uma evolução desfavorável, também há trabalhos na literatura mostrando um desfecho melhor, como nos tumores de Merkel, mama e até mesmo em carcinomas de células escamosas de mucosa de cabeça e pescoço^{63,64,74}.

García-Pedrero *et al.*⁷² estudaram a expressão de PD-L1 nas células dos tumores com carcinoma escamocelular de pele avançados, encontrando sua presença em 41% dos pacientes estudados, e uma relação entre a expressão de PD-L1 e chance de metástase linfonodal quando essa expressão se encontra em mais de 25% das células do microambiente tumoral.

Schaper *et al.*⁸⁰ aplicaram um ponto de corte de $\geq 1\%$ para expressão de PD-L1. Dos 75 pacientes, 26% foram positivos no tumor e 60% nos infiltrado inflamatório linfocitário (TILs). Utilizando um ponto de corte $\geq 5\%$, 10% dos tumores e 43% dos TILs foram positivos para PD-L1. A gravidade da inflamação (classificada como ausente, leve, moderada e grave) foi correlacionada positivamente com a expressão de PD-L1 no tumor e nos TILs. Além disso, a expressão de PD-L1 nas células tumorais foi associada à presença de células CD8⁺ no microambiente. Outros parâmetros clinicopatológicos, incluindo sexo, idade, tamanho do tumor, classificação do

tumor ou o risco de desenvolver metástases, não se correlacionaram com a expressão de PD-L1 no tumor primário. Este padrão alto de expressão de PD-L1 em áreas expostas à radiação UV é muito semelhante ao encontrado no presente estudo.

Um outro estudo recente de fase 2, com 78 pacientes utilizou a expressão de PD-L1 com faixas de expressão nas células tumorais divididas em menor que 1%, maior ou igual a 1%, entre 1 e 5%, maior ou igual a 5%, entre 5% e 50% e maior ou igual a 50%, não conseguiu estabelecer uma faixa de expressão deste imunorreceptor capaz de prever resposta a uma droga anti-PD-1.

As diferentes técnicas de avaliar a expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2, seja pela localização da expressão desses sinalizadores (parede celular ou citoplasma), da forma de leitura (manual ou automática) e até mesmo por diferentes técnicas de imunofluorescência, trazem diferentes resultados na literatura e provocam dificuldades em estabelecer a presença da expressão, o grau de expressão e sua relação com prognóstico, desfecho e resposta às novas drogas. O próprio ponto de corte para definir positividade varia bastante, tanto para PD-1, quanto para PD-L1 e PD-L2, utilizando desde qualquer positividade, passando por valores que variam por 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% ou até mesmo 50%^{35,55,56,61,68,71-73,75,81-83}.

Na tentativa de entender a interação entre as neoplasias malignas e os linfócitos do microambiente tumoral, Howitt *et al.*⁸⁴ estudaram a expressão de antígenos pelas células tumorais de neoplasias de endométrio. Aparentemente, o número de antígenos reconhecidos pelo sistema imune

estava diretamente relacionado com a presença de linfócitos CD3⁺ e CD8⁺ no microambiente tumoral, assim como a expressão de PD-1 e PD-L1 neste mesmo ambiente, podendo ainda prever a resposta aos bloqueadores de PD-1 e PD-L1.

Ainda falta muito para se compreender as rotas de interação entre o sistema imune e as neoplasias malignas. A expressão desses imunorreceptores na tentativa de prever desfecho ainda é inconclusiva, mas sua importância parece muito bem estabelecida, inclusive nas neoplasias de pele. No presente estudo, contribuiu-se para oferecer mais subsídios para estudos clínicos mais amplos com drogas bloqueadoras desta relação entre o sistema imune e as neoplasias malignas, principalmente naqueles pacientes onde os todos os tratamentos disponíveis falharam.

