KEILA TAIRA MACEDO

Estudo da concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias e a sua correlação com a progressão tumoral em pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cavidade bucal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Dr. Marcos Brasilino de Carvalho

São Paulo
2020

KEILA TAIRA MACEDO

Estudo da concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias e a sua correlação com a progressão tumoral em pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cavidade bucal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Dr. Marcos Brasilino de Carvalho

São Paulo
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Macedo, Keila Taira

Estudo da concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias e a sua correlação com a progressão tumoral em pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cavidade bucal / Keila Taira Macedo. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Coorientador: Marcos Brasilino de Carvalho.

Descritores: 1.Citocinas 2.Carcinoma de células escamosas 3.Neoplasias bucais 4.Metástase linfática 5.Biomarcadores 6.Progressão da doença

USP/FM/DBD-010/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

NOME: MACEDO, Keila Taira

Título: Estudo da concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias e a sua correlação com a progressão tumoral em pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cavidade bucal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais. Exemplos de superação e de força para lutar pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida, pois em todos os momentos, eles me sustentaram.

Aos meus pais Armando e Márcia, que sempre apoiaram meus sonhos e incentivaram a nunca desistir dos estudos, por investirem na minha educação e amparo durante todos esses anos. Obrigada por todos os abraços e por tornarem esse sonho realidade. A dedicação de vocês é o que me faz forte.

Aos meus irmãos Kátia, Felipe e Leonardo, por todo amor dedicado, tornando a caminhada mais leve. Obrigada por todas as vibrações em cada conquista.

Aos meus amados sobrinhos Beatriz, Elis e Augusto, por serem a razão dos meus sorrisos em meio a tantas turbulências. Vocês são a luz que me transforma.

Aos meus cunhados Natália e Marcel, por terem sido verdadeiros irmãos durante a minha jornada e terem me oferecido palavras de incentivo e alegria, tornando a vida mais divertida.

A todos os meus familiares pelo apoio dedicado e por compreenderem todos os momentos em que não pude estar presente.

Ao meu orientador Dr. Marcos Brasilino de Carvalho, excelente profissional que dedicou sua sabedoria à minha orientação, os ensinamentos sempre feitos com muita paciência e dedicação serão eternamente lembrados com felicidade. Ao senhor minha eterna gratidão e carinho.

Aos funcionários do Hospital Heliópolis, que me acolheram nessa jornada.

A todos os integrantes do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis por contribuírem para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório e Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis, em especial Dra. Ana Maria da Cunha Mercante e Paula Blandina Olga Chiappini por todo auxílio prestado e por terem tornado possível a confecção e análise de lâminas em HE.

Ao chefe de Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, Dr. Otávio Alberto Curioni, por todas as contribuições e ensinamento oferecidos durante o trabalho.

Aos professores, secretárias, técnicos e alunos do Programa em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por todo apoio prestado.

À Dra. Luisa Lina Villa e Dr. Roger Chammas por todas contribuições e palavras de incentivo durante essa caminhada. Em especial pela oportunidade de me candidatar a obtenção do título acadêmico pela Universidade de São Paulo.

Ao Laboratório de Análises Especiais (LAE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pelas análises realizadas na saliva e soro, em especial a Caroline Faria, que dedicou tempo e paciência para que eu pudesse aprender sobre a técnica xMAP.

À Dra. Mariana Barbosa de Souza Rizzo e demais amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis por me receberem de braços abertos e terem oferecido tanto aprendizado e apoio durante esses anos.

À Dra. Rossana Verónica Mendoza López por sua contribuição nas análises estatísticas e por todo aprendizado oferecido com tanto carinho e dedicação.

Aos amigos que tornaram a jornada da pós-graduação mais feliz e produtiva: Viviane Garla Roupa, Tarsila Guimarães Vieira da Silva, Jéssica de Lima, Fátima Santana e Nilza Dias.

Aos meus grandes amigos da vida, Vanessa, Bruna, Renan, Karina, Ana Carolina, Soraya, Jéssica e Jaíra, que deste o início torcem e incentivam a luta pela realização dos meus sonhos. A vibração positiva de vocês contagia.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro, tornando a execução desse trabalho possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

Agradecimento especial a todos os pacientes com câncer, em particular os participantes do estudo, que mesmo em um de seus momentos mais difíceis aceitaram olhar juntos comigo para um futuro melhor. Vocês me ensinaram uma nova maneira de enfrentar as adversidades da vida. A vocês minha eterna gratidão, admiração, carinho e desejos de boas energias em suas caminhadas.

“A intermitência do sonho é que nos permite suportar os dias de trabalho”.

Pablo Neruda

RESUMO

Macedo KT. *Estudo da concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias e a sua correlação com a progressão tumoral em pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cavidade bucal* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO. Citocinas são importantes mediadores na resposta imune, atuando na regulação, duração e intensidade dessa resposta. São consideradas proteínas de sinalização celular envolvidas na proliferação celular e angiogênese, podendo contribuir para a promoção e progressão das neoplasias. Estudos têm demonstrado o papel das citocinas como agentes que potencializam a progressão tumoral e possíveis biomarcadores para várias neoplasias. Portanto uma investigação sobre a atuação de citocinas inflamatórias pode contribuir não só para a determinação do prognóstico, mas também pode tornar possível uma personalização do tratamento oferecido.

OBJETIVOS. O objetivo do presente estudo foi avaliar a concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias em pacientes com carcinoma epidermoide bucal (CECB), correlacionando seus níveis com a presença de metástase linfonodal, padrão de invasão e sobrevida livre de doença. **MÉTODOS.** A amostra foi composta por 39 pacientes com CEC da cavidade bucal tratados cirurgicamente, compreendendo os sítios C02 (língua) e C04 (soalho), com os estágios patológicos pT1 a pT4. As análises das concentrações salivares e séricas das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β e TNF- α foram realizadas pela técnica *Multiple Analyte Profiling* (xMap) e o padrão de invasão avaliado pelas características do fronte de invasão na interface tumor/hospedeiro. **RESULTADOS.** A concentração salivar de IL-6 foi associada ao sítio tumoral ($p = 0,015$) e ao estágio pT ($p = 0,014$). A concentração salivar de TGF- β 2 foi associada ao estágio pT ($p = 0,031$), enquanto a concentração salivar de TGF- β 3 foi associada à espessura do tumor ($p = 0,049$). As concentrações séricas de IL-8 e IL-10 foram associadas apenas ao grau de diferenciação do tumor ($p = 0,009$ e $p = 0,013$, respectivamente). A mediana da concentração de TGF- β 3 foi significativamente associada ao estadiamento patológico ($p = 0,048$). A concentração sérica mediana de TNF- α foi significativamente associada à presença de invasão perineural ($p = 0,022$) e menor sobrevida global foi observada em pacientes com concentração sérica mediana de TNF- $\alpha \leq 2.565$ pg/ml em comparação com pacientes

com mediana da invasão perineural > 2.565 pg/ml ($p = 0,008$). Os resultados observados no presente estudo e na literatura existente para citocinas inflamatórias no CECB ainda são muito heterogêneos e apresentam resultados controversos quanto à progressão da doença e ao impacto do valor prognóstico dessas citocinas. Assim, novos estudos que investigam o papel das citocinas inflamatórias no CECB e avaliam seus mecanismos de ação durante a progressão da doença podem complementar significativamente a literatura existente. **CONCLUSÕES.** Não observamos possíveis associações entre as concentrações salivares e séricas de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) com metástase linfonodal, padrão de invasão e sobrevida livre de doença. No entanto, parâmetros importantes relacionados a um pior prognóstico em pacientes com CECB foram evidentes nesta casuística, indicando que estudos futuros são necessários para confirmar a relação dessas citocinas com a progressão da doença.

Descritores: Citocinas; Carcinoma de células escamosas; Neoplasias bucais; Metástase linfática; Biomarcadores; Progressão da doença.

ABSTRACT

Macedo KT. *Study of the salivary and serum concentration of inflammatory cytokines and the correlation with tumoral progression in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo"; 2020.

INTRODUCTION. Cytokines are important mediators in the immune response, acting on the regulation, duration and intensity of this response. Cell signaling proteins involved in the process of cell proliferation and angiogenesis are considered, contributing to the promotion and progression of the tumor. Studies have demonstrated the role of cytokines as potential biomarkers for squamous cell carcinoma (SCC) of the oral cavity and as agents that potentiate tumor progression. Therefore, an investigation on the performance of inflammatory cytokines may contribute not only to the prognosis but also make possible a personalization of the treatment offered. **OBJECTIVES.** The aim of the present study was to evaluate the salivary and serum concentration of inflammatory cytokines in patients with oral squamous cell carcinoma, correlating their levels with the presence of lymph node metastasis, invasion pattern and disease-free survival. **EXPERIMENTAL DESIGN.** The sample consisted of 39 patients with SCC of the oral cavity surgically treated, comprising the C02 (oral tongue) and C04 (floor of mouth) sites, with the pathological stages pT1 to pT4. The analysis of the salivary and serum concentrations of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β and TNF- α were performed by the Multiple Analyte Profiling (xMap) technique and the invasion pattern evaluated by the characteristics of the invasion front at the host/tumor interface. **RESULTS.** Salivary IL-6 concentration was associated with tumour site ($p = 0,015$) and pT stage ($p = 0,014$). Salivary TGF- β 2 concentration was associated with the pT stage ($p = 0,031$), while salivary TGF- β 3 concentration was associated with tumor thickness ($p = 0,049$). Serum IL-8 and IL-10 concentrations were associated only with the degree of tumor differentiation ($p = 0,009$ and $p = 0,013$ respectively). The median TGF- β 3 concentration was significantly associated with the pathological stage ($p = 0,048$). Median serum TNF- α concentration was significantly associated with the presence of perineural invasion ($p = 0,022$) and lower overall survival was observed in patients with median serum TNF- α concentrations ≤ 2.565 pg/ml compared to patients with perineural invasion median > 2.565 pg/ml ($p = 0,008$). The results observed in the

present study and in the existing literature for inflammatory cytokines in the OSCC are still very heterogeneous and present controversial results regarding disease progression and the impact of the prognostic value of these cytokines. Thus, new studies investigating the role of inflammatory cytokines in the OSCC and assessing their mechanisms of action during disease progression may significantly complement the existing literature. **CONCLUSIONS.** We didn't observe possible associations between salivary and serum concentrations of IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α and TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3) with lymph node metastasis, invasion pattern and disease-free survival. However, important parameters related to a worse prognosis in patients with OSCC were evident in this series, indicating that future studies are needed to confirm the relationship of these cytokines with disease progression.

Descriptors: Cytokines; Carcinoma, squamous cell; Mouth neoplasms; Lymphatic metastasis; Biomarkers; Disease progression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Pior padrão de invasão. (A) WPOI tipo 1; (B) WPOI tipo 2; (C) WPOI tipo 3; (D) WPOI tipo 4; (E) WPOI tipo 5 45
- Figura 2 -** Representação gráfica da concentração salivar de IL-6 e sua associação com o sítio da lesão 58
- Figura 3 -** Representação gráfica da concentração salivar de IL-6 e sua associação com o tamanho do tumor (classificação patológica) 58
- Figura 4 -** Representação gráfica da concentração salivar de TGF- β 2 e sua associação com o tamanho do tumor (classificação patológica) 58
- Figura 5 -** Representação gráfica da concentração salivar de TGF- β 3 e sua associação com a espessura do tumor 59
- Figura 6 -** Representação gráfica da concentração sérica de IL-8 e sua associação com o grau de diferenciação tumoral 64
- Figura 7 -** Representação gráfica da concentração sérica de IL-10 e sua associação com o grau de diferenciação tumoral 64
- Figura 8 -** Representação gráfica da concentração sérica de TNF- α e sua associação com a invasão perineural 64
- Figura 9 -** Representação gráfica da concentração sérica de TGF- β 3 e sua associação com o estágio patológico 65
- Figura 10 -** Representação gráfica de WPOI 2 representado por grandes blocos espiculados na frente de invasão (H.E. 200x) 65
- Figura 11 -** Representação gráfica de WPOI 3 representado por pequenos blocos com mais de 15 células tumorais na frente de invasão (H.E. 200x) 66

