



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

ISABELA FERREIRA CERATO

**AVALIAÇÃO DO PD-L1 EM LEUCOPLASIAS BUCAIS:
ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Araçatuba

2023

ISABELA FERREIRA CERATO

**AVALIAÇÃO DO PD-L1 EM LEUCOPLASIAS BUCAIS:
ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-
UNESP, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Professor Titular Glauco
Issamu Miyahara.

**Araçatuba
2023**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe, Juliana que não mediu esforços para que eu chegasse onde estou hoje, sempre apoiando, incentivando e fazendo tudo por mim.

À minha irmã e sócia nos doces por esses anos de trabalho juntas, pelas vezes que ela me "cobriu" para que eu pudesse ir na faculdade, ir no COB entre outros estágios que fiz nessa caminhada.

Ao meu namorado, Gabriel por toda paciência, ajuda, apoio e companheirismo.

Aos meus amigos de turma que fiz durante essa caminhada.

Agradeço ao Centro de Oncologia Bucal (COB) que me proporcionou grandes aprendizados e aos servidores técnico-administrativos de lá que sempre estiveram dispostos para que todo o trabalho funcionasse, em especial a Daniene que se tornou uma grande amiga nessa caminhada e a Adriana que é uma grande mãe para todos nós de lá.

À FAPESP, agência de fomento que nos ofereceu os recursos necessários para o desenvolvimento desse trabalho.

À PROEX que durante esses anos fui bolsista em alguns projetos.

À UNESP que me acolheu como aluna em 2017 e que agora se tornou o meu local de trabalho, sou imensamente grata por tudo o que tenho vivido aqui.

Aos meus colegas de trabalho da TRIAGEM e do CDMAC que me receberam tão bem.

Aos meus professores que me proporcionaram tanto conhecimento e aprendizado em especial ao Professor Glauco que me acolheu no COB em 2018 confiou em mim e me ofereceu grandes oportunidades, ao Professor Éder que compartilhou seu conhecimento teórico e prático comigo, ao Professor Daniel que também sempre esteve disposto e nos ajudou a realizar esse trabalho, ao Professor Vitor que também acompanhou minha trajetória no COB, à Professora Aline que me deu grandes ensinamentos, seja para a minha vida pessoal como na minha vida profissional e desde que a conheci sempre esteve ao meu lado me orientando e ajudando, e por último mas não menos importante à Professora Tamara que me ajudou desde o começo com esse trabalho sempre me orientando e fazendo o possível para que tudo desse certo.

Muito obrigada à todos, sou imensamente grata e não há palavras que possam descrever isso.

Cerato, I.F **Avaliação do PD-L1 em leucoplasias bucais: Análise imuno-histoquímica.** 2023. xxp.Trabalho de conclusão de curso-Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Os carcinomas espinocelulares de boca podem se desenvolver a partir de lesões potencialmente malignas (LPM), sendo a leucoplasia bucal (LB) a mais frequente.

O ligante 1 de morte celular programada (PD-L1) é um glicoproteína de superfície de membrana, frequentemente expresso em células apresentadoras de antígeno e até mesmo em células tumorais, sendo assim é considerado um importante ponto de verificação imunológico. A regulação positiva de PD-L1 poderia suprimir a ativação de células T e inibir as respostas imunes antitumorais. Estudos recentes demonstram que o excesso de PD-L1 no microambiente tumoral é considerado como fator prognóstico ruim. Para que intervenções prévias a malignizações sejam satisfatórias é necessário compreender os mecanismos imunoinibitórios em LPM. No entanto, a expressão do PD-L1 no microambiente de LB não foi esclarecida. Assim, esperamos a partir deste trabalho avaliar a expressão do PD-L1 e correlacionar com características demográficas, clinicopatológicas e biocomportamental de pacientes com LB. Este trabalho é estudo caso-controle constituído de 80 pacientes com LB e 47 pacientes saudáveis. A análise do PD-L1 foi realizada pela técnica de imuno-histoquímica e associada com as características demográficas, clinicopatológicas e biocomportamental adquiridas nos prontuários dos pacientes. Para análise estatística o teste qui-quadrado foi utilizado para analisar a diferença da expressão do PD-L1 nas células subepiteliais e nos scores do epitélio entre os grupos. Foi utilizado o teste qui-quadrado para analisar diferenças da expressão do PD-L1 nas células subepiteliais e intensidade de expressão epitelial entre variáveis demográficas, clinicopatológicas e biocomportamentais em pacientes com LB. Nossos resultados mostraram que pacientes do sexo masculino com LB apresentaram maior número de células subepiteliais expressas por PD-L1, em relação aos pacientes sexo feminino ($p=0,027$). Pacientes etilistas apresentaram uma maior quantidade de células subepiteliais expressas por PD-L1 em relação aos pacientes não etilistas ($p=0,002$). Pacientes elitistas apresentaram maiores scores de expressão epitelial por PD-L1 em comparação aos pacientes não etilistas ($p=0,006$). Pacientes com LB localizadas no lábio inferior apresentaram maior

quantidade de células expressas por PD-L1 em relação as demais localizações ($p=0,031$). Assim, variáveis demográficas, clinicopatológicos e biocomportamentais influenciaram a quantidade de células expressas subepiteliais e intensidade de expressão epiteliais por PD-L1 em LB.