Mais estudos são necessários na tentativa de estabelecer uma relação entre esses sinalizadores e o desfecho dos pacientes, mas parece inquestionável que esse mecanismo de sinalização está presente nos carcinomas de células escamosas de pele de alto risco em território de cabeça e pescoço.

7 CONCLUSÕES

Foi encontrada a presença de abundante inflamação junto às neoplasias avançadas de pele, com ampla expressão de CD8+ em todas as amostras e sempre acompanhadas pela expressão de PD-1.

A presença simultânea de PD-L1 e PD-L2 foi também abundante. Parece clara a relação destes imunorreceptores junto à presença de PD-1.

Não foi possível estabelecer uma relação entre expressão de imunorreceptores e/ou suas colocalizações e os desfechos clínicos definidos como recidiva ou sobrevida global.

8 ANEXO

Anexo A - Parecer da Comissão Nacional de ética em Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE PDL-1 E PDL-2 EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE PELE LOCALMENTE AVANÇADOS EM TERRITÓRIO DE CABEÇA E PESCOÇO

Pesquisador: André Bandiera de Oliveira Santos

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 3

CAAE: 55131416.0.0000.0065

Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.635.269

Apresentação do Projeto:

O protocolo foi enquadrado como pertencente à Área Temática "Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro.". No documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_677749" postado em 24/06/2016, no item introdução, lê-se: O Carcinoma espinocelular (CEC) ou Carcinoma Epidermóide cutâneo é uma neoplasia maligna originada pela multiplicação e crescimento descontrolado de células escamosas que compõem as porções mais superficiais da epiderme.1 A sua etiologia está ligada à exposição prolongada aos raios ultra-violetas, mas não exclusivamente. Há relação com cicatrizes, queimaduras, uso de drogas imunossupressoras, agentes químicos e radiação. O tumor acomete primordialmente homens acima dos 50 anos, caucasianos e com história de longa exposição solar.

Objetivo da Pesquisa:

Observação da imunexpressão de anti pd-1 e anti pd2 em espécimes cirúrgicos

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 1.635.269

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conteúdo não analisado pela CONEP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um de pesquisa apresentada à Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Tem como pesquisador responsável: André Bandiera De Oliveira Santos.

O principal objetivo do estudo é de quantificar a expressão dos antígenos PD-L1 e PD-L2, através de análise imuno-histoquímica, nas células tumorais dos carcinomas epidermóides cutâneos (CECs) avançados em território de cabeça e pescoço.

Inicialmente serão selecionados casos de tumores operados no serviço de cirurgia de Cabeça e Pescoço do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Icesp). Serão considerados casos avançados de CECs em pacientes de estágio T3 e T4, com linfonodos acometidos (N1) ou com metástases a distância (M1). As amostras biológicas serão doadas em blocos de parafinas pela mesma instituição e essas serão submetidas a exames de imuno-histoquímica com anti-corpos monoclonais anti-PD-L1 e anti-PD-I2. Uma vez que trata-se da coleta de material anátomo patológico de pacientes previamente operados, o pesquisador principal propõe dispensa de TCLE.

De acordo com o apresentado pelo pesquisador no documento intitulado "projeto1_2_2_docx", o financiamento da pesquisa é próprio: "Por se tratar de um estudo de baixo custo, com pesquisa direta de banco de dados, todos os custos financeiros são de responsabilidade do pesquisador". Visto que não haverá nenhum tipo de coordenação, patrocínio estrangeiro e copatrocínio Brasileiro, o estudo em questão não se enquadra na área temática de "Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

1. Quanto ao documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_677749":

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.635.269

1.1. O cronograma não está adequado, pois informa que o estudo já teve início. Solicita-se esclarecimento e, caso necessário, adequação do cronograma com relação à data de início do estudo, dado que ele ainda se encontra em análise no sistema CONEP/CEP até a presente data (Norma Operacional 001/2013 item 3.3.f)