Figura 12 -	Representação gráfica de WPOI 4 representado por pequenos blocos com menos de 15 células tumorais ou células tumorais isoladas na frente de invasão (H.E. 200x)	66
Figura 13 -	Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função de tempo (meses)	68
Figura 14 -	Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função de tempo (meses) segundo a concentração mediana de TNF- α no soro	70
Figura 15 -	Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função de tempo (meses)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas, clínicas e de tratamento dos pacientes selecionados para o estudo	37
Tabela 2 -	Características histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico	38
Tabela 3 -	Características do desfecho da doença observado na última avaliação após o término do tratamento	39
Tabela 4 -	Concentração (pg/ml) máxima de cada citocina, segundo valores determinados no protocolo do fabricante	40
Tabela 5 -	Concentração salivar (pg/ml) das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1, 2 e 3 por paciente	47
Tabela 6 -	Concentração sérica (pg/ml) das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1, 2 e 3 por paciente	48
Tabela 7 -	Valores mínimo e máximo, média, desvio padrão e mediana da concentração salivar de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1,2 e 3 (n=39)	51
Tabela 8 -	Valores mínimo e máximo, média, desvio padrão e mediana da concentração sérica de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1,2 e 3 (n=39)	51
Tabela 9 -	Correlação entre as concentrações salivares e séricas das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1, 2 e 3	52
Tabela 10 -	Mediana da concentração salivar obtida das citocinas para as variáveis demográficas e clínicas	54

Tabela 11 - Mediana da concentração salivar obtida das citocinas para as variáveis histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico	55
Tabela 12 - Associação entre as concentrações salivares das citocinas e variáveis demográficas e clínicas	56
Tabela 13 - Associação entre as concentrações salivares das citocinas e variáveis histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico	57
Tabela 14 - Mediana da concentração sérica obtida das citocinas para as variáveis demográficas e clínicas	60
Tabela 15 - Mediana da concentração sérica obtida das citocinas para as variáveis histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico	61
Tabela 16 - Associação entre as concentrações séricas das citocinas e variáveis demográficas e clínicas	62
Tabela 17 - Associação entre as concentrações séricas das citocinas e variáveis histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico	63
Tabela 18 - Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação WPOI	66
Tabela 19 - Associação entre as concentrações salivares das citocinas e o pior padrão de invasão	67
Tabela 20 - Associação entre as concentrações séricas das citocinas e o pior padrão de invasão	67
Tabela 21 - Distribuição da sobrevida global (%) em 24 meses de seguimento em relação à mediana da concentração salivar das citocinas	68
Tabela 22 - Distribuição da sobrevida global (%) em 24 meses de seguimento em relação à mediana da concentração sérica das citocinas	69

Tabela 23 - Distribuição da sobrevida livre de doença (%) em 24 meses de seguimento em relação à mediana da concentração salivar das citocinas	71
---	----

Tabela 24 - Distribuição da sobrevida livre de doença (%) em 24 meses de seguimento em relação à mediana da concentração sérica das citocinas	72
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	<i>Antigen - presenting cells</i>
CEC	Carcinoma epidermoide
CECB	Carcinoma epidermoide da cavidade bucal
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
DCs	Dendritic cells (Células dendríticas)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	<i>Epithelial- mesenchymal transition</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GENCAPO	Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço
HE	Hematoxilina-eosina
HIF-1 α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha</i>
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL	Interleucina
IL-1Ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
IFN- γ	<i>Interferon γ</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LAE	Laboratório de Análises Especiais
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDSC's	<i>Myeloid-Derived supressor cell</i>
MEC	Matriz extracelular
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
NaOH	<i>Hidróxido de sódio</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
HCl	Ácido clorídrico
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>

P53	<i>Tumor supressor protein 53</i>
pg/ml	Picograma por mililitro
PGE	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i>
pTNM	Classificação patológica (T: Tumor primário/N: Linfonodos regionais/M: Metástase a distância)
ROC	<i>Receiver Operator Characteristic</i>
RPM	Rotação por minuto
SED	Sem evidências da doença
SMADs	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
STAT - 3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TAM's	<i>Tumor-Associated Macrophage</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor- β</i>
Th	<i>T cell helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumoral Necrosis Factor α</i>
Treg's	<i>T regulatory cell</i>
VCD	Vivo com doença
WPOI	<i>Worst Pattern of Invasion</i>
xMap	<i>Multiple Analyte Profiling</i>

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Carcinoma Epidermoide da Cavidade Bucal	21
1.2	Metástase	22
1.3	Sistema Imunológico	23
1.4	Citocinas Inflamatórias	26
1.4.1	Citocinas inflamatórias: mecanismos de ação e suas vias de sinalização	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	Geral	35
2.2	Específicos	35
3	MÉTODO	36
3.1	Local de estudo	36
3.2	Casuística	36
3.3	Coleta do material biológico	39
3.4	Análise das citocinas inflamatórias (Multiple Analyte Profiling)	40
3.4.1	Dosagem das isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3)	41
3.4.2	Dosagem de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β e TNF- α	42
3.5	Variáveis epidemiológicas e clínico-patológicas	43
3.6	Análise do pior padrão de invasão (WPOI)	44
3.7	Análises estatísticas	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Concentração salivar e sérica de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1β, TNF-α e TGF-β	47
4.1.1	Correlação da concentração salivar e sérica das citocinas com variáveis epidemiológicas e clínico-patológicas	53
4.1.2	Correlação da concentração salivar e sérica das citocinas com o pior padrão de invasão	65

4.2	Influência dos níveis salivares e séricos das citocinas na sobrevida	67
4.2.1	Influência do níveis salivares e séricos das citocinas na sobrevida global	67
4.2.2	Influência do níveis salivares e séricos das citocinas na sobrevida livre de doença	70
5	DISCUSSÃO	73
5.1	Concentrações salivares e séricas de citocinas inflamatórias	73
5.2	Concentração das citocinas e o pior padrão de invasão	76
5.3	Concentração das citocinas e metástases linfáticas	78
5.4	Concentração das citocinas e invasão perineural e espessura do tumor	83
5.5	Concentração das citocinas e sobrevida	84
6	CONCLUSÕES	89
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	90
	REFERÊNCIAS	91
	GLOSSÁRIO	103
	ANEXOS	104
	(A) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	104
	(B) Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	106
	(C) Resultados observados por diferentes autores para IL-6 segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos	109
	(D) Resultados observados por diferentes autores para IL-8 segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos	113
	(E) Resultados observados por diferentes autores para IL-10 segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos	115
	(F) Resultados observados por diferentes autores para IL-1 β segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos	116
	(G) Resultados observados por diferentes autores para TNF- α segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos	118
	(H) Resultados observados por diferentes autores para TGF- β segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos	120

1. Introdução

1.1. Carcinoma Epidermoide da Cavidade Bucal

As neoplasias malignas de cabeça e pescoço abrangem diversos tipos de tumores que acometem a cavidade oral, cavidade nasal, seios paranasais, faringe, laringe, tireoide e glândulas salivares. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estes sítios sediam aproximadamente 10% dos tumores malignos, sendo que as neoplasias da cavidade oral e orofaringe representam cerca de 5% destes. O carcinoma epidermoide (CEC) é o tipo histológico mais prevalente, representado por 90% a 96% dos tumores diagnosticados (AVI et al., 2012; CAMPANA; GOIATO, 2013)

O CEC da cavidade oral representa 2,20 % de todos os casos de câncer no mundo, sendo a 17^a neoplasia maligna que mais acomete a população, classificada como a 11^a neoplasia mais frequente em homens e a 19^a em mulheres (GLOBOCAN/IARC, 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) a estimativa de novos casos de câncer da cavidade oral para cada ano do triênio 2020-2022 no Brasil será de 11.180 em homens e 4.010 em mulheres, somando 15.190 novos casos (INCA, 2019).

Os fatores mais associados ao risco do desenvolvimento do carcinoma epidermoide de cavidade bucal (CECB) são o tabagismo, etilismo, más condições socioeconômicas e o Papiloma Vírus Humano (HPV) (CANCELA et al., 2010; BOING et al., 2011; PURDUE et al., 2009; AVI et al., 2012; INCA, 2019).

O sistema de classificação TNM é bastante útil, tanto como critério de escolha do melhor esquema terapêutico quanto na avaliação do prognóstico. Entretanto, as dimensões e extensão do tumor primário, o número e tamanho dos linfonodos comprometidos são variáveis que não têm sido suficientes para o estudo da resposta terapêutica considerando que frequentemente pacientes com tumores classificados dentro do mesmo estágio clínico, submetidos ao mesmo tratamento, apresentam resultados muito diversos tanto quanto ao controle da lesão primária quanto da doença metastática (PINDBORG; WAHI, 1997; EDGE et al., 2010; ALMANGUSH et al., 2015; HORI et al., 2017; SHIMIZU et al., 2018).

Ao lado disto, a despeito do avanço tecnológico que nas últimas décadas colocou à disposição da medicina inúmeros e sofisticados recursos terapêuticos, os pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço e, particularmente aqueles com

lesões primitivas da orofaringe ou da cavidade bucal, foram beneficiados ainda de forma muito modesta se considerarmos os índices de controle ou de cura da doença. A literatura continuamente acrescenta variáveis que estariam relacionadas aos resultados observados, mas principalmente confirma o quanto deve ser multifatorial o estudo do prognóstico destes pacientes.

Tem ganhado espaço crescente entre as publicações o relato de estudos do papel do sistema imunológico nos resultados observados no tratamento dos pacientes com câncer. Se células tumorais remanescentes progridem após um tratamento adequado com intenção curativa elas dispõem de mecanismos de escape do sistema imune ou apresentam baixa antigenicidade para desencadear uma resposta do hospedeiro.

1.2. Metástase

As neoplasias malignas podem ser caracterizadas por apresentar capacidade de metastatizar, ou seja, invadir os tecidos anatomicamente distantes para então implantar e crescer. Neste processo complexo e seletivo, as células tumorais deixam seu local primário, escapando da vigilância imunológica e disseminam por diversas vias (LONGATTO et al., 2007; MANTOVANI, 2009; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; SUHAIL et al., 2019).

A disseminação de células neoplásicas a partir do tumor primário inclui diversos mecanismos celulares (MASSAGUÉ; OBENAU, 2016; SUHAIL et al., 2019). O desenvolvimento de metástases é um processo que apresenta diversos passos, abrangendo a infiltração local de tecidos adjacentes pela célula tumoral; migração transendotelial de células neoplásicas para o interior dos vasos (intravasação); sobrevivência na corrente circulatória; extravasação e proliferação subsequente no órgão alvo e colonização no local secundário (ZIJL et al., 2011; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017). Esta sequência de eventos tem início no momento em que as células neoplásicas perdem a adesão celular, adquirindo a capacidade de ultrapassar a membrana basal e sintetizar enzimas que degradem a matriz extracelular (MEC). Neste processo ocorre a transição epitélio-mesenquimal (EMT) que na última década foi reconhecida como um dos eventos mais importantes na progressão do tumor e desenvolvimento de metástases. A transição epitélio-mesenquimal é um fenômeno biológico caracterizado por uma conversão fenotípica

das células do câncer, no qual uma célula epitelial polarizada sofre alterações bioquímicas, moleculares e morfológicas, o que resulta na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, que apresenta alta capacidade de migração, invasão e resistência à morte celular programada (apoptose) (LONGATTO et al., 2007; KALLURI; WEINBERG 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011; ZIJL et al., 2011; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; SUHAIL et al., 2019).

1.3. Sistema Imunológico

O sistema imunológico no geral, tem a função de gerar uma proteção ao indivíduo contra infecções e eliminar antígenos estranhos ao corpo. Porém, em outro ponto é reconhecido como um importante eixo que atua na regulação do surgimento de neoplasias e no desenvolvimento de metástases. A interação existente entre o infiltrado de células inflamatórias e células estromais no microambiente tumoral ainda é complexa e a inflamação apresenta duplo papel, podendo este ser pró e antitumorigênico (VAN GORP; LAMKANFI, 2019).

Essa atuação do sistema imune no processo carcinogênico se dá através da falha desse sistema, podendo ocorrer a geração de mecanismos de escape tumoral ou deficiência imune do organismo. Infecções virais também são relacionadas ao desenvolvimento de tumores, como, por exemplo, o HPV (FERREIRA; ROCHA, 2004).

Os constituintes celulares do sistema imunológico são gerados a partir da diferenciação de células-tronco hematopoéticas na medula óssea. Essas células dão origem aos precursores mieloides e linfoides. Os precursores mieloides podem se diferenciar em monócitos, eritrócitos, granulócitos, dentre outras. Já os precursores linfoides se diferenciam em células *Natural Killer* (NK) e em linfócitos B e T. Os linfócitos B se diferenciam na medula óssea e passam por seguidos estágios de rearranjo gênico, passando pelo estágio de células B imaturas até atingirem o estágio de linfócitos B maduros, para então serem ativados após encontro com antígeno específico. Os linfócitos T se diferenciam e maturam no timo, onde passam também por uma série de rearranjos gênicos levando à expressão de seu receptor e a processos de seleção que irão gerar os linfócitos T maduros, que podem se diferenciar em dois tipos celulares diferentes: os linfócitos T CD4⁺ chamados de T *helper* ou auxiliares (Th) e os linfócitos T CD8⁺ que são ligados a atividades de citotoxicidade

(FERREIRA; ROCHA, 2004).