Palavra-chave: Leucoplasia Bucal. Imuno-Histoquímica. Proteína PD-L1.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinomas can develop from potentially malignant lesions (PML), with oral leukoplakia (OL) being the most common. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) is a membrane surface glycoprotein, frequently expressed on antigen-presenting cells and even on tumor cells, and is therefore considered an important immunological checkpoint. Upregulation of PD-L1 could suppress T cell activation and inhibit antitumor immune responses. Recent studies demonstrate that excess PD-L1 in the tumor microenvironment is considered a poor prognostic factor. For interventions prior to malignancy to be satisfactory, it is necessary to understand the immunoinhibitory mechanisms in PML. However, the expression of PD-L1 in the OL microenvironment has not been clarified. Therefore, from this work we hope to evaluate the expression of PD-L1 and correlate it with demographic, clinicopathological and biobehavioral characteristics of patients with OL. This study is a case-control study consisting of 80 patients with OL and 47 healthy patients. PD-L1 analysis was performed using the immunohistochemistry technique and associated with demographic, clinicopathological and biobehavioral characteristics acquired from the patients' medical records. For statistical analysis, the chi-square test was used to analyze the difference in PD-L1 expression in subepithelial cells and epithelial scores between groups. The chi-square test was used to analyze differences in PD-L1 expression in subepithelial cells and epithelial scores between demographic, clinicopathological and biobehavioral variables in OL patients. Our results demonstrated that male patients with OL had a greater number of subepithelial cells expressed by PD-L1, compared to female patients ($p=0.027$). Alcoholic patients had a greater amount of subepithelial cells expressed by PD-L1 compared to non-alcoholic patients ($p=0.002$). Elitistic patients had higher PD-L1 epithelial expression scores compared to non-alcoholic patients ($p=0.006$). Patients with OL located in the lower laboratories had a greater number of cells expressing PD-L1 compared to other locations ($p=0.031$). Thus, demographic, clinicopathological and biobehavioral variables influenced the amount of subepithelial expressed cells and the intensity of epithelial expression by PD-L1 in OL.

Keywords: Oral Leucoplakia. Immunohistochemistry. PD-L1 Protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotomicrografia em microscopia com aumento de 400x mostrando a intensidade da expressão epitelial para a proteína PD-L1.....	16
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Porcentagem de células positivas em pacientes com leucoplasia bucal e o grupo controle.....	19
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características sociodemográficas, clínico-patológicas e de estilo de vida dos pacientes com leucoplasia bucal.....	18
Tabela 2- Expressão epitelial do PD-L1 em pacientes com leucoplasia bucal e grupo controle.....	20
Tabela 3- Associação de características sociodemográficas, clínico-patológicas e de estilo de vida com expressão de PD-L1 em leucoplasia bucais.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

CEC Carcinoma Espinocelular

LB Leucoplasia Bucal

LPM Lesões Potencialmente Malignas

OMS Organização Mundial da Saúde

PD-L1 Ligante de Morte Celular Programada

UNESP Universidade Estadual Paulista

COB Centro de Oncologia Bucal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PACIENTES E MÉTODOS.....	14
2.1 Desenho do estudo e participantes	14
2.2 Variáveis demográficas, clínicopatológicas e biocomportamentais.	14
2.3 Imuno-histoquímica	14
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Características dos pacientes	17
3.2 Células subepiteliais expressas por PD-L1 em pacientes com e sem leucoplasia bucal.....	19
3.3 Expressão epitelial do PD-L1 em pacientes com e sem leucoplasia bucal.	19
3.4 Associação da expressão do PD-L1 nas células subepiteliais e epiteliais entre variáveis sociodemográficas, clínicopatológicas e biocomportamentais em pacientes com LB.	20
4 DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca representa um problema de saúde pública no mundo todo, uma vez que é o quinto tipo de câncer mais comum e está associado a baixas taxas de cura e sobrevida.¹⁻⁴ No Brasil, para o ano de 2023 foram estimados 10.900 novos casos de câncer de boca para homens e 4.200 novos casos da doença para mulheres.⁵ Dentre as malignidades que podem acometer a boca, o carcinoma espinocelular (CEC) é o mais comum, representando cerca de 95% de todas as lesões malignas dessa região. Sua etiologia é multifatorial, entretanto o tabagismo e etilismo são os principais fatores de risco para seu desenvolvimento. Até o presente momento as taxas de mortalidade de CEC de boca permanecem elevadas o que está relacionado a falta de modalidades terapêuticas eficazes e ausência de diagnósticos precoces.⁶

Os CEC de boca podem se desenvolver a partir de lesões potencialmente malignizáveis, que são lesões com risco de evolução maligna elevado comparado ao de outras lesões benignas e da mucosa bucal normal.^{3,4,7} dentre elas a leucoplasia bucal (LB) é a mais comum, representando 85% das mesmas.⁸ Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a LB é considerada como “placa branca que não pode ser caracterizada clínica ou patologicamente como nenhuma outra doença”.^{1-4,7,9} Sendo o exame histológico o exame de diagnóstico mais indicado para determinar o risco de transformação maligna da LB, baseado pelo grau de displasia epitelial presente no tecido.¹⁰⁻¹³ Das displasias que a LB apresenta cerca de 0,1 a 18% transformam-se em CEC de boca.¹⁴ No entanto, os mecanismos que impedem a progressão do desenvolvimento dessas lesões para CEC de boca permanecem incertos. Acredita-se que a LB pode aparecer na fase de equilíbrio da imunoedição do câncer, na qual o sistema imunológico adaptativo não consegue destruir a lesão, mas evita a invasão do estroma das células epiteliais displásicas¹⁴. Além disso, a transformação maligna da lesão pré-cancerosa pode igualar a progressão do desenvolvimento da lesão desde a fase de equilíbrio até a fase de escape¹⁴⁻¹⁵.