1.2. O Orçamento financeiro apresentado não está de acordo com o solicitado pela Norma Operacional CNS 001/2013 item 3.3.e. O Sistema CEP/CONEP não admite a existência de pesquisas com "custo zero". Ainda que o pesquisador entenda que não serão necessários recursos para aquisição de materiais, compra de equipamentos e outros gastos, o pesquisador terá que fazer uso de horas do trabalho pagas pela instituição onde possui vínculo, utilização de computador, serviços de arquivologia, entre outros que geram gastos, ainda que mínimos. Solicita-se que seja apresentado orçamento financeiro detalhado, que especifique todos os recursos, fontes e destinação, em especial os custos operacionais (recursos humanos e materiais), bem como qual é a fonte financiadora. Solicita-se adequação.

2. Solicita-se apresentar os currículos dos pesquisadores do estudo, comprovando-se a qualificação deles (Resolução CNS 466/2012 itens III.2.h)

3. Não foi anexada a declaração de infraestrutura da instituição para o desenvolvimento da pesquisa e a descrição das condições para realização do protocolo em questão. Solicita-se a apresentação da documentação.

4. No documento intitulado "FR_assinada", o campo Patrocinador Principal não está preenchido. Conforme Norma Operacional CNS 001/2013 item 3.3.a): "todos os campos devem ser preenchidos, datados e assinados, com identificação dos signatários. As informações prestadas devem ser compatíveis com as do protocolo." Neste caso, solicita-se completar a Folha de Rosto com o preenchimento dos termos e assinatura do Patrocinador Principal, sendo esta toda pessoa física ou jurídica, pública ou privada, que apoia a pesquisa mediante ações de financiamento, infraestrutura, recursos humanos ou apoio institucional. Caso se trate de uma agência de fomento, a assinatura dos responsáveis pelos órgãos nacionais de fomento à pesquisa não é necessária, entretanto é necessário o preenchimento adequado das informações. Solicita-se adequação.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.635.269

5. Solicitam-se maiores informações quanto à participação da Universidade de Harvard no estudo em questão. Caso sejam enviadas ao exterior lâminas de tumores provenientes de pacientes atendidos no Icesp, solicita-se a apresentação da documentação de aprovação e concordância por parte da instituição fornecedora das lâminas para o envio dessas à Universidade de Harvard.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, a CONEP entende que o protocolo de pesquisa não se enquadra na Área Temática "Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;" (considerando as informações do item IX.4 da Resolução CNS nº 466/2012), não cabendo a sua análise ética à CONEP, mas somente ao CEP.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep - delibera pela devolução do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, por não se enquadrar em nenhuma das áreas temáticas descritas no item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

Portanto, esta comissão delibera por devolver o protocolo em questão, solicitando a esse Comitê que acompanhe o atendimento às questões acima e informando que após análise e aprovação do CEP o estudo pode ser iniciado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_677749.pdf	24/06/2016 10:08:05		Aceito
Outros	Memo_Pesquisa_ICESP.docx	24/06/2016 10:07:22	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anexo_II.doc	24/06/2016 10:06:18	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Harvard.docx	24/06/2016 10:03:52	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto1_2_2_docx.docx	24/06/2016 10:03:43	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Outros	MM_0471_2016_Resp_Parecer_CEP_1517258.pdf	12/05/2016 16:19:32	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Harvard.pdf	07/04/2016 15:10:22	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.635.269

Declaração de Pesquisadores	Dispensa_TCLE.pdf	07/04/2016 15:09:42	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Dispensa_TCLE.doc	07/04/2016 15:09:06	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Outros	Anexo_II.pdf	07/04/2016 15:07:35	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Outros	Aprovacao_NP.pdf	07/04/2016 15:07:17	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto1_2.docx	07/04/2016 15:03:47	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito
Folha de Rosto	FR_assinada.pdf	07/04/2016 15:02:15	André Bandiera de Oliveira Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Devolvido com Recomendação

BRASILIA, 13 de Julho de 2016

Assinado por:
Gabriela Marodin
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