A resposta imunológica pode apresentar uma primeira linha de defesa rápida, mas pouco específica, chamada de imunidade inata, seguida de uma segunda linha de defesa chamada imunidade adaptativa que apresenta grande capacidade de resposta específica. Os componentes do sistema imune, seja o inato ou adaptativo, são os principais na imunovigilância e imunoedição do câncer. Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos juntamente com as células NK, são as responsáveis pelo reconhecimento de antígenos na superfície de células neoplásicas induzidas por infecção viral ou agente químico. Linfócitos T CD8⁺ efetores são produtores de citocinas, como *Tumoral Necrosis Factor α* (TNF- α), *Interferon γ* (IFN- γ) e linfotoxinas que exercem papel antitumoral. Por meio da produção de citocinas, linfócitos T CD4⁺ desempenham papel fundamental na manutenção da expansão clonal linfocitária e na indução de uma resposta inflamatória. Quando ativados, os linfócitos T CD4⁺ produzem altos níveis de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), TNF- α e interleucina-2 (IL-2). A produção destas citocinas podem determinar a comunicação entre resposta imune e adaptativa, fundamentais para uma resposta antitumoral competente (FERREIRA; ROCHA, 2004).

A evasão do sistema por tumores abrange diversos mecanismos, podendo ocorrer a falha de células apresentadoras de antígenos (APCs) que desencadeiam as respostas de células T antitumorais. Linfócitos B que comumente atuam como uma população pró-tumoral promovendo a progressão da doença por meio de secreção de IgG e ativação de células inflamatórias e assim causando a inflamação crônica. Também podem atuar secretando citocinas que inibem a ativação de células T, contribuir para a promoção da angiogênese e sobrevivência celular no microambiente tumoral e apresentar antígenos tumorais que irão atuar nas respostas regulatórias. As células dendríticas (DCs) são consideradas a população mais eficiente para ativar células T *naïve*, DCs e seus precursores, sendo moduladas por tumores e mostrando ter um fenótipo tolerogênico em pacientes com câncer (DE VISSER; KORETS; COUSSENS, 2005; GUNDERSON; COUSSENS, 2013; ROSSETI et al., 2018).

A inflamação não é o único fator, mas é considerado um agente facilitador para que a carcinogênese ocorra. O patologista Rudolf Virchow em 1863 citou a importante relação entre inflamação e câncer, caracterizando a inflamação como uma condição promotora tumoral que contribui para aquisição de capacidades

funcionais de sobrevivência e proliferação de células tumorais (CRUSZ e BALKWILL, 2015).

Os tecidos neoplásicos apresentam inflamação crônica e supressão da imunidade adaptativa, caracterizada pela desregulação da sinalização de citocinas, quimiocinas e pelo recrutamento e diferenciação de células imunossupressoras como macrófagos associados ao tumor (TAM's), células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSC's) e células T regulatórias (Treg's). (MANTOVANI et al., 2008; CURRAN et al., 2010; BARKER, 2015; ALVAREZ et al., 2017; FILLEY; DEY, 2017; ROSSETI et al., 2018; VAN GORP; LAMKANFI, 2019).

A inflamação associada ao câncer pode se desencadear por duas vias: a via extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca é alavancada por condições inflamatórias e infecciosas que podem aumentar o risco de desenvolvimento do câncer em diferentes locais anatômicos (cólon, próstata e pâncreas). Já a via intrínseca é alavancada por alterações genéticas que levam à inflamação. Estas alterações incluem a ativação de diversos oncogenes por meio de mutações, rearranjos ou amplificações cromossômicas e a inativação de genes supressores de tumor. Tanto a via extrínseca, quanto a via intrínseca convergem, resultando na ativação de fatores de transcrição, principalmente *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B), *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT-3) e *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α). Todos esses fatores citados contribuem para a produção de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas e quimiocinas, que também participam da produção de *Cyclooxygenase-2* (COX2) que, por sua vez produz as prostaglandinas (PGE). (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; MANTOVANI et al., 2008). A COX2 é superexpressa em processos inflamatórios e, nos tumores, esse aumento da expressão contribui com a inibição da apoptose, crescimento celular e aumento da invasão e angiogênese. Essa superexpressão é observada com o aumento dos níveis de prostaglandina E2 (PGE2) e esses níveis tem sido relatados no CEC de cabeça e pescoço. (GALLO et al., 2002; LIN et al., 2002; WANG et al., 2009). A PGE2 contribui para o crescimento celular, inibição da apoptose, angiogênese e promove a invasão celular, favorecendo o desenvolvimento de metástases (WANG et al., 2009). Gallo et al. (2002) investigaram a relevância prognóstica da ativação da via COX-2 no CEC de cabeça e pescoço e relataram a associação da COX2 e PGE2 a fatores de pior prognóstico, como presença de metástase linfonodal, estágios avançados e sobrevida reduzida, indicando que

esses componentes desempenham importante papel na progressão tumoral e que possuem importância prognóstica e terapêutica.

Alguns estudos têm investigado a expressão de fatores inflamatórios no microambiente tumoral e na concentração sérica e salivar de pacientes com câncer, especificamente naqueles com câncer de cabeça e pescoço (SAHEBJAMEE et al., 2004; ARELLANO-GARCIA et al., 2008; HAMAD et al., 2011; GONÇALVES et al., 2015). Uma alta expressão tecidual e concentração sistêmica de citocinas com papel imunossupressor têm sido observadas em pacientes com câncer comparados a controles saudáveis. Além disso, os níveis de citocinas têm sido correlacionados com variáveis clínicas, histopatológicas e com a sobrevida em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal (CHANG et al., 2011; GONÇALVES et al., 2015).

O estudo de um perfil da concentração salivar e sérica de citocinas com papéis ao menos parcialmente conhecidos na imunorregulação poderá gerar uma potencial ferramenta não invasiva de predição do desenvolvimento de metástases de pacientes com CEC da cavidade oral.

1.4. Citocinas Inflamatórias

Apesar de toda melhora observada no diagnóstico e tratamento dos pacientes, a evolução do CECB tratado com intenção curativa, ainda apresenta uma taxa média de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 50%, podendo ser considerada insatisfatória (BRAY et al., 2018). Altas taxas de mortalidade no CECB são observadas principalmente devido à invasão e metástase das células tumorais e atualmente alguns estudos têm mostrado a importância do microambiente tumoral inflamatório e sua associação com o desenvolvimento, invasão e metástase (BARKER et al., 2015; SEMENZA; RUVOLO, 2015; SPILL et al., 2016; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; SUHAIL et al., 2019).

Dentre os componentes de grande influência nesse microambiente tumoral, podemos citar as citocinas, que são pequenas proteínas imunomoduladoras solúveis expressas na membrana plasmática ou secretadas no ambiente extracelular. São consideradas importantes mediadoras na resposta imune, atuando na regulação, duração e intensidade por meio de ligações a receptores específicos das células vizinhas às células efectoras, afetando o seu comportamento biológico, podendo inibir ou promover o desenvolvimento e progressão tumoral. As citocinas atuam na

sinalização intercelular podendo contribuir para a sobrevivência, crescimento, proliferação, diferenciação, mutação e na mobilidade de células neoplásicas e estromais. Além disso, podem regular a comunicação entre células neoplásicas e estromais e as interações tumorais com a matriz extracelular (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; LAMKANFI; DIXIT, 2014; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

As citocinas começaram a ser descritas na década de 50. O fator de crescimento nervoso (sigla em inglês, NGF) foi descoberto por Levi-Montalcini e Hamburger (1951). O pirogênio endógeno, provavelmente idêntico ao que chamamos de IL-1, foi descrito por Bennett e Beeson (1953) e o *Interferon* (IFN) foi identificado por Isaacs e Lindenmann (1957). Já o TNF foi originalmente descrito na década de 1970 por Carswell et al. (1975) como um importante mediador da necrose induzida por lipopolissacarídeos (LPS) de tumores transplantáveis. Durante as décadas seguintes muitas outras citocinas foram descobertas, tendo sido classificadas em categorias, segundo sua origem em diferentes tipos celulares, suas ações refletidas em seus nomes (estimulador ou inibidor). Foi também constatado que suas ações poderiam estar relacionadas entre si (NATHAN e SPORN, 1991).

A literatura disponível mostra diversas citocinas inflamatórias atuando na desregulação imunológica no CECB e estas citocinas, que podem ser produzidas ou secretadas por células tumorais e por leucócitos associados a tumores, representam importantes agentes na evolução de uma neoplasia. Várias citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias são reconhecidas como potenciadoras no desenvolvimento do câncer ou supressoras tumorais. Citocinas como TNF- α e IL-6 podem contribuir para o recrutamento de células para o local da inflamação e favorecer a sobrevivência celular (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; TAKAMUNE et al., 2008; FURUTA et al., 2012). A Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-8 (IL-8) também são descritas como citocinas de papel pró-inflamatório, que atuam no aumento da angiogênese. IL-1 β ainda pode atuar na capacidade migratória e aumentar a agressividade de células neoplásicas de pacientes com CEC bucal (LEE et al., 2014). Citocinas como interleucina-10 (IL-10) e *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) podem atuar como citocinas supressoras na promoção da imunidade antitumoral, apresentando papel anti-inflamatório que pode contribuir no bloqueio de atividades que interferem na progressão tumoral, como por exemplo no processo angiogênico e formação de metástases (VICARI; TRINCHIERI, 2004; LEE ; MARGOLIN, 2011; AZIZ et al., 2015).

A IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β possuem papel importante em efeitos locais e sistêmicos da imunidade inata e adaptativa (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; LI et al., 2012). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, que possui pleiotropia em diversos tipos de células. Liberada por células da imunidade inata e adaptativa está associada ao processo de angiogênese, ao crescimento, à sobrevivência e migração de células neoplásicas, além de contribuir para a promoção de metástases e progressão do tumor (NEURATH; FINOTTO, 2011; WALDNER et al., 2012; GOPINATHAN et al., 2015). Níveis séricos elevados de IL-6 têm sido relacionados a um prognóstico desfavorável em diversos tipos de câncer; exemplos são o câncer de próstata, de ovário e colorretal (WALDNER et al., 2012; MACCIÒ e MADEDDAU, 2013; NGUYEN et al., 2014). Em pacientes com CECB foram observados níveis séricos e salivares elevados quando comparados aos controles, sugerindo um possível papel no aumento da patogenicidade, fornecendo uma vantagem no crescimento tumoral (MICHALAKI et al., 2004; SCHAFER; BRUGGE, 2007; HAMAD et al., 2011; WALDNER et al., 2012; NGUYEN et al., 2014). Cottin et al. (2018) em recente estudo publicado, observaram em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (língua, gengiva, orofaringe, hipofaringe e laringe) níveis séricos aumentados de IL-6 relacionados ao aumento da idade e ao gênero masculino. Outra observação feita por Cottin et al. (2018) mostrou que a exposição cumulativa ao tabagismo foi significativamente associada de maneira dose-dependente com os níveis séricos aumentados de IL-6, indicando uma relação de causalidade entre tabagismo e o status desta citocina em pacientes com CEC de cabeça e pescoço.

Diversas publicações correlacionam os níveis de IL-6 na saliva e no soro entre portadores de câncer de cabeça e pescoço e controles saudáveis. Esses estudos já deixaram claro que esta citocina possui valor relevante como um biomarcador prognóstico. Neste sentido, Riedel et al. (2005) observaram em pacientes com CEC de cabeça e pescoço, correlação entre a concentração sérica de IL-6, o estágio tumoral avançado e linfonodos positivos, o que refletiria uma atividade proliferativa do tumor. As concentrações séricas observadas poderiam ser úteis como marcador biológico na identificação de tumores avançados em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Porém, estudos que descrevem a ação de IL-6 no processo metastático e sua influência na sobrevida livre de doença em pacientes com CECB ainda são escassos.