Nos últimos anos, vários estudos investigaram expressão de pontos de verificação inibitórios, incluindo PD-1/PD-L1 (morte programada/morte programada–ligante 1) em CEC de boca e em LB, no entanto possuem conclusões

inconsistentes.¹⁵⁻¹⁷ O PD-L1 é uma glicoproteína de superfície de membrana que se expressa em uma variedade de tipos de células, incluindo células T.^{18,19} O PD-L1 ao ligar-se ao seu receptor PD-1 encontrado na superfície dos linfócitos T imaturos tem a capacidade de inativá-los resultando em supressão da migração de células T no microambiente tumoral, proliferação e secreção de mediadores citotóxicos, e restrição de morte de células tumorais.²⁰ Assim, a alta expressão de PD-L1 está inversamente correlacionada com a infiltração de linfócitos do tipo células T citotóxicas CD8+, no microambiente tumoral em pacientes com CEC de boca.^{14,21,22,23} Dessa forma o eixo PD-1/PD-L1 formam um microambiente imunossupressor e causam o escape imunológico^{17,25}, culminando com um pior prognóstico para o paciente²². Estudos mostram que a expressão de PD-L1 no microambiente tumoral é considerada um marcador de ruim prognóstico para muitas neoplasias malignas, como o câncer de mama, esôfago, rins e CEC de boca.²²⁻²⁸

A partir destes achados, imunoterápicos que abordam a via PD-1/PD-L1 vem sendo desenvolvidos e podem representar uma nova modalidade de tratamentos.^{22,28,29} No entanto, a expressão do PD-L1 no microambiente de lesões potencialmente malignas ainda não foi totalmente esclarecida. Dessa forma analisar a expressão do PD-L1 em LB e sua associação com variáveis clínico-patológicas dos pacientes é necessária.

2 PACIENTES E MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo e participantes

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (CAAE:03876012.6.0000.5420) e o consentimento informado foi obtido de todos os participante.

O presente estudo se caracteriza como um estudo caso-controle de corte transversal, constituído por 80 pacientes contendo LB e 47 pacientes saudáveis. Os participantes com LB foram recrutados no Centro de Oncologia Bucal (COB), da Faculdade de Odontologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil. Os critérios de inclusão para pacientes com LB foram ter idade superior a 18 anos; ter diagnóstico definitivo de LB. Os critérios de inclusão para os voluntários do grupo controle foram necessitar procedimento cirurgirco (como cirurgia pré-protética). Foram excluídos pacientes com outras lesões orais ou que tivessem em processo de diagnóstico.

2.2 Variáveis demográficas, clinicopatológicas e biocomportamentais.

Os dados demográficas, clinicopatológicas e biocomportamentais foram extraídos dos prontuários clínicos dos pacientes com LB. As variáveis demográfica (idade, sexo e raça) clinicopatológicas (localização e grau de displasia epitelial) e biocomportamentais (histórico e intensidade de consumo de tabaco e álcool) foram obtidas na admissão dos pacientes. O grau de displasia epitelial foram classificadas histologicamente de acordo com a classificação da OMS para tumores de cabeça e pescoço 2017²⁹ realizados por um único patologista para todos os casos envolvidos neste estudo. A intensidade do consumo de tabaco e álcool foi avaliada por meio de uma escala de pontuação de 1 a 4 pontos de acordo com o número de cigarros ou doses de álcool consumidas por dia: fumante/bebedor, uso leve (1 a 10 cigarros/ 1 a 2 doses por dia), uso moderado (11 a 20 cigarros/3 a 4 doses por dia) e uso severo (mais de 20 cigarros/mas de 4 doses por dia).^{30,31}

2.3 Imuno-histoquímica

Cortes histológicos de LB (4µm) foram desparafinizados e reidratados para avaliação imuno-histoquímica. A recuperação do epítipo foi realizada com 3 tratamentos de aquecimento (100°C) de 4 min, com intervalos de 1 min, com tampão citrato de sódio (pH 6,0) em forno de microondas (potência de 760W). A atividade da

peroxidase endógena foi eliminada pelo tratamento com 3% de H₂O₂ por 20 min a 37°C. As seções foram então tratadas durante a noite a 4°C em uma câmara úmida com anticorpos primários para PD-L1 (clone 28-8, Abcam, Cambridge, Reino Unido; 1:400; 4°C durante a noite). Após tratamento com um anticorpo secundário (Histofine MULTI; Nichirei Biosciences INC., JP) por 30 minutos a 37 °C. Os cortes foram incubados com substrato cromogênico 3,3'-diaminobenzidina (kit de substrato DAB; DAKO, EUA) por 5 minutos. As reações foram interrompidas em água deionizada. A hematoxilina de Mayer, realizou contra-coloração por 20 segundos. Os cortes histológicos foram desidratados e cobertos com lamínula para exame microscópico. Para cada amostra foram processados controles positivo e controle negativo.