9 REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.
2. Thompson AK, Kelley BF, Prokop LJ, Murad MH, Baum CL. Risk Factors for cutaneous squamous cell carcinoma recurrence, metastasis, and disease-specific death: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Dermatol.* 2016;152(4):419-28.
3. Migden MR, Rischin D, Schmults CD, Guminski A, Hauschild A, Lewis KD, Chung CH, Hernandez-Aya L, Lim AM, Chang ALS, Rabinowits G, Thai AA, Dunn LA, Hughes BGM, Khushalani NI, Modi B, Schadendorf D, Gao B, Seebach F, Li S, Li J, Mathias M, Booth J, Mohan K, Stankevich E, Babiker HM, Brana I, Gil-Martin M, Homsí J, Johnson ML, Moreno V, Niu J, Owonikoko TK, Papadopoulos KP, Yancopoulos GD, Lowy I, Fury MG. PD-1 blockade with cemiplimab in advanced cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2018;379(4):341-51.
4. Stevenson ML, Wang CQ, Abikhair M, Roudiani N, Felsen D, Krueger JG, Pavlick AC, Carucci JA. Expression of programmed cell death ligand in cutaneous squamous cell carcinoma and treatment of locally advanced disease with pembrolizumab. *JAMA Dermatol.* 2017;153(4):299-303.
5. Rogers HW, Weinstock MA, Feldman SR, Coldiron BM. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer (keratinocyte carcinomas) in the U.S. population, 2012. *JAMA Dermatol.* 2015;151(10):1081-6.

6. Muzic JG, Schmitt AR, Wright AC, Alniemi DT, Zubair AS, Olazagasti Lourido JM, Sosa Seda IM, Weaver AL, Baum CL. Incidence and Trends of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *Mayo Clin Proc.* 2017;92(6):890-8.
7. Nehal KS, Bichakjian CK. Update on keratinocyte carcinomas. *N Engl J Med.* 2018;379(4):363-74.
8. Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM, Tollefson MM, Otley CC, Weaver AL, Roenigk RK. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA.* 2005;294(6):681-90.
9. Goon PK, Greenberg DC, Igali L, Levell NJ. Squamous cell carcinoma of the skin has more than doubled over the last decade in the UK. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(6):820-1.
10. Wang JT, Palme CE, Wang AY, Morgan GJ, Gebiski V, Veness MJ. In patients with metastatic cutaneous head and neck squamous cell carcinoma to cervical lymph nodes, the extent of neck dissection does not influence outcome. *J Laryngol Otol.* 2013;127 Suppl 1:S2-7.
11. Stern RS. Prevalence of a history of skin cancer in 2007: results of an incidence-based model. *Arch Dermatol.* 2010;146(3):279-82.

12. Veierod MB, Couto E, Lund E, Adami HO, Weiderpass E. Host characteristics, sun exposure, indoor tanning and risk of squamous cell carcinoma of the skin. *Int J Cancer*. 2014;135(2):413-22.
13. Veness MJ, Palme CE, Morgan GJ. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: results from 266 treated patients with metastatic lymph node disease. *Cancer*. 2006;106(11):2389-96.
14. Wu S, Han J, Laden F, Qureshi AA. Long-term ultraviolet flux, other potential risk factors, and skin cancer risk: a cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(6):1080-9.
15. Honeycutt WM, Jansen GT. Treatment of squamous cell carcinoma of the skin. *Arch Dermatol*. 1973;108(5):670-2.
16. Karagas MR, Stukel TA, Greenberg ER, Baron JA, Mott LA, Stern RS. Risk of subsequent basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin among patients with prior skin cancer. Skin Cancer Prevention Study Group. *JAMA*. 1992;267(24):3305-10.
17. Karia PS, Jambusaria-Pahlajani A, Harrington DP, Murphy GF, Qureshi AA, Schmults CD. Evaluation of American Joint Committee on Cancer, International Union Against Cancer, and Brigham and Women's Hospital tumor staging for cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(4):327-34.

18. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, Hill D, Richards S, Paver R. Cutaneous squamous cell carcinoma treated with Mohs micrographic surgery in Australia I. Experience over 10 years. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(2):253-60.
19. Levine DE, Karia PS, Schmults CD. Outcomes of patients with multiple cutaneous squamous cell carcinomas: a 10-year single-institution cohort study. *JAMA Dermatol.* 2015;151(11):1220-5.
20. Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol.* 1998;10(10):1563-72.
21. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol.* 2007;19(7):813-24.
22. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992;11(11):3887-95.
23. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-64.
24. Allison JP, Krummel MF. The yin and yang of T cell costimulation. *Science.* 1995;270(5238):932-3.
25. Sanchez-Danes A, Blanpain C. Deciphering the cells of origin of squamous cell carcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(9):549-61.

26. Goldie SJ, Chincarini G, Darido C. Targeted Therapy against the cell of origin in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
27. Mourouzis C, Boynton A, Grant J, Umar T, Wilson A, Macpheson D, Pratt C. Cutaneous head and neck SCCs and risk of nodal metastasis - UK experience. *J Craniomaxillofac Surg.* 2009;37(8):443-7.
28. Mullen JT, Feng L, Xing Y, Mansfield PF, Gershenwald JE, Lee JE, Ross MI, Cormier JN. Invasive squamous cell carcinoma of the skin: defining a high-risk group. *Ann Surg Oncol.* 2006;13(7):902-9.
29. Cernea CR, Ferraz AR, de Castro IV, Sotto MN, Logullo AF, Bacchi CE, Plopper C, Wanderlei F, de Carlucci D Jr, Hojaij FC. Perineural invasion in aggressive skin carcinomas of the head and neck. Potentially dangerous but frequently overlooked. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2009;71(1):21-6.
30. Nemer KM, Bauman TM, Laurin Council M, Hurst EA. Surveyed dermatologists are less likely to curette invasive squamous cell carcinoma in solid organ transplant recipients. *Int J Womens Dermatol.* 2020;6(2):99-101.
31. Chren MM, Linos E, Torres JS, Stuart SE, Parvataneni R, Boscardin WJ. Tumor recurrence 5 years after treatment of cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2013;133(5):1188-96.

32. Roozeboom MH, Lohman BG, Westers-Attema A, Nelemans PJ, Botterweck AA, van Marion AM, Kelleners-Smeets NW. Clinical and histological prognostic factors for local recurrence and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma: analysis of a defined population. *Acta Derm Venereol.* 2013;93(4):417-21.
33. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL, Jr. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol.* 1992;26(6):976-90.
34. Baxter JM, Patel AN, Varma S. Facial basal cell carcinoma. *BMJ.* 2012;345:e5342.
35. Brantsch KD, Meisner C, Schönfisch B, Trilling B, Wehner-Caroli J, Röcken M, Breuninger H. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol.* 2008;9(8):713-20.
36. Lund C, Sogaard H, Elbrond O, Jorgensen K, Andersen AP. Epidermoid carcinoma of the lip. Histologic grading in the clinical evaluation. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1975;14(5):465-74.
37. Carter JB, Johnson MM, Chua TL, Karia PS, Schmults CD. Outcomes of primary cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion: an 11-year cohort study. *JAMA Dermatol.* 2013;149(1):35-41.