A IL-8 pertence à subfamília de quimiocinas CXC, sendo associada com a promoção da quimiotaxia de neutrófilos, na proliferação de células neoplásicas e metástase (WAUGH; WILSON, 2008). Geralmente é sintetizada por monócitos em resposta à presença de LPS, IL-1 e TNF- α , atuando na resposta pró-inflamatória. Associada a tumores, a IL-8 pode agir como um fator regulador de grande importância dentro do microambiente tumoral, pois atuam na proliferação celular, migração e invasão. (FREUND et al., 2003; WAUGH; WILSON, 2008; CHEN et al., 2014).

Um dos primeiros estudos que mostrou a relação entre níveis séricos elevados de IL-8 e pacientes com CECB foi realizado por John et al. (2004). Eles investigaram os níveis de IL-6 e IL-8 na saliva e no soro de pacientes com CEC da cavidade bucal e orofaringe com estágio pT1 e pT2 e observaram que os níveis séricos de IL-6 e os níveis salivares de IL-8 dos casos eram significativamente maiores que os níveis do grupo controle. Por outro lado, Gokhale et al. (2005) não relataram diferenças significativas nos níveis de IL-8 no soro entre pacientes com CECB e controles, porém quando comparados os níveis séricos de IL-8 de controles saudáveis com os de portadores de recidivas e metástase, os valores foram estatisticamente significativos. Em estudo realizado por Sahebamee et al. (2008), no qual foram investigadas as concentrações salivares de TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IL-8 em pacientes com CECB e em controles saudáveis os resultados foram diferentes. Somente IL-6 apresentou níveis elevados e estatisticamente significativos quando comparados com o grupo controle. Em contraste ao observado para IL-6, os níveis de TNF- α , IL-1 α e IL-8 foram aumentados no grupo controle em comparação aos pacientes com CECB, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Os estudos correlacionando concentrações séricas e salivares de IL-8 em pacientes com CECB são crescentes e os resultados observados variam, indicando a necessidade e importância de novas investigações para determinar os valores limiares desses biomarcadores elevados no CECB e para determinar se somente um único biomarcador é suficiente para indicar doença em atividade ou se existe a necessidade de diversos biomarcadores utilizados em painel. Além disso, pesquisas correlacionando os níveis desta citocina na saliva e no soro em diferentes estágios da doença, com a presença de metástase e com a sobrevida livre de doença ainda se mostram necessários para melhor compreensão do papel desta citocina no comportamento biológico do CECB (JOHN et al., 2004; GOKHALE et al., 2005;

ARELLANO-GARCIA et al., 2008; SAHEBJAMEE et al., 2008; HAMAD et al., 2011; BAPAT et al., 2016;).

TNF- α juntamente com a IL-1 desempenha diversas atividades biológicas com propriedades pró-inflamatórias e é produzida principalmente por macrófagos, linfócitos e monócitos, tendo como principal estímulo, a presença de LPS bacterianos. Normalmente TNF- α não é detectada no plasma e no soro de pessoas saudáveis, porém em casos avançados de câncer seus níveis podem ser elevados, indicando um prognóstico ruim. A literatura tem referido níveis séricos elevados de TNF- α em pacientes com câncer nos ovários, renal, de mama e próstata, sendo neste último caso, observado em pacientes com estágio avançado da doença (MICHALAKI et al., 2004; BALKWILL, 2006). Em pacientes com CECB, encontramos relatos de níveis elevados de TNF- α no soro e saliva em comparação a controles saudáveis (JABLONSKA et al., 1999; RHODUS et al., 2005; BRAILO et al., 2012; JURETIC et al., 2013). Segundo a literatura pequenas doses de TNF- α no microambiente tumoral podem levar ao aumento da proliferação celular, invasão e metástase, aumento dos glóbulos brancos, contribuir na formação de vasos sanguíneos, além de atuar na regulação positiva de outras citocinas e na EMT (HO et al., 2012). SahebJamee et al. (2004) observaram que a concentração salivar de TNF- α em pacientes portadores de CECB foi elevada quando comparada a controles saudáveis, porém não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Já em um estudo realizado por Zhou et al. (2017) foi observado que TNF- α pode promover a invasão e metástase no CECB e que esse efeito está possivelmente associado à ativação da via de sinalização de NF- κ B. Waters et al. (2013) destacam que, admitindo-se que TNF- α desempenha um papel de mediador inflamatório que pode desencadear o EMT no microambiente tumoral e promover metástases, esta citocina pode ser considerada um componente chave e de importante valor prognóstico no CECB.

A IL-1 β é produzida principalmente por macrófagos, queratinócitos e células tumorais e liberada após a ativação do inflamassoma (complexo de detecção de agentes patogênicos multiproteico no sistema imunitário inato). Inflamassomas são associados à carcinogênese e à manutenção do microambiente tumoral, podendo executar um papel importante no desenvolvimento e progressão do tumor, contribuindo na inflamação, nas respostas imunes e homeostase do tecido. Esta citocina pode agir sobre diversos tipos celulares, seja individualmente ou em conjunto com outras citocinas inflamatórias (LAMKANFI; DIXIT, 2014). Tem sido encontrada

em níveis elevados em diversos tipos de câncer como, por exemplo, no câncer de colo do útero, de mama e CEC de cabeça e pescoço e, segundo a literatura, tumores que produzem IL-1 apresentam mau prognóstico (DINARELLO, 2010; SORIA et al., 2011; BRAILO et al., 2012; LEE et al., 2017). Segundo Arellano-Garcia et al. (2008) pacientes com CECB apresentam valores elevados de IL-1 β na saliva e a observação desses níveis quando confrontados com o grupo controle se mostrou discriminatório para o diagnóstico. O aumento dessa citocina indica um microambiente inflamatório que promove a angiogênese e a transição epitélio-mesenquimal, processo pelo qual as células epiteliais se tornam independentes para migração, invasão e metástase (LEE et al., 2014).

Goertzen et al. (2018) observaram que pacientes com CECB apresentam aumento significativo na concentração salivar das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α quando comparadas com o grupo controle e que a utilização dessas citocinas como possíveis biomarcadores do prognóstico apresenta grande potencial. Para confirmar os achados, os autores realizaram sequenciamento do mRNA da linhagem UMSCC1 estimulada pelo TNF α e observaram regulação positiva de dois genes (S100A8 e S100A9) relatados como biomarcadores salivares para o CECB. A expressão desses genes mostrou induzir monócitos e macrófagos infiltrantes de tumor, contribuindo no aumento da invasão e ocorrência de metástases.

O TGF- β e a IL-10 são citocinas imunorreguladoras e imunossupressoras, que propiciam a falha da resposta imune antitumoral local, produzidas dentro do microambiente tumoral e que estão envolvidas no processo de evasão do tumor.

O TGF- β é classificado como uma citocina multifuncional produzida principalmente por células Treg (CD4⁺ CD25⁺), macrófagos, plaquetas, fibroblastos, queratinócitos, células dendríticas e por células tumorais (DERYNCK et al., 2001; ZAMARRON; CHEN, 2001; GOUMANS et al., 2002; JAKOWLEW, 2006; LIN ; KARIN, 2007; MASSAGUÉ, 2008; YANG et al., 2010). É capaz de conduzir vários aspectos na função celular, como a proliferação, diferenciação, migração, apoptose, adesão, angiogênese, vigilância imunológica e a sobrevivência celular. Todas as ações do TGF- β dependem de fatores como o tipo de célula, das condições de crescimento e da presença de outros fatores de crescimento polipeptídicos. Através de um mecanismo autócrino de ação, TGF- β pode levar a efeitos biológicos como a inibição da proliferação da maioria das células epiteliais normais e isso indica um papel supressor de tumor para esta citocina. A perda de atividade autócrina ou capacidade

de resposta ao TGF- β exógeno parece proporcionar algumas células epiteliais com uma vantagem de crescimento que contribui para a progressão maligna, sugerindo além de um papel supressor de tumor, um papel pró-oncogênico para TGF- β (JAKOWLEW, 2006). Foi descrito que no CECB, TGF- β promove a proliferação celular, invasão celular, metástase e confere resistência a drogas e representa um importante alvo terapêutico (KUDINOV; BECK, 2018).

A IL-10 é produzida por várias populações de células (macrófagos, linfócitos T e B, mastócitos, eosinófilos, queratinócitos e células tumorais) (ASADULLAH et al., 1999). Pode atuar inibindo a produção de novos vasos sanguíneos dentro do tumor, agindo a favor do crescimento tumoral ou afetando as células imunes infiltradas. A inibição da angiogênese também pode ocorrer por meio de redução do número de macrófagos no tumor. Citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 também estão envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos e podem ter sua expressão diminuída pela IL-10 (STEARNS et al., 1999; HAMZAVI et al., 2013). Gonçalves et al. (2015) estudando pacientes com CECB encontraram níveis elevados de IL-10 na saliva e essa alta concentração permitiu distinguir pacientes com a neoplasia de indivíduos saudáveis. A IL-10, se presente em níveis elevados em pacientes com CECB, está relacionada a um pior prognóstico, de forma que leva à imunossupressão, invasão tumoral e metástase (HATANAKA et al., 2000; NEMUNAITIS et al., 2001; GHOLAMIN et al., 2009; EMMERICH et al., 2012).

Segundo Aziz et al. (2015) todas as citocinas (IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1RA) analisadas na saliva de pacientes com CEC bucal estavam aumentadas em comparação aos controles, sendo que os níveis salivares de IL-10 e IL-13 apresentaram diferença estatisticamente significativa. Apesar de não observarem associação significativa em relação ao grau de diferenciação histológica ou tabagismo, os autores sugerem o papel potencial dessas citocinas como biomarcadores do CEC oral e classificam como de grande relevância e importância novas investigações a respeito do papel de citocinas imunossupressoras na detecção precoce e na progressão da doença.

1.4.1. Citocinas Inflamatórias: mecanismos de ação e suas vias de sinalização

Por meio de diferentes mecanismos como a indução da instabilidade genômica, alterações epigenéticas que levam à expressão inapropriada de genes,

estímulo de proliferação persistente e resistência à apoptose, o favorecimento da angiogênese e a promoção de invasão e metástase, o processo inflamatório acaba assim por contribuir para o processo carcinogênico (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; MANTOVANI et al., 2008).

Citocinas inflamatórias podem causar danos ao DNA. São exemplos a produção de TNF- α , IL-1 β e PGE2 por leucócitos que podem induzir à produção de óxido nítrico (NO) e ativação de HIF-1 α , que levam à inibição do reparo do emparelhamento errôneo de DNA. Este tipo de reparo corrige pares errôneos de bases e alças desemparelhadas na fita de DNA, que são causadas por erros de replicação ou lesões que impeçam a atividade replicativa da DNA polimerase (BALKWILL e MANTOVANI, 2001).

Outro importante dano causado é a inibição de p53, proteína supressora de tumor, que é um regulador chave em processos celulares como regulação do ciclo celular, reparo de DNA e indutor de apoptose. Por meio de ações de citocinas como IL-4, interleucina-13 (IL-13) e *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) o p53 pode ser inibido, contribuindo para supressão da apoptose (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; DAMICO et al., 2011; MULLER e VOUSDEN, 2013).

A ativação persistente de vias de sinalização como NF- κ B e STAT3, causadas por citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 podem levar à proliferação e sobrevivência celular, favorecendo o desenvolvimento tumoral. Em células neoplásicas e também em células inflamatórias em risco de transformação por agentes carcinogênicos, NF- κ B ativa a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, enzimas na via da síntese da PGE (por exemplo, COX2), *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) e fatores angiogênicos. STAT3 é constitutivamente ativado nas células neoplásicas e nas células imunes, atuando na oncogênese e inibição da apoptose. Em células neoplásicas sua ativação pode levar ao aumento da capacidade destas células para escapar do sistema imunológico, inibindo a maturação de células dendríticas e suprimindo a resposta imune (KARIN et al., 2006; MANTOVANI et al., 2008; RIUS et al., 2008; XIA et al., 2014; PARK; HONG, 2016).

Outra citocina importante e que atua na ativação de diversas vias, como *Phosphatidylinositol-3 Kinase* (PI3K), *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) e *Mothers Against Decapentaplegic Homolog* (SMADs) é o TGF- β . Esta citocina pode impulsionar vias de sinalização promotora de malignidade ou supressora de malignidade. Tais ações dependem de fatores epigenéticos, genéticos e do

microambiente. No tecido normal, TGF- β frequentemente atua na homeostase tecidual induzindo a apoptose, diferenciação e parada do ciclo celular. Em células pré-malignas e malignas, TGF- β desempenha papel supressor nos estágios iniciais da carcinogênese, porém pode ocorrer perda dessa função supressora tumoral e assim, TGF- β passa a assumir papel na sinalização em apoio ao fenótipo maligno. A mudança de sinalização pode ocorrer via regulação negativa de proteínas associadas ao TGF- β nos estágios iniciais e finais da tumorigênese, ou devido a combinações de mutações em oncogenes específicos (WRANA et al., 1992; MULLEN et al., 2011; MASSAGUÉ, 2012; HATA; CHEN, 2016; SANJABI et al., 2017; DAVID e MASSAGUÉ, 2018).