A expressão do PD-L1 nas células subepiteliais e no epitélio foram avaliadas separadamente²⁸ por um único pesquisador, cego para as características clínico-patológicas em cinco campos de alta ampliação (400x). A expressão do PD-L1 nas células subepiteliais foi avaliada pela contagem manual de células positivas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Rockville, MD; //imagej.net /ImagemJ). A expressão epitelial de PD-L1 foi avaliada de acordo com a intensidade da coloração e pontuada da seguinte forma: score 0, negativo; score 1, expressão epitelial fraca; score 2, expressão epitelial moderada; score 3, expressão epitelial forte¹⁵. (Figura 1)

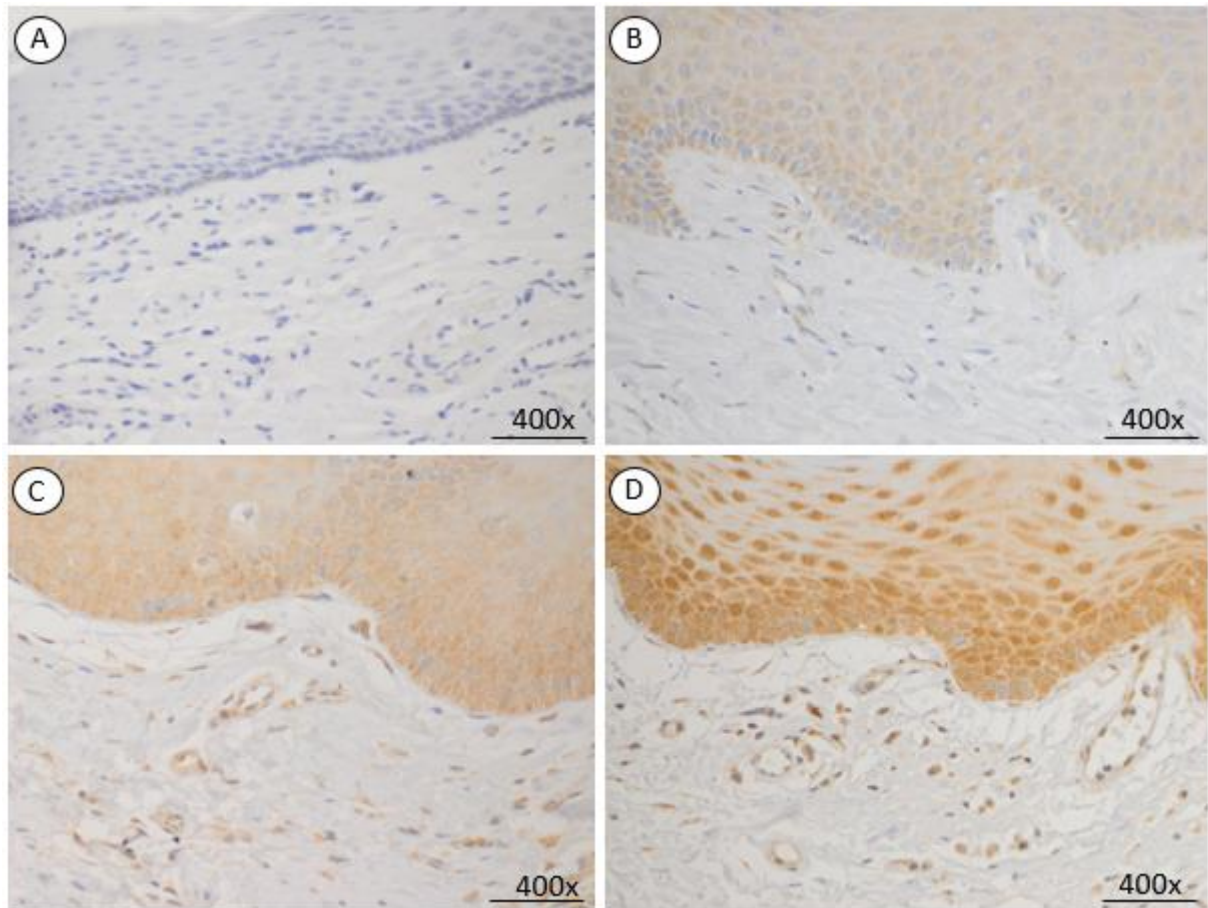


Figura 1. Intensidade da expressão epitelial para a proteína PD-L1. A. Expressão epitelial negativa (score 0). B. Expressão epitelial fraca (score 1). C. Expressão epitelial moderada (score 2). Expressão epitelial forte (score 3).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

2.3 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS (versão 18.0; SPSS Inc. Released, 2009). Inicialmente a análise descritiva foi realizada para variáveis demográficas, clinicopatológicas e biocomportamentais em paciente com LB. O teste qui-quadrado foi utilizado para analisar a diferença da expressão do PD-L1 nas células subepiteliais e no epitélio entre os grupos. Foi utilizado o teste qui-quadrado e ou teste exato de Fisher para analisar diferenças da expressão do PD-L1 nas células subepiteliais e no epitélio entre variáveis demográficas, clinicopatológicas e biocomportamentais em pacientes com LB. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) para todas as análises.