38. O'Bryan K, Sherman W, Niedt GW, Taback B, Manolidis S, Wang A, Ratner D. An evolving paradigm for the workup and management of high-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(4):595-602 e1.
39. dos Santos LR, Cernea CR, Kowalski LP, Carneiro PC, Soto MN, Nishio S, Hojajj FC, Dutra Júnior A, Britto e Silva Filho G, Ferraz AR. Squamous-cell carcinoma of the lower lip: a retrospective study of 58 patients. *Sao Paulo Med J*. 1996;114(2):1117-26.
40. Schmults CD, Karia PS, Carter JB, Han J, Qureshi AA. Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: a 10-year, single-institution cohort study. *JAMA Dermatol*. 2013;149(5):541-7.
41. Stang A, Khil L, Kajüter H, Pandeya N, Schmults CD, Ruiz ES, Karia PS, Green AC. Incidence and mortality for cutaneous squamous cell carcinoma: comparison across three continents. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33 Suppl 8:6-10.
42. Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68(6):957-66.
43. Schell AE, Russell MA, Park SS. Suggested excisional margins for cutaneous malignant lesions based on Mohs micrographic surgery. *JAMA Facial Plast Surg*. 2013;15(5):337-43.

44. Pugliano-Mauro M, Goldman G. Mohs surgery is effective for high-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg.* 2010;36(10):1544-53.
45. Riml S, Larcher L, Kompatscher P. Complete excision of nonmelanotic skin cancer: a matter of surgical experience. *Ann Plast Surg.* 2013;70(1):66-9.
46. Veness MJ, Morgan GJ, Palme CE, Gebiski V. Surgery and adjuvant radiotherapy in patients with cutaneous head and neck squamous cell carcinoma metastatic to lymph nodes: combined treatment should be considered best practice. *Laryngoscope.* 2005;115(5):870-5.
47. Plopper C, Cernea CR, Ferraz AR, Dos Santos LR, Regis AB. Parotidectomy for primary nonparotid diseases. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;131(4):407-12.
48. Palme CE, O'Brien CJ, Veness MJ, McNeil EB, Bron LP, Morgan GJ. Extent of parotid disease influences outcome in patients with metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(7):750-3.
49. Porceddu SV, Bressel M, Poulsen MG, Stoneley A, Veness MJ, Kenny LM, Wratten C, Corry J, Cooper S, Fogarty GB, Collins M, Collins MK, Macann AMJ, Milross CG, Penniment MG, Liu HY, King MT, Panizza BJ, Rischin D. Postoperative concurrent chemoradiotherapy versus postoperative radiotherapy in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: the randomized phase III TROG 05.01 trial. *J Clin Oncol.* 2018;36(13):1275-83.

50. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):26.
51. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer.* 2010;116(7):1757-66.
52. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok JD, Hersey P, Joseph RW, Weber JS, Dronca R, Gangadhar TC, Patnaik A, Zarour H, Joshua AM, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, Algazi A, Mateus C, Boasberg P, Tumei PC, Chmielowski B, Ebbinghaus SW, Li XN, Kang SP, Ribas A. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369(2):134-44.
53. Pai SI, Faquin WC. Programmed cell death ligand 1 as a biomarker in head and neck cancer. *Cancer Cytopathol.* 2017;125(7):529-33.
54. Pai SI, Zandberg DP, Strome SE. The role of antagonists of the PD-1:PD-L1/PD-L2 axis in head and neck cancer treatment. *Oral Oncol.* 2016;61:152-8.
55. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, Stankevich E, Pons A, Salay TM, McMiller TL, Gilson MM, Wang C, Selby M, Taube JM, Anders R, Chen L, Korman AJ, Pardoll DM, Lowy I, Topalian SL. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol.* 2010;28(19):3167-75.

56. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455-65.
57. Chen R, Zhang L, Qi J, Zhang N, Zhang L, Yao S, Wu Y, Jiang B, Wang Z, Yuan H, Zhang Q, Xia C. Discovery and analysis of invertebrate IgVJ-C2 structure from amphioxus provides insight into the evolution of the Ig superfamily. *J Immunol*. 2018;200(8):2869-81.
58. Zhong X, Bai C, Gao W, Strom TB, Rothstein TL. Suppression of expression and function of negative immune regulator PD-1 by certain pattern recognition and cytokine receptor signals associated with immune system danger. *Int Immunol*. 2004;16(8):1181-8.
59. Hao C, Tian J, Liu H, Li F, Niu H, Zhu B. Efficacy and safety of anti-PD-1 and anti-PD-1 combined with anti-CTLA-4 immunotherapy to advanced melanoma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(26):e7325.
60. Lin DY, Tanaka Y, Iwasaki M, Gittis AG, Su HP, Mikami B, Okazaki T, Honjo T, Minato N, Garboczi DN. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):3011-6.

61. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol.* 2016;7:550.
62. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR. Nivolumab versus Docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-35.
63. Yang H, Zhou X, Sun L, Mao Y. Correlation Between PD-L2 Expression and clinical outcome in solid cancer patients: a meta-analysis. *Front Oncol.* 2019;9:47.
64. Yang WF, Wong MCM, Thomson PJ, Li KY, Su YX. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2018;86:81-90.
65. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget.* 2017;8(57):97671-82.
66. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Leiby MA, Lubiniecki GM, Shentu Y, Rangwala R, Brahmer JR; KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823-33.

67. Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, Hamid O, Robert C, Ascierto PA, Richards JM, Lebbé C, Ferraresi V, Smylie M, Weber JS, Maio M, Bastholt L, Mortier L, Thomas L, Tahir S, Hauschild A, Hassel JC, Hodi FS, Taitt C, de Pril V, de Schaetzen G, Suciú S, Testori A. Prolonged survival in stage III melanoma with ipilimumab adjuvant therapy. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1845-55.
68. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, Dalle S, Schenker M, Chiarion-Sileni V, Marquez-Rodas I, Grob JJ, Butler MO, Middleton MR, Maio M, Atkinson V, Queirolo P, Gonzalez R, Kudchadkar RR, Smylie M, Meyer N, Mortier L, Atkins MB, Long GV, Bhatia S, Lebbé C, Rutkowski P, Yokota K, Yamazaki N, Kim TM, de Pril V, Sabater J, Qureshi A, Larkin J, Ascierto PA; CheckMate 238 Collaborators. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in resected stage III or IV melanoma. *N Engl J Med.* 2017;377(19):1824-35.
69. Markham A, Duggan S. Cemiplimab: first global approval. *Drugs.* 2018;78(17):1841-6.
70. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12293-7.

71. Arrieta O, Montes-Servín E, Hernandez-Martinez JM, Cardona AF, Casas-Ruiz E, Crispín JC, Motola D, Flores-Estrada D, Barrera L. Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(60):101994-2005.
72. García-Pedrero JM, Martínez-Cambor P, Diaz-Coto S, Munguia-Calzada P, Vallina-Alvarez A, Vazquez-Lopez F, Rodrigo JP, Santos-Juanes J. Tumor programmed cell death ligand 1 expression correlates with nodal metastasis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(3):527-33.
73. Sampedro-Núñez M, Serrano-Somavilla A, Adrados M, Cameselle-Teijeiro JM, Blanco-Carrera C, Cabezas-Agricola JM, Martínez-Hernández R, Martín-Pérez E, Muñoz de Nova JL, Díaz JÁ, García-Centeno R, Caneiro-Gómez J, Abdulkader I, González-Amaro R, Marazuela M. Analysis of expression of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint system and its prognostic impact in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Sci Rep*. 2018;8(1):17812.
74. Roper E, Lum T, Palme CE, Ashford B, Ch'ng S, Ranson M, Boyer M, Clark J, Gupta R. PD-L1 expression predicts longer disease free survival in high risk head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathology*. 2017;49(5):499-505.

75. Slater NA, Googe PB. PD-L1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma correlates with risk of metastasis. *J Cutan Pathol.* 2016;43(8):663-70.
76. Gettinger S, Rizvi NA, Chow LQ, Borghaei H, Brahmer J, Ready N, Gerber DE, Shepherd FA, Antonia S, Goldman JW, Juergens RA, Laurie SA, Nathan FE, Shen Y, Harbison CT, Hellmann MD. Nivolumab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(25):2980-7.
77. Davis RJ, Van Waes C, Allen CT. Overcoming barriers to effective immunotherapy: MDSCs, TAMs, and Tregs as mediators of the immunosuppressive microenvironment in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2016;58:59-70.
78. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(29):3293-304.
79. Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2015;51(3):221-8.
80. Schaper K, Kother B, Hesse K, Satzger I, Gutzmer R. The pattern and clinicopathological correlates of programmed death-ligand 1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2017;176(5):1354-6.