Embasado nessas informações descritas para as citocinas e em estudos que correlacionaram diversos tipos de câncer a um mau prognóstico e a metástases, o presente estudo espera encontrar associação entre níveis séricos e salivares de citocinas inflamatórias com papéis ao menos parcialmente conhecidos na imunorregulação e no desenvolvimento de metástases em pacientes com CECB. Isto poderá gerar uma potencial ferramenta não invasiva de predição do desenvolvimento de metástases de pacientes com CECB. Este estudo levanta a hipótese do paciente ser classificado não apenas pela extensão da sua neoplasia, mas também segundo um perfil salivar e sérico de citocinas que represente a condição do microambiente tumoral que pode influenciar no comportamento biológico e clínico do tumor. Esta caracterização poderá embasar uma decisão terapêutica mais adequada para cada paciente contribuindo para aproximação do objetivo de personalização do tratamento.

A compreensão dos diferentes papéis complexos dessas citocinas inflamatórias na progressão e na supressão tumoral no CEC de cavidade bucal adquire importância pela possibilidade de melhorar a avaliação do prognóstico e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas individualizadas, mas com a mesma eficiência oncológica e com menos efeitos adversos.

Uma investigação sobre a atuação de citocinas inflamatórias, que em estudos anteriormente realizados foram descritas como possíveis biomarcadores para outros tipos de câncer e consideradas como agentes que potencializam a progressão tumoral poderá ser de grande relevância, pois poderá contribuir como mais um fator prognóstico em busca uma desejada “desintensificação” do tratamento, tendência predominante entre as diretrizes atuais que defendem um protocolo terapêutico personalizado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar a correlação entre os níveis salivares e séricos de citocinas inflamatórias e o padrão de invasão na interface tumor/hospedeiro.
- Avaliar a correlação da concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias e a presença ou ausência de metástases para linfonodos cervicais.
- Analisar a influência dos níveis séricos e salivares das citocinas inflamatórias na sobrevida livre de doença.

3. MÉTODO

3.1. Local de Estudo

Os pacientes selecionados para o estudo foram atendidos no Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis, São Paulo, Brasil.

Os blocos parafinados resgatados, a confecção de lâminas em HE e exames anatomopatológicos foram realizados juntamente ao Laboratório e Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis.

As análises da saliva e do soro foram desenvolvidas no Laboratório de Análises Especiais (LAE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), no Laboratório de Biologia Molecular e Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis.

3.2. Casuística

Foram selecionados para o estudo 39 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade bucal confirmado histopatologicamente e que não tinham recebido tratamento prévio. Os casos incluídos no estudos foram atendidos e submetidos a tratamento cirúrgico com ou sem radioterapia e quimioterapia associados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis, entre os períodos de 2011 a 2017 e participantes do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (FAPESP nº 2010/05168-0), classificados pelo Código Internacional de Doenças (CID-10) compreendendo os sítios C02 (língua) e C04 (soalho de boca), e com estágio do tumor primário pT1 a pT4. Todas as características demográficas, clínicas e de tratamento dos pacientes selecionados são apresentados na tabela 1.

Foi concedida autorização pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para uso de material anteriormente coletado e levantamento de dados do prontuário médico, com a devida autorização do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, em 21 de setembro de 2017 sob o nº 2.289.565

Pacientes com histórico de neoplasias anteriores de qualquer outro sítio anatômico, infecção por HIV e diagnóstico de doenças autoimunes referidas foram excluídos do estudo. As informações clínicas, anatomopatológicas e de seguimento foram reavidas do prontuário médico.

Os pacientes previamente selecionados para participar do estudo foram convidados a responder um questionário para obtenção dos dados e todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) autorizando o uso científico do material biológico e de informações contidas no prontuário médico.

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e de tratamento dos pacientes selecionados para o estudo

Variável	Categoria	Freq. (%)
Idade (anos)	Variação	22 - 82
	Mediana	57
	Média (Desvio padrão)	56 (12,3)
Gênero	Masculino	35 (89,7)
	Feminino	4 (10,3)
Dentição ausente	Sim	10 (25,6)
	Não	29 (74,4)
Etnia	Branco	20 (51,3)
	Negro	7 (17,9)
	Pardo/Mulato	12 (30,8)
Tabagismo	Atual	25 (64,1)
	No passado	7 (18,0)
	Nunca	7 (18,0)
Etilismo	Atual	23 (59,0)
	No passado	11 (28,2)
	Nunca	5 (12,8)
Sítio da lesão	C02.1 - Borda da língua	19 (48,7)
	C02.2 - Face ventral da língua	5 (12,8)
	C04.0 - soalho anterior da boca	6 (15,4)
	C04.1 - soalho lateral da boca	9 (23,1)
Tratamento	Cirurgia	21 (53,8)
	Cirurgia + Radioterapia	13 (33,4)
	Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	5 (12,8)

As características histopatológicas obtidas por meio do exame do espécime cirúrgico e do desfecho da doença observados no último exame realizado garantindo

um seguimento mínimo de 24 meses para todos os casos são apresentadas nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2 - Características histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico

Variável	Categoria	Freq. (%)
Espessura do tumor (mm)	≤10	19 (48,7)
	>10	19 (48,7)
	Não avaliável	1 (2,6)
pT	pT1/pT2	27 (69,2)
	pT3/pT4	12 (30,8)
pN	N0	22 (56,4)
	N+	17 (43,6)
Estádio patológico	I/II	12 (30,8)
	III/IV	27 (69,2)
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	8 (20,5)
	Moderadamente diferenciado	27 (69,3)
	Pouco diferenciado	3 (7,7)
	Não avaliável	1 (2,5)
Invasão vascular sanguínea	Ausente	38 (97,4)
	Não avaliável	1 (2,6)
Invasão vascular linfática	Ausente	32 (82,0)
	Presente	5 (12,8)
	Não avaliável	2 (5,2)
Invasão perineural	Ausente	21 (53,9)
	Presente	17 (43,6)
	Não avaliável	1 (2,5)
Infiltrado inflamatório	Escasso	6 (15,4)
	Moderado	24 (61,5)
	Intenso	3 (7,7)
	Não avaliável	6 (15,4)
Margens cirúrgicas	Livres	31 (79,5)
	Comprometidas	4 (10,25)
	Não avaliável	4 (10,25)

Tabela 3 - Características do desfecho da doença observado na última avaliação após o término do tratamento

Variável	Categoria	Freq. (%)
Recidiva local	Sim	11 (28,2)
	Não	28 (71,8)
Recidiva Regional	Sim	6 (15,4)
	Não	33 (84,6)
Metástase a distância	Sim	7 (17,9)
	Não	32 (82,1)
Segundo tumor primário	Sim	1 (2,5)
	Não	38 (97,5)
Meses decorrido até recidiva	Variação	3,1 - 15,7
	Mediana	6,9
	Média (Desvio padrão)	8,1 (2,9)
Status na última avaliação	Vivo sem doença	20 (51,3)
	Vivo com doença	2 (5,1)
	Morte por câncer	15 (38,5)
	Morte por outras causas*	2 (5,1)
Tempo de seguimento		25 dias** - 87,2
	Variação	meses
	Mediana	27,2 meses
		35,9 (18,6)
	Média (Desvio padrão)	meses

*Data do óbito e meses de seguimento sem evidências da doença (15/04/2013 - 15 meses; 04/07/2018 - 15 meses)

** Se refere ao óbito pós-operatório

3.3. Coleta do material biológico

Para a dosagem de citocinas inflamatórias foram colhidas amostras de 8 ml de sangue periférico em tubo tratado com EDTA e amostras de 5 ml de saliva total não estimulada, acumulada por um período de 5 minutos pelo método do cuspe em tubo cônico com capacidade para 50 ml. Todas as coletas de material biológico foram realizadas antes do início do tratamento recebido. Os pacientes foram privados de comer, beber, fumar ou utilizar produtos de higiene oral por no mínimo 2 horas antes da coleta e, para reduzir a interferência do ciclo circadiano na composição da saliva e do soro, todas as coletas foram realizadas no período da manhã, entre 9 e 11 horas.

As amostras de sangue e saliva foram transportadas ao laboratório em gelo e imediatamente centrifugadas a 2000 *rpm*, 4°C por 10 minutos e 2600 RPM, 4°C por 20 minutos, respectivamente. Do plasma e do sobrenadante da saliva foram separadas alíquotas de 400 uL a fim de evitar ciclos de congelamento e descongelamento das amostras e, para melhor conservação das mesmas, a cada alíquota foram adicionados 0,8 uL de coquetel inibidor de proteases (Sigma®, #P8340). As alíquotas foram armazenadas a - 80°C para serem analisadas posteriormente e na medida do necessário para o estudo foram descongeladas em temperatura ambiente (18 – 25 °C) e utilizadas imediatamente.

3.4. Análise das citocinas inflamatórias (*Multiple Analyte Profiling*)

A análise das amostras de saliva e soro dos pacientes foi realizada pela metodologia *Multiple Analyte Profiling* (xMap). As citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β e TNF- α foram analisadas com o kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Standart 27-Plex, Group I (BIO-RAD, #64086282) e as três isoformas de TGF- β foram analisadas pelo kit Bio-Plex Pro™ TGF- β Standard 3-Plex (BIO-RAD, #64130734).

Valores abaixo da curva, foram corrigidos utilizando o método cúbico presente no Software de leitura do equipamento (Luminex XPONENT MAGPIX) que expande a curva. A utilização do branco fornece maior sensibilidade como o último ponto da curva mais baixo, quando valores estão abaixo dessa curva, o método cúbico torna a leitura possível mesmo daqueles valores abaixo da curva. Os valores máximos esperados para a concentração de cada citocina são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Concentração (pg/ml) máxima de cada citocina, segundo valores determinados no protocolo do fabricante

Citocina	Expectativa (pg/ml)	Região (BEAD)
IL-6	0,00 - 11,117	19
IL-8	0,00 - 18,289	54
IL-10	0,00 - 27,336	56
IL-1 β	0,00 - 3,992	39
TNF- α	0,00 - 68,937	36
TGF- β 1	0,00 - 26,688	13
TGF- β 2	0,00 - 18,925	72
TGF- β 3	0,00 - 17,128	66

O ensaio *xMap* baseia-se na técnica “sanduíche” convencional de dois-sítios, no qual um *mix* de microesferas é incubado com padrões e amostras em formato de placa com 96 poços. Nesta técnica, microesferas de poliestireno são coradas internamente por dois fluoróforos espectrais distintos e cada conjunto de microesferas está aderido ao anticorpo de captura específico. Este anticorpo de captura irá se ligar ao analito específico e para a detecção final é adicionado um terceiro marcador fluorescente (streptavidina ficoeritrina, sigla em inglês SA-PE) ligado ao anticorpo de detecção. A leitura das microesferas é realizada no equipamento Magpix com tecnologia xMAP (Luminex Corporation®, Austin, Texas, EUA), no qual um sistema de dois *lasers* é lançado sobre as microesferas. Enquanto estas se movimentam através do fluxo celular, um feixe de laser detecta a microesfera e o outro laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

Apesar do protocolo do fabricante especificar somente o soro e plasma como amostras validadas para a técnica, autores como Lee et al. (2017) e Arellano-Garcia et al. (2008) utilizaram a mesma metodologia para quantificação de citocinas na saliva e confirmaram que a tecnologia *xMAP* é tão eficaz quanto o ensaio de ELISA por meio de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) determinando a sensibilidade e especificidade da técnica.

3.4.1. Dosagem das isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3)

Para quantificação das isoformas de TGF- β , primeiramente o tampão de ensaio, tampão de lavagem e o diluente da amostra foram mantidos em temperatura ambiente e as amostras de saliva e soro foram descongeladas.

Foi preparada diluição seriada na proporção 1:4 e em branco (controle utilizando somente o tampão de ensaio), a mistura foi agitada em vortex por 5 segundos entre as transferências de líquidos.

Posteriormente ao descongelamento foram transferidos 25 μ l de volume da amostra em microtubos de 1,5mL e adicionado 5 μ l volume de N HCl para ativação de TGF- β . As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para que ocorresse a neutralização foi adicionado NaOH no mesmo volume do ativador, em seguida as amostras foram diluídas em 1:16. O volume final obtido foi de 400 μ l (35 μ l da amostra ativada e posteriormente inativada, e 365 μ l de diluente de amostras).