3 RESULTADOS

3.1 Características dos pacientes

Oitenta pacientes com LB (grupo caso) e 47 pacientes sem LB (grupo controle) foram incluídos no estudo. As características sociodemográficas, clinicopatológicas e biocomportamentais do grupo caso são descritos na Tabela 1. Dos 80 pacientes com LB, a maioria eram homens (60%), idosos (47,5%) e brancos (71,3%) (Tabela 1). A maioria dos pacientes eram tabagistas (61,3%). Em relação à intensidade de consumo de tabaco, 49% deles relataram consumo leve, 34,7% moderado e 16,3% severo. A maioria dos pacientes eram etilistas (41,3%), com histórico de consumo leve 62,1%, moderado 31%, e severo 6,9% de consumo de álcool (Tabela 1). A maioria das LB estavam localizada em mucosa jugal (26,3%), língua (21,3%) e gengiva (15%). Cinquenta e três (66,3%) das LB não apresentaram displasia epitelial. Das displasias epiteliais que a LB apresenta, 20% eram displasia epitelial baixa, 11,2% moderada e 2,5% severa (Tabela 1).

Tabela 1. Características sociodemográficas, clínico-patológicas e de estilo de vida dos pacientes com leucoplasia bucal.

Variáveis	Nº casos (%)
Média de idade	58,6 (18-60 anos)
Idade	
Jovem (<45 anos)	10 (12,5)
Adulto (45-59 anos)	32 (40)
Idoso (> 60 anos)	38 (47,5)
Sexo	
Masculino	48 (60)
Feminino	32 (40)
Raça	
Branco	57 (71,3)
Não branco	23 (28,7)
Status tabagismo	
Não tabagista	19 (23,8)
Tabagista	49 (61,3)
Ex-tabagista	12 (14,9)
Intensidade do tabagismo	
Leve	24 (49)
Moderado	17 (34,7)
Severo	8 (16,3)
Status etilismo	
Não etilista	34 (42,5)
Etilista	33 (41,3)
Ex-etilista	13 (16,2)
Intensidade do etilismo^a	
Leve	18 (62,1)
Moderado	9 (31)
Severo	2 (6,9)
Localização	
Mucosa jugal	21 (26,3)
Língua	17 (21,3)
Gengiva	12 (15)
Palato	12 (15)
Lábio	11 (13,7)
Assoalho bucal	7 (8,7)
Displasia epitelial	
Ausente	53 (66,3)
Baixa	16 (20)
Moderada	9 (11,2)
Severo	2 (2,5)
Total	80 (100)

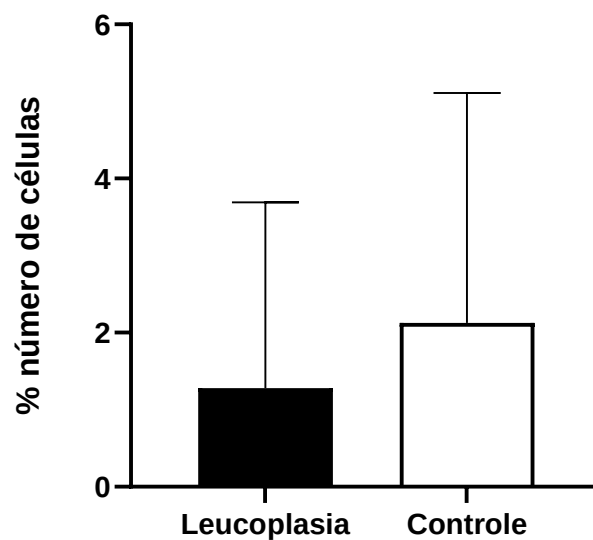
^aVariáveis com dados faltantes.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

3.2 Células subepiteliais expressas por PD-L1 em pacientes com e sem leucoplasia bucal.

Pacientes com LB apresentaram menor porcentagem de células subepiteliais expressas por PD-L1 em relação aos pacientes do grupo controle, porém este resultado não foi significativo ($p=0,0697$) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Porcentagem de células positivas em pacientes com leucoplasia bucal e o grupo controle.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

3.3 Expressão epitelial do PD-L1 em pacientes com e sem leucoplasia bucal.

Pacientes com LB apresentaram maior intensidade de expressão epitelial do PD-L1 em relação aos pacientes do grupo controle ($p=0,0455$) (Tabela 2).

Tabela 2. Expressão epitelial do PD-L1 em pacientes com leucoplasia bucal e grupo controle.

	Nº de casos	PD-L1 epitelial				P (χ^2)
		Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	
Leucoplasia bucal	80 (100%)	42 (53,8%)	15 (19,2%)	12 (15,4%)	9 (11,5%)	0,0455^a
Controle	47 (100%)	19 (40,4%)	13 (27,7%)	10 (21,3%)	5 (10,6%)	

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

3.4 Associação da expressão do PD-L1 nas células subepiteliais e epiteliais entre variáveis sociodemográficas, clinicopatológicas e biocomportamentais em pacientes com LB.

Pacientes do sexo masculino apresentaram maior número de células subepiteliais expressas por PD-L1, em relação aos pacientes do sexo feminino ($p=0,027$). Pacientes etilistas apresentaram uma maior quantidade de células subepiteliais expressas por PD-L1 em relação aos pacientes não etilistas ($p=0,002$). Pacientes elitistas apresentaram maior intensidade de expressão epitelial por PD-L1 em comparação aos pacientes não etilistas ($p=0,006$). Pacientes com LB localizadas no lábio inferior apresentaram maior quantidade de células expressas por PD-L1 em relação as demais localizações ($p=0,031$).