81. Jiao Q, Liu C, Li W, Li W, Fang F, Qian Q, Zhang X. Programmed death-1 ligands 1 and 2 expression in cutaneous squamous cell carcinoma and their relationship with tumour-infiltrating dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2017;188(3):420-9.
82. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL, Chen L. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;4(127):127ra37.
83. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, Levionnois E, Nizard M, Si-Mohamed A, Besnier N, Gey A, Rotem-Yehudar R, Pere H, Tran T, Guerin CL, Chauvat A, Dransart E, Alanio C, Albert S, Barry B, Sandoval F, Quintin-Colonna F, Bruneval P, Fridman WH, Lemoine FM, Oudard S, Johannes L, Olive D, Brasnu D, Tartour E. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013;73(1):128-38.
84. Howitt BE, Shukla SA, Sholl LM, Ritterhouse LL, Watkins JC, Rodig S, Stover E, Strickland KC, D'Andrea AD, Wu CJ, Matulonis UA, Konstantinopoulos PA. Association of polymerase e-mutated and microsatellite-instable endometrial cancers with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes, and expression of PD-1 and PD-L1. *JAMA Oncol.* 2015;1(9):1319-23.

APÊNDICES

Apêndice A - Tumor segundo a *American Joint Committee on Cancer*

TX	PRIMÁRIO NÃO PODE SER ACESSADO.
T/S	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor menor do que 2,0cm no maior eixo.
T2	Tumor igual ou maior que 2,0cm e menor que 4,0cm.
T3	Tumor maior que 4,0cm, ou invasão perineural ou invasão óssea mínima ou invasão com mais de 6mm de espessura/ultrapassa derme.
T4	Invasão óssea ou de base de crânio.
T4A	Tumor invade grosseiramente o osso.
T4B	Tumor invade a base de crânio ou forâmens.

American Joint Committee on Cancer (AJCC). TNM Staging Classification for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (cSCC). 8th ed. Berlin: Springer; 2017.

Apêndice B - Linfonodos regionais segundo a *American Joint Committee on Cancer*

NX	LINFONODOS REGIONAIS NÃO PODEM SER ACESSADOS.
N0	Ausência de linfonodos.
N1	Linfonodo menor ou igual a 3,0cm no maior eixo.
N2A	Linfonodo ipsilateral maior que 3,0cm e menor/igual a 6,0cm ou menor/igual a 3,0cm com EEC.
N2B	Linfonodos múltiplos ipsilaterais de até 6,0 sem EEC.
N2C	Metástases bilaterais ou contralaterais de até 6,0cm sem EEC.
N3A	Metástase em linfonodo maior que 6,0cm, Ausência de EEC.
N3B	Metástase em múltiplos linfonodos com EEC ou linfonodo único maior que 6,0cm com EEC ou linfonodo contralateral EEC

American Joint Committee on Cancer (AJCC). TNM Staging Classification for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (cSCC). 8th ed. Berlin: Springer; 2017.

Apêndice C - Estadiamento segundo a *American Joint Committee on Cancer*

E0	T1N0M0.
EI	T1N0M0.
EII	T2N0M0.
EIII	T2N1M0, T3N0M0, T2N1M0, T3N1M0.
EIV	T3N1M0, T4N1M0, T3N2M0, QUALQUER T, N3, QUALQUER M, T4, QUALQUER N, QUALQUER M, QUALQUER T, QUALQUER N, M1.

American Joint Committee on Cancer (AJCC). TNM Staging Classification for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (cSCC). 8th ed. Berlin: Springer; 2017.