As microesferas magnéticas foram homogeneizadas em vortex por 30 segundo e diluídas na proporção de 1:20 no tampão de ensaio (288 µl de microesferas magnéticas e 5,472 µl de tampão de ensaio), etapa realizada ao abrigo de luz. Foram adicionados 50 µl de microesferas magnéticas em cada poço da placa de ensaio e a placa foi lavada duas vezes com 100 µl de solução de lavagem. As amostras, padrões e brancos foram homogeneizados em vortex, padrões e brancos, e adicionado 50 µl a cada poço; em seguida a placa foi coberta com uma fita adesiva de papel alumínio para abrigo da luz e incubada no agitador a 850 ± 50 rpm pelo período de 2 horas em temperatura ambiente. Com 10 minutos restantes na incubação, os anticorpos de detecção foram diluídos na proporção 1:2.

As placas foram lavadas três vezes com 100 µl de tampão de lavagem, e foram adicionados 25 µl de anticorpo de detecção em cada poço. Novamente a placa foi coberta e incubada a 850 ± 50 rpm pelo período de 1 hora em temperatura ambiente. Com 10 minutos restantes da incubação, a SA-PE foi diluída na proporção 1:100 (etapa realizada em abrigo da luz). Novamente as placas foram lavadas três vezes com 100 µl de tampão de lavagem e em seguida 50 µl de SA-PE foram adicionados a cada poço. As placas foram cobertas e incubadas a 850 ± 50 rpm durante 30 minutos em temperatura ambiente e passado o período, foram realizadas mais três lavagens e as microesferas magnéticas ressuspensas em 125 µl de tampão de ensaio, cobertas com a fita de vedação e incubadas novamente por 30 segundos. Por fim, a fita de vedação foi retirada e a leitura das placas realizada no equipamento Magpix.

3.4.2. Dosagem de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β e TNF- α

Para a quantificação das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β e TNF- α foi seguido o protocolo estabelecido pelo fabricante. O tampão de ensaio, tampão de lavagem e o diluente da amostra foram mantidos em temperatura ambiente.

Um frasco de padrão foi reconstituído em 500 µl de diluente semelhante à matriz de amostra final. Homogeneizado em vortex por 5 segundos e incubado em gelo durante 30 minutos.

Foi preparada diluição seriada na proporção de 1:4 e em branco (controle utilizando apenas o tampão de ensaio) e foi realizada a mistura (vortex) por 5 segundos entre as transferências de líquidos. As microesferas magnéticas foram misturadas em vortex por 30 segundo e diluídas na proporção de 1:10 no tampão de

ensaio (575 µl de microesferas magnéticas e 5,175 µl de tampão de ensaio), etapa realizada ao abrigo da luz. Em seguida foram adicionados 50 µl de microesferas magnéticas em cada poço das placas de ensaio, que foram lavadas duas vezes com 100 µl de tampão de lavagem.

As amostras, padrões e brancos foram agitadas e 50 µl foi adicionado a cada poço. A placa foi coberta com fita de vedação para proteção contra a luz e incubada no agitador a 850 ± 50 rpm pelo período de 30 minutos em temperatura ambiente. Com 10 minutos restantes na incubação, os anticorpos de detecção foram diluídos na proporção 1:10.

As placas foram lavadas três vezes com 100 µl de tampão de lavagem e em seguida foram adicionados 25 µl em cada poço. A placa foi coberta com a fita de vedação e incubada no agitador a 850 ± 50 rpm pelo período de 30 minutos em temperatura ambiente. Com 10 minutos restantes da incubação, a SA-PE foi diluída na proporção 1:100 com proteção contra a luz. Novamente as placas foram lavadas três vezes com 100 µl de tampão de lavagem e em seguida 50 µl de SA-PE foram adicionados a cada poço. As placas foram cobertas e incubadas a 850 ± 50 rpm durante 10 minutos em microesferas magnéticas; foram ressuspensas em 125 µl de tampão de ensaio, cobertas com a fita de vedação e incubadas novamente por 30 segundos. Por fim, a fita de vedação foi retirada e a leitura das placas foi realizada no equipamento Magpix.

3.5. Variáveis epidemiológicas e clínico-patológicas

As variáveis epidemiológicas consideradas para o presente estudo foram idade, gênero, etnia, tabagismo e etilismo. Todas as informações foram informadas pelo paciente após o diagnóstico de CEC de cavidade bucal e antes do início do tratamento. Para variáveis como tabagismo e etilismo, foi feita uma categorização, no qual foi considerado como ex-fumante ou ex-etilista, o paciente que referiu o período de mais de um ano sem fumar ou consumir bebidas alcoólicas. Já aqueles pacientes que fumavam ou consumiam bebidas alcoólicas por no mínimo um ano ou menos, foram classificados como tabagista ou etilista atual.

As variáveis clínico-patológicas levadas em consideração para o estudo foram o sítio da lesão, estágios pT e pN, espessura do tumor, estágio patológico, grau histológico de diferenciação, invasão vascular sanguínea e linfática, invasão

perineural e infiltrado inflamatório. Os dados da avaliação foram considerados os informados no laudo original e prontuário médico.

Foram incluídos no estudo pacientes classificados pelo Código Internacional de Doenças (CID-10) compreendendo os sítios C02.1 (borda da língua), C02.2 (face ventral da língua, C04.0 (soalho anterior da boca) e C04.1 (soalho lateral de boca).

O estágio patológico considerou a classificação histopatológica pós-cirúrgica (pTNM), utilizando informações e evidências obtidas de exames realizados anteriormente ao tratamento, sendo complementadas ou atualizadas por novas informações oriundas do exame histopatológico obtido de peça cirúrgica (BRIERLEY et al., 2016)

3.6. Análise do Pior Padrão de Invasão (WPOI)

Os blocos e as lâminas dos pacientes previamente selecionados foram levantados do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital Heliópolis e revistos por uma única patologista. Uma lâmina de cada paciente foi selecionada e foi realizada a avaliação de todas as lâminas disponíveis representativas do tumor em microscópio óptico no aumento de 100x. A seleção teve como base, quando possível, buscar a lâmina representativa do tumor e da região da frente de invasão, além do epitélio escamoso normal e, em seguida o seu respectivo bloco separado. Todas as lâminas foram coradas previamente pelo método de hematoxilina e eosina e as que não estavam em boas condições técnicas, tiveram seu bloco correspondente aprofundado e as novas lâminas avaliadas.

O WPOI foi baseado nas características da frente de invasão na interface tumor/hospedeiro segundo os critérios validados por Brandwein-Gensler et al. (2005, 2010), que apresentam cinco categorias de classificação segundo o pior padrão de invasão. Para a avaliação do WPOI foram utilizados os critérios histológicos apresentados no quadro 1 e figura 1. O WPOI considerado foi aquele de maior classificação entre as categorias observadas presentes na lâmina de HE, não importa o quão focal. Todas as lâminas selecionadas tiveram seus cortes histológicos mensurados em área (cm²) e calculado a porcentagem de tumor representado no fragmento.

Quadro 1 - WPOI (Pior Padrão de Invasão)

TIPO 1 (<i>Pushingborder</i>)	Representa a invasão em que o tumor “empurra” o tecido do hospedeiro em uma frente ampla
TIPO 2 (<i>Finger-likegrowth</i>)	Representa a invasão tumoral em “dedos” largos que “empurram” o tecido do hospedeiro ou grandes ilhas tumorais separadas e com aspecto estrelado
TIPO 3 (<i>Large separate islands, more than 15 cells per island</i>)	Representa ilhas invasivas de tumor com mais de 15 células por ilha
TIPO 4 (<i>Small tumor islands, 15 cells or fewer, per island</i>)	Representa ilhas invasivas de tumor com 15 ou menos células por ilha
TIPO 5 (<i>Tumor satellites, equal to or greater than 1 mm away from main tumor</i>)	Representa um padrão de infiltração amplamente disperso com tumores satélites de qualquer tamanho com 1mm ou mais de distância da interface tumor/hospedeiro

Figura 1 - Pior Padrão de Invasão. (A) WPOI tipo 1; (B) WPOI tipo 2; (C) WPOI tipo 3; (D) WPOI tipo 4; (E) WPOI tipo 5

Fonte: Brandwein-Gensler et al. (2005, 2010)

3.7. Análises estatísticas

As concentrações salivares e séricas da IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e das três isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) foram expressas em pg/ml. Para realizar as análises das associações entre as concentrações salivares e séricas destas citocinas com as características epidemiológicas e clínico-patológicas, foram estabelecidas as medianas de cada concentração observada. Para o presente estudo, classificou-se como alta expressão valor maior do que a mediana e baixa expressão o valor igual ou menos do que a mediana.

As variáveis categóricas e as medidas observadas de variabilidade das variáveis numéricas são apresentadas segundo sua distribuição de frequências. A mediana das variáveis numéricas foi considerada como ponto de corte para as análises.

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a existência de distribuição normal dos dados das concentrações de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e das três isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) no soro e saliva. Foram aplicados os testes não paramétricos U Mann-Whitney, teste exato de Fisher ou o teste qui-quadrado (χ^2) de Pearson, conforme apropriado, para avaliar a associação das medianas das concentrações das citocinas no soro e saliva com variáveis clínicas e histopatológicas.

Para verificar a correlação entre as concentrações das citocinas no soro e saliva foi aplicado o teste de correlação de Spearman.

Para estimar a probabilidade de sobrevida global e sobrevida livre de doença foi aplicado o teste Kaplan-Meier e para verificar a diferença entre as curvas de sobrevida para uma mesma variável o teste de logrank foi aplicado.

Na análise de sobrevida dos 39 casos foram considerados somente os casos com data de realização de cirurgia até maio de 2017 para que se pudesse contabilizar o período mínimo de 24 meses de seguimento.

Para estimar a sobrevida livre de doença foi considerado o período livre de recidivas decorrido entre a data da cirurgia e a data de diagnóstico da recidiva local ou a distância.

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa IBM SPSS 20.0 (IBM Corporation, New York, USA), sendo considerado o nível de significância de $p < 0.05$ para todos os testes estatísticos.

4. RESULTADOS

4.1. Concentração salivar e sérica de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β

Os valores das concentrações salivares e séricas das citocinas observados para cada paciente participante do estudo são apresentados nas tabelas 5 e 6 respectivamente. Devido à grande variação das concentrações salivares e séricas de todas as citocinas, a mediana foi adotada como valor de corte para as correlações feitas entre concentrações e variáveis demográficas, clínicas e histopatológicas.

Tabela 5 - Concentração salivar (pg/ml) das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1, 2 e 3 por paciente

ID*	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	TGF- β 1 (pg/ml)	TGF- β 2 (pg/ml)	TGF- β 3 (pg/ml)
0014	28,32	23,19	1,68	9,29	18,83	1,61	490,24	8,67
0016	620,84	21,46	3,95	367,46	49,24	97,67	2381,50	24,87
0020	51,00	29,21	2,10	24,03	27,37	0,00	1738,50	36,04
0021	196,08	40,45	2,87	319,19	360,75	393,05	1038,50	30,67
0025	1,89	20,60	1,00	7,13	3,48	3,32	502,77	17,11
0029	37,36	55,92	1,12	7,43	15,76	530,30	1985,00	22,70
0031	3,48	36,92	0,95	37,29	26,05	99,77	1032,15	14,66
0035	365,46	100,62	1,52	115,99	118,30	1,19	554,19	20,04
0041	1464,50	1373,50	23,47	847,20	1150,00	1375,50	1535,50	46,00
0048	40,12	7,87	1,67	14,49	19,41	9,07	760,55	29,48
0057	466,92	312,00	1,96	189,12	144,53	5,48	1415,50	28,89
0058	741,47	222,42	1,43	252,25	90,83	53,07	2040,50	14,66
0062	200,70	90,89	0,96	68,10	110,82	14,92	1031,85	23,28
0072	81,08	222,26	1,56	173,43	202,82	672,72	688,39	12,21
0077	145,37	253,03	1,64	340,80	171,07	4,60	846,05	17,11
0106	370,24	20,27	1,00	7,72	14,92	1734,50	2455,50	67,09
0120	69,76	589,64	0,89	13,05	61,66	5,91	165,64	16,80
0134	12,30	58,60	1,74	50,06	76,58	0,85	195,73	12,21
0148	252,92	21,60	1,51	40,86	43,28	0,00	772,87	10,44
0155	96,65	18,28	0,93	6,07	17,78	10,96	1073,00	23,28
0161	6,53	226,04	4,68	221,28	241,71	0,00	60,03	74,35
0170	737,83	549,04	3,82	362,37	192,59	1,49	1185,00	10,44