Tabela 3. Associação de características sociodemográficas, clínico-patológicas e de estilo de vida com expressão de PD-L1 em leucoplasia bucais.

Variáveis clínicopatológicas	Score PD-L1			Score PD-L1 epitelial				
Score	Negativo	Positivo	P (x²)	0	1	2	3	P (x²)
Sexo								
Masculino	21 (46,8)	25 (53,2)	0,027 ^a	22 (46,8)	11 (23,4)	7 (14,9)	7 (14,9)	0,343
Feminino	23 (71,9)	9 (28,1)		20 (64,5)	4 (12,9)	5 (16,1)	2 (6,5)	
Idade								
Adulto jovem	2 (22,2)	7 77,7)	0,059	3 (33,3)	2 (22,2)	1 (11,1)	3 (33,3)	0,217
Adulto meia- idade	18 (56,3)	14 (43,8)		15 (46,9)	6 (18,8)	7 (21,9)	4 (12,5)	
Idoso	25 (65,8)	13 (34,2)		24 (64,9)	7 (18,9)	4 (10,8)	2 (5,4)	
Raça								
Branco	32 (57,1)	24 (42,9)	0,960	31 (56,4)	9 (16,4)	8 (14,5)	7 (12,7)	0,722
Não-branco	13 (56,5)	10 (43,5)		11 (47,8)	6 (36,1)	4 (17,4)	2 (8,7)	
Status tabagismo								
Tabagista	24 (49)	25 (51)	0,080	15 (78,9)	2 (10,5)	1 (5,3)	1 (5,3)	0,338
Não Tabagista	15 (78,9)	4 (21,1)		22 (45,8)	11 (22,9)	9 (18,8)	6 (12,5)	
Ex-tabagista	6 (54,5)	5 (45,5)		5 (45,5)	2 (18,2)	2 (18,2)	2 (18,2)	
Intensidade tabagismo								
Leve	11 (47,8)	12 (52,2)	0,985	11 (47,8)	5 (21,7)	4 (17,4)	3 (13)	0,974
Moderado	8 (47,1)	9 (52,9)		7 (43,8)	3 (18,8)	4 (25)	2 (12,5)	
Severo	4 (44,4)	5 (55,6)		4 (44,4)	3 (33,3)	1 (11,1)	1 (11,1)	
Status etilismo								
Etilista	12 (37,5)	20 (62,5)	0,002 ^a	10 (31,3)	8 (25)	9 (28,1)	5 (15,6)	0,006 ^a
Não Etilista	27 (79,4)	7 (20,6)		25 (75,8)	6 (18,2)	1 (3)	1 (3)	
Ex etilista	6 (46,2)	7 (53,8)		7 (53,8)	1 (7,7)	2 (15,4)	3 (23,1)	
Intensidade etilismo								
Leve	8 (47,1)	9 (52,9)	0,105	5 (29,4)	6 (35,3)	3 (17,6)	3 (17,6)	0,181
Moderado	1 (11,1)	8 (88,9)		2 (22,2)	1 (11,1)	5 (55,6)	1 (11,1)	
Severo	0 (0)	2 (100)		0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	
Localização								
Mucosa Jugal	13 (61,9)	8 (38,1)	0,031 ^a	13 (61,9)	2 (9,5)	2 (9,5)	4 (19)	0,216
Língua	11 (68,8)	5 (31,3)		9 (56,3)	4 (25)	1 (6,3)	2 (12,5)	
Gengiva	8 (66,7)	4 (33,3)		7 (58,3)	2 (16,7)	3 (25)	0 (0)	
Palato	8 (66,7)	4 (33,3)		8 (72,7)	1 (9,1)	1 (9,1)	1 (9,1)	
Lábio	1 (9,1)	10 (90,9)		1 (9,1)	5 (45,5)	3 (27,3)	2 (18,2)	
Assoalho	4 (57,1)	3 (42,9)		4 (57,1)	1 (14,3)	2 (28,6)	0 (0)	
Displasia epitelial								
Sim	15 (57,7)	11 (42,3)	0,901	16 (61,5)	5 (19,2)	4 (15,4)	1 (3,8)	0,533
Não	29 (59,2)	20 (40,8)		25 (52,1)	10 (29,8)	6 (12,5)	7 (14,6)	
Grau de displasia								
Leve	10 (66,7)	5 (33,3)	0,126	9 (60)	4 (20,7)	2 (13,3)	0 (0)	0,653
Moderada	3 (33,3)	6 (66,6)		5 (55,6)	1 (11,1)	2 (22,2)	1 (11,1)	
Severa	2 (100)	0 (0)		2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

^a p<0,05

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4 DISCUSSÃO

Atualmente estudos tem revelado que o nível de expressão da proteína PD-L1 está aumentado em várias doenças malignas humanas, incluindo CEC de boca²⁵⁻²⁸. Até o momento, os estudos que analisaram o PD-L1 em lesões potencialmente malignas demonstram que a proteína PD-L1 foi significativamente maior em LB em comparação com as amostras normais^{14,34}. Estudos avaliaram a expressão do PD-L1 em diferentes tipos de doença na boca incluindo a LB e gengiva inflamatória. Os resultados mostraram que existia uma maior expressão de células subepiteliais do PD-L1 em LB em relação a gengiva inflamatória³⁷. Nossos resultados não corroboram com esses achados, uma vez que não houve diferença estatística para porcentagem de células subepiteliais em ambos os grupos.

A relação entre a expressão do PD-L1 e parâmetros clínicos e biocomportamentais, é um tema controverso¹⁴. O efeito do tabaco foi avaliado na expressão do PD-L1 na transformação maligna de LB. Os resultados mostraram que pacientes do sexo masculino tabagistas apresentaram maior quantidade de expressão do PD-L1 em LB¹⁵. Nossos resultados corroboram em parte com este estudo, uma vez que pacientes do sexo masculino com LB apresentam maior expressão de células subepiteliais para PD-L1 em relação ao sexo feminino. No entanto o tabaco não esteve associado com aumento da expressão subepiteliais para PD-L1, contudo o alcoolismo mostrou associação.

Está bem estabelecido que o risco de transformação maligna está associado à localização da LB, sendo a língua e assoalho os locais mais frequentes para malignidade¹⁰. Ries et al.³⁴ analisaram o eixo PD-1/PD-L1 na transformação maligna da LB e não encontraram associação significativa com a localização, sugerindo que este mecanismo é independente dele. Embora em nosso estudo o risco de transformação maligna da LB não tenha sido avaliado, o lábio inferior apresentou maior quantidade de células subepiteliais expressas por PD-L1.

O presente estudo tem algumas limitações. Primeiramente a dificuldade para quantificação das células expressas por PD-L1, uma vez que sua expressão se dá em uma variedade de tipos de células, incluindo músculo, hepatócitos, células epiteliais e endoteliais, células B e T ativadas, mastócitos, células dendríticas e macrófagos^{28,17}. Outra limitação se deve ao fato de que nossas amostras de LB apresentavam poucas células displásicas, impossibilitando avaliar expressão do PD-

L1 entre os graus de displasias. É importante mencionar que as amostras de LB em sua maioria estavam localizadas na região de mucosa jugal, diferindo dos locais predominantes (língua, palato, assoalho), o que pode ter influenciado nossos resultados.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo revelou que pacientes do sexo masculino com LB e pacientes etilistas apresentaram maior quantidade de células subepiteliais expressas para PD-L1, além de pacientes etilistas apresentaram maiores scores para expressão epitelial para PD-L1. A localização que apresentou maior quantidade de células subepiteliais expressas para PD-L1 foi o lábio inferior. No entanto, não houve diferença na quantidade de células expressas para PD-L1 entre pacientes com LB e grupo controle. Assim variáveis demográficas, clinicopatológicas e biocomportamentais influenciaram a quantidade de células expressas subepiteliais e a intensidade de expressão epiteliais por PD-L1 em LB, porém novos estudos sobre o mecanismo do PD-L1 em LB ainda são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Singla S, Singla G, Zaheer S, Rawat DS, Mandal AK. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, c-erbB2 in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas. **J Cancer Res Ther.**14(2):388-393, 2018.
2. Liu W, Wang YF, Zhou HW, Shi P, Zhou ZT, Tang GY. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. **BMC Cancer.**10(1):1-6, 2010.
3. Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. **Mol Cancer.** 5:11, 2006.
4. Ganly I, Patel S, Shah J. Early stage squamous cell cancer of the oral tongue-
-clinicopathologic features affecting outcome. **Cancer.**1;118(1):101-11, 2012.
5. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2023.
6. Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. **Head Neck.**39(2):297-304, 2017.
7. Liu W, Wu L, Shen XM, Shi LJ, Zhang CP, Xu LQ, Zhou ZT. Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and CD133 correlate with a high risk of malignant transformation of oral leukoplakia. **Int J Cancer.**15;132(4):868-74, 2013.
8. Gonçalves AS, Mosconi C, Jaeger F, Wastowski IJ, Aguiar MCF, Silva TA, Ribeiro-Rotta RF, Costa NL, Batista AC. Overexpression of immunomodulatory mediators in oral precancerous lesions. **Hum Immunol.**78(11-12):752-757, 2017.
9. Bisht RS, Singh AK, Sikarwar V, Darbari A. Study over the clinical picture and histopathology of leukoplakia and to establish the correlation between causative factors in the patients of Garhwal hill region. **Natl J Maxillofac Surg.**4(2):177-180, 2013.
10. Van der Waal, I. Oral potentially malignant disorders: is malignant transformation predictable and preventable? **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** 19 (4):386-90, 2014.
11. Warnakulasuriya S, AriyawardanaA. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies.**J Oral Pathol Med.**45(3):155-66, 2016.
12. Warnakulasuriya S, Johnson N, Van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med.** 36(10):575-580, 2007.

13. Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. **Cochrane Database Syst Rev.**18;(4), 2006.
14. Chen XJ, Tanm YQ, Zhang N, He MJ, Zhou G. Expression of programmed cell death-ligand 1 in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia is associated with disease progression and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. **Pathol Res Pract.** 215 (6), 2019.
15. Yagyuu T, Hatakeyama K, Imada M, Kurihara M, Matsusue Y, Yamamoto K, Obayashi C, Kiritani T. Programmed death ligand 1 (PD-L1) expression and tumor microenvironment: Implications for patients with oral precancerous lesions. **Oral Oncology.**68:36-43, 2017.
16. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. **Cancer Immunol Immunother.**54(4):307-14, 2005.
17. Stasikowska-Kanicka O, Wągrowaska-Danilewicz M, Danilewicz M. CD8+ and CD163+ infiltrating cells and PD-L1 immunoexpression in oral leukoplakia and oral carcinoma. **APMIS.**126(9):732-738, 2018.
18. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol.**26:677–704, 2008.
19. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nat Immunol.**8:239–45, 2007.
20. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz H, Finio GD, Hamid S, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Corno G, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatri A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Correlatos preditivos de resposta ao anticorpo anti-PD-L1 MPDL3280. **A natureza em pacientes com câncer.**515 (7528): 563-7, 2014.
21. Zhu Q, Cai MY, Weng DS, Zhao JJ, Pan QZ, Wang QJ, Tang Y, He J, Li M, Xia JC. PD-L1 expression patterns in tumour cells and their association with CD8(+) tumour infiltrating lymphocytes in clear cell renal cell carcinoma. **J.Cancer.**10 (5) 1154–1161, 2019.
22. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Bin Amer S, Tulbah A, Ajarim D, Al-Tweigeri T, Dermime S. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. **Neoplasia.**8(3):190-8, 2006.
23. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, Higuchi T, Yagi H, Takakura K, Minato N, Honjo T, Fujii S. Programmed cell

- death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**.27;104(9):3360-5, 2007.
- 24.Chaves, ALF, Silva, AG, Maia, FM et al. Reduced infiltration of CD8+ T cells may be associated with malignant transformation into potentially malignant oral epithelial lesions. **Clin Oral Invest**. 23,1913–1919, 2019.
 - 25.Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, TokuraY.Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma.**Cancer**.1;116(7):1757-66, 2010.
 - 26.Taieb J, Moehler M, Boku N, Ajani JA, Yañez Ruiz E, Ryu MH, Guenther S, Chand V, Bang YJ. Evolution of checkpoint inhibitors for the treatment ofgastric tastatic cancer: current status and future perspectives. **Cancer Treat Rev**.66:104-113, 2018.
 - 27.Cho YA, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**.47(12): 1148-1153, 2011.
 - 28.Dave K, Ali A, Magalhaes M. Increased expression of PD-1 and PD-L1 in oral lesions progressing to oral squamous cell carcinoma: a pilot study. **Sci Rep**.16;10(1):9705, 2020.
 - 29.Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. **Oral Dis**.27(8):1947-1976, 2021.
 - 30.Sarafim-Silva BAM, Duarte GD, Sundefeld MLMM, Biasoli ÉR, Miyahara GI, Bernabé DG. Childhood trauma is predictive for clinical staging, alcohol consumption, and emotional symptoms in patients with head and neck cancer. **Cancer**.124:3684–3692, 2018.
 - 31.Figueira JA, Sarafim-Silva BAM, Gonçalves GM, Aranha LN, Lopes FL, Corrente JE, et al. Predisposing factors for increased cortisol levels in oral cancer patients. **Compr Psychoneuroendocrinol**.6;9:100110, 2022.
 - 32.Kouketsu A, Sato I, Oikawa M, Shimizu Y, Saito H, Takahashi T, Kumamoto H. Expression of immunoregulatory molecules PD-L1 and PD-1 in oral cancer and precancerous lesions: A cohort study of Japanese patients. **J Craniomaxillofac Surg**.47(1):33-40, 2019.
 - 33.Koo TK, Li MY. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. **J Chiropr Med**. 15(2):155-163, 2016.

34. Ries J, Agaimy A, Wehrhan F, Baran C, Bolze S, Danzer E, Frey S, Jantsch J, Möst T, Büttner-Herold M, Wickenhauser C, Kesting M, Weber M. Importance of the PD-1/PD-L1 Axis for Malignant Transformation and Risk Assessment of Oral Leukoplakia. **Biomedicines**.16;9(2):194, 2021.
35. Marziliano A, Teckie S, Diefenbach MA. Alcohol-related head and neck cancer: Summary of the literature. **Head Neck**.42(4):732-738, 2020.
36. Qiao B, Huang J, Mei Z, Lam AK, Zhao J, Ying L. Analysis of Immune Microenvironment by Multiplex Immunohistochemistry Staining in Different Oral Diseases and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Front Oncol**. 10:, 2020.
37. de Souza VG, de Lourdes Carvalho A, Miranda CSS, Cardoso LPV. Potential Histopathological and Immune Biomarkers in Malignant and Non-Malignant Oral Lesions. **J Oral Maxillofac Res**.13(4):e3., 2022.
38. Porter S, Gueiros LA, Leão JC, Fedele S. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**.125(6):603-61, 2018.
39. Soopanit T, Laokulrath N, Chayopasakul V, Pongsapich W. Prognostic value and clinicopathological status of PD-L1 expression and CD8+ TILs in oral squamous cell cancer patients with or without traditional risk factors. **Head Neck**.Apr;45(4):1017-1025, 2023.
40. Gonçalves AS, Oliveira JP, Oliveira CF, Silva TA, Mendonça EF, Wastowski IJ, Batista AC. Relevance of HLA-G, HLA-E and IL-10 expression in lip carcinogenesis. **Hum Immunol**.77(9):785-90, 2016.