Continua

Continuação

ID*	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	TGF- β 1 (pg/ml)	TGF- β 2 (pg/ml)	TGF- β 3 (pg/ml)
0171	465,79	43,55	0,57	16,07	88,16	630,64	2367,00	41,41
0172	23,15	94,45	2,25	192,13	250,57	10,75	1074,50	12,21
0176	321,83	102,38	1,24	54,12	30,83	0,32	600,31	14,66
0178	13,21	259,89	6,76	585,59	205,54	0,20	578,73	12,21
0184	512,70	71,39	0,49	63,63	45,07	382,38	771,23	12,55
0186	39,39	14,89	1,00	47,95	146,44	279,58	1253,50	17,11
0188	154,98	113,42	1,18	306,08	77,27	13,60	537,27	42,35
0192	200,29	353,53	22,05	757,37	345,38	767,64	1262,50	40,04
0193	887,76	340,32	1,46	112,68	124,19	0,04	1283,00	17,11
0204	313,43	2961,50	4,99	416,48	265,39	0,11	371,57	9,50
0210	260,74	477,27	1,23	61,19	20,45	25,39	867,24	24,49
0214	5,37	198,45	1,99	328,36	92,62	4,75	1957,50	12,21
0215	419,34	103,03	0,68	3,07	7,43	1,56	651,99	8,67
0226	7,78	27,46	0,88	37,59	16,00	0,02	37,94	8,67
0227	19,66	35,10	0,67	7,83	18,29	2,86	643,57	17,11
0228	20,60	59,46	1,06	39,57	36,98	1095,00	917,15	26,98
0237	124,47	830,96	2,63	706,23	113,89	0,23	516,18	14,66

*ID: identificação do paciente

Conclusão

Tabela 6 - Concentração sérica (pg/ml) das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1, 2 e 3 por paciente

ID*	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	TGF- β 1 (pg/ml)	TGF- β 2 (pg/ml)	TGF- β 3 (pg/ml)
0014	0,41	1,70	0,88	0,14	1,57	40391,50	1637,00	432,67
0016	0,36	1,36	3,37	0,99	1,73	36662,00	1689,50	419,81
0020	1,39	3,39	3,90	0,17	4,08	19355,50	1389,00	264,66
0021	0,34	2,65	1,14	0,16	2,67	92671,50	2427,50	881,47
0025	0,47	1,78	1,53	0,15	7,85	99844,00	2175,00	572,67
0029	0,30	2,18	1,78	0,14	2,07	38149,50	1242,12	496,43
0031	0,47	2,34	1,53	0,14	9,00	44136,00	2128,50	584,97
0035	0,29	1,19	10,76	0,12	2,32	100905,00	2464,50	902,20
0041	0,65	9,35	4,73	1,17	4,64	88012,50	3060,50	827,77
0048	0,30	2,04	8,49	1,04	2,57	45417,00	1499,00	566,32
0057	0,59	1,41	81,46	32,07	1,90	100372,00	3184,00	794,58
0058	0,34	1,73	3,94	0,13	1,44	41552,00	1624,00	384,34

Continua

Continuação

ID*	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	TFG- β 1 (pg/ml)	TFG- β 2 (pg/ml)	TFG- β 3 (pg/ml)
0062	0,29	1,07	2,42	0,20	4,38	49511,00	1349,50	254,96
0072	0,84	1,56	49,07	0,28	1,16	42704,00	1842,50	566,32
0077	0,29	2,18	1,04	0,15	1,24	53896,00	2101,00	604,04
0106	0,31	1,35	3,99	0,15	1,40	46507,50	1811,00	616,43
0120	0,26	4,09	1,20	0,10	1,16	32463,50	1949,50	477,52
0134	0,36	2,20	3,47	0,46	2,76	51602,50	1935,00	703,23
0148	0,42	4,71	2,90	0,94	13,54	61731,50	1987,50	700,11
0155	0,34	5,51	40,64	0,23	2,67	77681,00	2113,50	815,65
0161	0,26	3,00	1,07	0,79	2,32	39399,00	1791,00	490,29
0170	0,29	1,96	1,57	0,14	1,24	85963,50	2924,00	872,56
0171	0,31	15,40	3,52	1,29	7,86	52393,00	2113,00	619,67
0172	0,34	15,31	0,77	2,06	9,69	92490,50	2094,50	785,56
0176	0,31	4,87	2,33	0,14	5,29	39389,00	1952,00	368,18
0178	0,34	14,57	9,59	2,00	6,85	87642,50	2130,00	696,34
0184	0,34	13,37	1,20	3,54	3,71	52341,50	2431,00	610,31
0186	0,27	1,33	0,71	0,11	1,08	54517,50	2167,00	591,51
0188	0,29	1,25	0,88	2,52	3,29	39471,00	1675,00	419,81
0192	0,25	2,48	0,88	0,14	3,92	62487,50	2061,00	572,64
0193	0,24	0,75	0,94	0,58	1,75	90538,00	2916,00	696,85
0204	0,24	7,05	7,77	0,12	2,28	61688,50	1966,50	534,76
0210	0,34	29,12	3,78	3,32	5,01	41963,50	2184,50	448,72
0214	0,34	3,24	0,95	0,25	1,79	73194,00	2127,50	528,44
0215	0,39	9,02	1,20	0,11	1,98	34100,00	1934,00	413,37
0226	0,34	8,67	2,30	0,20	6,00	29666,00	1728,00	413,37
0227	0,39	3,13	2,43	0,55	1,57	68468,00	2771,50	697,14
0228	0,34	10,08	0,71	1,36	3,61	82508,00	2657,00	733,89
0237	0,26	2,34	0,88	0,11	1,01	100936,50	2038,00	709,40

*ID: identificação do paciente

Conclusão

Quando observado caso a caso, o paciente ID 0041 se destacou entre todos os casos, pois foi o que apresentou as maiores concentrações salivares de IL-6 (1464,50 pg/ml), IL-10 (23,47 pg/ml), IL-1 β (847,20 pg/ml) e TNF- α (1150,00 pg/ml) em toda a amostra, analisando o perfil deste caso, observamos que ele apresentou uma classificação WPOI 4 e estágio pT4 mais avançado, além de ter o diagnóstico de recidiva local e metástase a distância cerca de 12 meses decorridos da data da cirurgia e evoluído ao óbito 12 meses após a data da primeira recidiva.

O paciente ID 0106 apresentou as maiores concentrações de TGF- β 1 (1734,00 pg/ml) e TGF- β 2 (2455,50 pg/ml), tendo sido classificado com WPOI 4, metástase linfonodal e estágio pT4, apresentou recidiva local 6 meses depois da data da cirurgia e evoluiu ao óbito 12 meses após o diagnóstico de recidiva tumoral.

Individualmente, as maiores concentrações salivares de IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 e TGF- β 2 se mostraram evidentes em casos mais avançados da doença e com um desfecho desfavorável. Em contrapartida, as menores concentrações salivares de IL-10, IL-1 β , TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 foram observadas em pacientes com melhor quadro em relação ao desfecho e tempo de sobrevida. O paciente ID 0215 apresentou a menor concentração salivar de IL-1 β , foi classificado com WPOI 4, estágio pT2 e não apresentou metástase linfonodal, sendo declarado como sem evidências de doença (SED) no último seguimento de 34 meses. TGF- β 1 na saliva teve concentração menor em dois casos que apresentaram melhor evolução, o ID 0020 apresentou WPOI 2, estágio pT2, sem comprometimento linfonodal e no último seguimento de 85 meses não apresentou evidências da doença. O ID 0148 tinha WPOI 4, estágio pT3, também sem comprometimento linfonodal e com tempo de seguimento de 57 meses, sendo considerado SED.

O ID 0184 apresentou a menor concentração salivar de IL-10, foi classificado com WPOI 3, estágio pT3, sem comprometimento linfonodal, apresentou recidiva local e regional 5 meses depois da cirurgia, porém permanece com status de vivo com doença (VCD), com seguimento de 41 meses completos. O ID 0226 apresentou menores concentrações de TGF- β 2 e TGF- β 3 na saliva, com classificação WPOI 3, estágio pT2, sem metástase linfonodal e em seu último seguimento de 25 meses não apresentou evidências da doença.

No soro, a maior concentração de IL-8 foi observada no ID 0210, que foi classificado WPOI 3, estágio pT2 e sem metástase linfonodal, este caso foi diagnosticado com recidiva local cerca de 7 meses depois cirurgia, tendo evoluído ao óbito devido à doença 18 meses depois da ocorrência da primeira recidiva. A menor concentração sérica de IL-10 (0,71 pg/ml) foi observada em um caso (ID 0228) com WPOI 4, pT2 e sem metástase linfonodal, tendo completado 28 meses de seguimento SED. O ID 0237 apresentou a menor concentração de TNF- α , foi classificado com WPOI 3, estágio pT3 e comprometimento linfonodal, tendo completado 24 meses de seguimento SED.

Os valores mínimo, máximo, média, desvio padrão e mediana das concentrações das citocinas observadas na saliva e no soro são apresentadas nas tabelas 7 e 8 respectivamente.

Tabela 7 - Valores mínimo e máximo, média, desvio padrão e mediana da concentração salivar de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1,2 e 3 (n=39)

Citocina	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mediana
IL-6 (pg/ml)	1,89	1464,50	250,80	309,82	145,37
IL-8 (pg/ml)	7,87	2961,50	266,17	518,28	94,45
IL-10 (pg/ml)	0,49	23,47	2,91	4,87	1,51
IL-1 β (pg/ml)	3,07	847,20	184,88	225,28	63,63
TNF- α (pg/ml)	3,48	1150,00	129,29	192,72	77,27
TGF- β 1 (pg/ml)	0,00	1734,50	211,05	413,13	5,91
TGF- β 2 (pg/ml)	37,94	2455,50	1016,41	643,07	867,24
TGF- β 3 (pg/ml)	8,67	74,35	22,89	15,17	17,11

Tabela 8 - Valores mínimo e máximo, média, desvio padrão e mediana da concentração sérica de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1,2 e 3 (n=39)

Citocina	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mediana
IL-6 (pg/ml)	0,24	1,39	0,38	0,20	0,34
IL-8 (pg/ml)	0,75	29,12	5,14	5,80	2,48
IL-10 (pg/ml)	0,71	81,46	6,97	15,66	2,30
IL-1 β (pg/ml)	0,10	32,07	1,49	5,10	0,20
TNF- α (pg/ml)	1,01	13,54	3,60	2,83	2,57
TGF- β 1 (pg/ml)	19355,50	100936,50	60326,23	23826,07	52393,00
TGF- β 2 (pg/ml)	1242,12	3184,00	2083,89	459,92	2061,00
TGF- β 3 (pg/ml)	254,96	902,20	591,51	167,06	584,97

As concentrações observadas para as citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β e TNF- α foram maiores na saliva do que no soro, exceto TGF- β que mostrou o contrário. Por conta dessa diferença, foi verificado se uma mesma citocina poderia apresentar correlação entre suas diferentes concentrações medianas observadas na saliva e soro. Entretanto, quando realizado o teste de coeficiente de correlação de Spearman não foram observadas associações entre as concentrações de nenhuma das citocinas na saliva e no soro (Tabela 9).

Tabela 9 - Correlação entre as concentrações salivares e séricas das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1, 2 e 3

[illegible]

4.1.1. Correlação da concentração salivar e sérica das citocinas com variáveis epidemiológicas e clínico-patológicas

A concentração mediana das citocinas na saliva para todas as variáveis demográficas, clínicas e histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico analisadas é apresentada nas tabelas 10 e 11 respectivamente.

Na saliva a concentração mediana de IL-6 mostrou-se significativamente relacionada ao sítio da lesão primária ($p=0,015$), apresentando aumento significativo da concentração mediana em pacientes com tumores localizados no soalho da boca quando comparados com os portadores de tumores da língua. O estágio pT também mostrou correlação significativa com a concentração salivar ($p=0,014$), no qual pacientes com tumores pT3/pT4 apresentaram aumento significativo da concentração mediana quando comparados a pacientes pT1/pT2. Não houve associação da concentração mediana de IL-6 com as demais variáveis (Tabelas 12 e 13, Figuras 2 e 3).

A mediana da concentração salivar de IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β 1 não apresentou associação significativa com a idade, gênero, dentição ausente, hábitos tabagistas e etilistas, sítio da lesão, espessura do tumor, estágio pT, presença de metástase linfonodal, estadiamento patológico, grau histológico, infiltração vascular sanguínea, infiltração vascular linfática, invasão perineural e infiltrado inflamatório (Tabelas 12 e 13).

A concentração salivar de TGF- β 2 apresentou associação significativa com o estágio pT ($p=0,031$) mostrando elevação da concentração mediana em pacientes pT3/pT4. Não houve associação da concentração mediana de TGF- β 2 com outras variáveis analisadas (Tabelas 12 e 13, Figura 4).

A concentração de TGF- β 3 na saliva mostrou associação significativa com a espessura do tumor ($p=0,049$) e os tumores com espessura menor ou igual a 10mm apresentaram elevação da concentração mediana desta citocina. Não foram observadas associações entre a concentração sérica de TGF- β 3 e as demais variáveis demográficas, clínicas e histopatológicas (Tabelas 12 e 13, Figura 5).

Tabela 10 - Mediana da concentração salivar obtida das citocinas para as variáveis demográficas e clínicas

Variável	Mediana (pg/ml)								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Idade (anos)									
≤ 57	20	118,03	92,67	1,54	92,04	90,39	12,18	765,89	18,57
> 57	19	145,37	102,38	1,46	54,12	61,66	4,60	1032,15	17,11
Gênero									
Masculino	35	154,98	90,89	1,51	63,63	77,27	9,07	1031,85	17,11
Feminino	4	16,44	242,96	2,96	141,24	113,00	1,53	611,15	20,80
Edentado									
Sim	10	150,18	183,22	1,48	81,37	76,92	5,04	809,46	17,11
Não	29	124,47	90,89	1,52	63,63	88,16	10,75	917,15	17,11
Tabagismo									
Atual	25	154,98	102,38	1,52	68,10	77,27	4,75	772,87	17,11
No passado	7	196,08	71,39	1,74	112,68	146,44	279,58	1074,5	17,11
Nunca	7	20,60	59,46	1,06	39,57	20,45	10,96	867,24	24,49
Etilismo									
Atual	23	145,37	59,46	1,64	68,1	88,16	5,475	917,15	23,28
No passado	11	321,83	71,39	1,46	63,63	76,58	97,67	1253,5	17,11
Nunca	5	81,08	259,89	1,23	61,19	61,66	5,91	651,99	12,21
Sítio da lesão									
C02 (língua)	24	66,04	98,74	1,60	117,31	63,25	4,67	856,65	17,11
C04 (soalho)	15	321,83	90,89	1,46	63,63	88,16	9,07	1031,85	17,11

Tabela 11 - Mediana da concentração salivar obtida das citocinas para as variáveis histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico

Variável	Mediana (pg/ml)								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Espessura do tumor (mm)									
≤ 10	19	154,98	90,89	1,12	47,95	36,98	14,92	1032,15	23,28
> 10	19	145,37	94,45	1,67	173,43	113,89	3,32	771,23	14,66
Estádio pT									
pT1/pT2	27	69,76	94,45	1,23	54,12	45,07	4,75	771,23	17,11
pT3/pT4	12	418,01	140,43	1,66	181,27	107,51	75,37	1349,25	20,99
Metástase linfonodal									
N0	22	170,73	95,76	1,54	92,04	101,72	12,94	974,50	21,37
N+	17	124,47	94,45	1,43	50,06	76,58	2,86	651,99	14,66
Estádio patológico *									
I/II	12	60,38	75,18	1,09	43,76	49,32	12,94	1052,42	22,99
III/IV	27	196,08	100,62	1,56	115,99	88,16	4,60	771,23	17,11
Grau de diferenciação									
Bem diferenciado	8	287,08	181,14	1,67	57,65	29,10	0,26	733,77	19,57
Moderadamente diferenciado	27	145,37	90,89	1,52	68,10	77,27	9,07	772,87	17,11
Pouco diferenciado	3	39,39	36,92	1,00	47,95	124,19	99,77	1253,50	17,11
Infiltração vascular									
sanguínea									
Ausente	38	150,18	92,67	1,483	62,41	76,92	7,49	856,65	17,11
Infiltração vascular linfática									
Ausente	32	175,53	101,50	1,48	90,39	84,05	8,33	856,65	17,11
Presente	5	28,32	23,19	1,67	14,49	19,41	3,32	760,55	14,66
Invasão perineural									
Ausente	21	175,53	82,92	1,48	88,15	82,72	55,64	1035,33	17,11
Presente	17	145,37	100,62	1,52	61,19	76,58	3,32	760,55	17,11
Infiltrado inflamatório									
Escasso	6	172,83	237,64	1,51	143,05	147,63	9,76	938,95	17,11
Moderado	24	83,21	82,92	1,24	44,40	44,17	7,49	772,05	18,57
Intenso	3	313,43	549,04	3,82	362,37	192,59	0,11	371,57	9,50
Margens cirúrgicas									
Livres	31	124,47	71,39	1,24	54,12	45,07	9,07	867,24	17,11
Comprometidas	4	255,42	161,52	1,58	184,12	104,56	2,89	700,12	15,89

*I (pT1N0M0) /II (pT2N0M0) /III (pT1N1M0 /pT2N1M0 /pT3N0M0 /pT3N1M0) /IV (pT1N2M0 /pT2N2M0 /pT3N2M0 /pT4aN0M0 /pT4aN1M0 /pT4aN2M0 /N3 /T4b /M1)

Tabela 12 - Associação entre as concentrações salivares das citocinas e variáveis demográficas e clínicas

Variável	Valor p								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Idade (anos)									
≤ 57	20	0,869	0,634	0,421	0,421	0,421	0,148	0,634	0,408
> 57	19								
Gênero									
Masculino	35	0,112	0,311	0,639	0,738	0,876	0,179	0,124	0,909
Feminino	4								
Edentados									
Sim	10	1,000*	0,480*	0,716*	1,000*	0,716*	0,273*	0,716*	1,000*
Não	29								
Tabagismo									
Atual	25	0,643	0,533	0,643	0,643	0,273	0,342	0,533	0,305
No passado	7								
Nunca	7								
Etilismo									
Atual	23	1,000	0,058	1,000	1,000	1,000	1,000	0,070	0,430
No passado	11								
Nunca	5								
Sítio da lesão									
C02 (língua)	24	0,015	0,839	0,389	0,839	0,648	0,648	0,648	0,759
C04 (soalho)	15								

p- valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p- valor obtido pelo teste de coeficiente de correlação de Pearson

**p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

Tabela 13 - Associação entre as concentrações salivares das citocinas e variáveis histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico

Variável	Valor p								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Espessura do tumor (mm)									
≤ 10	19	1,000	1,000	0,050	0,194	0,517	0,194	0,194	0,049
> 10	19								
Estádio pT									
pT1/pT2	27	0,014	0,916	0,245	0,327	0,188	0,08	0,031	0,327
pT3/pT4	12								
Metástase linfonodal									
N0	22	0,747	0,566	0,457	0,163	0,146	0,267	0,392	0,664
N+	17								
Estádio patológico ***									
I/II	12	0,200	0,557	0,200	0,200	0,557	0,423	0,135	0,216
III/IV	24								
Grau de diferenciação									
Bem diferenciado	8	0,762	0,565	0,319	0,766	0,914	0,762	0,211	0,317
Moderadamente diferenciado	27								
Pouco diferenciado	3								
Infiltração vascular linfática									
Ausente	32	0,340	0,340	0,660	0,340	0,348	1,000	1,000	0,364
Presente	5								
Invasão perineural									
Ausente	21	0,746	0,746	0,630	1,000	1,000	0,330	0,191	0,900
Presente	17								
Infiltrado inflamatório									
Escasso	6	0,738	0,628	0,738	0,069	0,093	0,375	1,000	0,268
Moderado	24								
Intenso	3								
Margens cirúrgicas									
Livres	31	1,000	0,312	0,312	0,312	0,292	0,603	0,608	0,608
Comprometidas	4								

Obs: Nenhuma estatística é computada para a variável infiltração vascular sanguínea porque não foi observada em nenhum caso.

p- valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p- valor obtido pelo teste de coeficiente de correlação de Pearson

**p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

***I (pT1N0M0) /II (pT2N0M0) /III (pT1N1M0 /pT2N1M0 /pT3N0M0 /pT3N1M0) /IV (pT1N2M0 /pT2N2M0 /pT3N2M0 /pT4aN0M0 /pT4aN1M0 /pT4aN2M0 /N3 /T4b /M1)

Figura 2 - Representação gráfica da concentração salivar de IL-6 e sua associação com o sítio da lesão ($p=0,015$)

Fonte: Macedo K. T; López R. V. M (2019).

Figura 3 - Representação gráfica da concentração salivar de IL-6 e sua associação com o tamanho do tumor (classificação patológica) ($p=0,014$)

Fonte: Macedo K. T; López R. V. M (2019).

Figura 4 - Representação gráfica da concentração salivar de TGF- β 2 e sua associação com o tamanho do tumor (classificação patológica) ($p=0,031$)

Fonte: Macedo K. T; López R. V. M (2019).

Figura 5 - Representação gráfica da concentração salivar de TGF- β 3 e sua associação com a espessura do tumor ($p=0,049$)

Fonte: Macedo K. T; López R. V. M (2019).

A concentração mediana das citocinas no soro para todas as variáveis demográficas, clínicas e histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico analisadas é apresentada nas tabelas 14 e 15.

A IL-8 no soro apresentou associação significativa ao grau histológico do tumor ($p=0,009$), onde pacientes com tumores bem diferenciados apresentaram maior concentração mediana em comparação aos outros grupos. Não foram observadas associações da concentração de IL-8 com a idade, gênero, dentição ausente, hábitos tabagistas e etilistas, sítio da lesão, estágio T, estadiamento patológico e presença de metástase linfonodal (Tabelas 16 e 17, Figura 6).

A IL-10 no soro foi associada significativamente ao grau histológico do tumor ($p=0,013$). Não foram observadas associações da concentração de IL-10 com a idade, gênero, dentição ausente, hábitos tabagistas e etilistas, sítio da lesão, estágio pT, estadiamento patológico e presença de metástase linfonodal (Tabelas 16 e 17, Figura 7).

A concentração mediana de TNF- α foi associada significativamente à presença de invasão perineural ($p=0,022$). Não foram observadas associações entre TNF- α e as demais variáveis (Tabelas 16 e 17, Figura 8).

TGF- β 3 apresentou associação significativa com o estágio patológico ($p=0,048$), indicando que níveis mais elevados de TGF- β 3 mostraram estar associados a estágios patológicos mais avançados da doença. Não houve

associação da concentração de TGF- β 3 com outras variáveis estudadas (Tabelas 16 e 17, Figuras 9).

A mediana da concentração sérica de IL-6, TGF- β 1 e 2 não apresentou associação significativa com as características epidemiológicas e clínico-patológicas analisadas. No soro a concentração mediana de IL-1 β apresentou associação significativa com o gênero ($p=0,046$), mas não com as demais variáveis (Tabelas 16 e 17).

Tabela 14 - Mediana da concentração sérica obtida das citocinas para as variáveis demográficas e clínicas

Variável	Mediana (pg/ml)								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Idade (anos)									
≤ 57	20	0,32	2,74	1,75	0,26	2,44	50926,25	1950,25	566,32
> 57	19	0,34	2,34	2,33	0,16	2,67	61731,5	2113,5	696,85
Gênero									
Masculino	35	0,34	2,34	1,78	0,17	2,57	52393,00	2038,00	584,97
Feminino	4	0,34	8,85	3,10	1,40	3,67	55215,75	2157,25	593,31
Edentado									
Sim	10	0,33	2,18	1,65	0,52	2,41	57813,75	2044,25	650,45
Não	29	0,34	3,00	2,33	0,20	2,57	52341,50	2061,00	572,64
Tabagismo									
Atual	25	0,34	2,18	2,42	0,15	2,07	49511	1966,50	566,32
No passado	7	0,34	2,48	0,94	0,46	2,76	62487,50	2167,00	696,85
Nunca	7	0,34	8,665	3,78	0,79	3,61	46507,50	2113,5	616,43
Etilismo									
Atual	23	0,34	2,48	2,30	0,20	2,67	61688,50	2038,00	604,04
No passado	11	0,34	2,20	1,78	0,25	2,32	52341,50	2128,50	591,51
Nunca	5	0,34	9,02	3,78	0,28	1,98	41963,50	1949,50	477,52
Sítio da lesão									
C02 (língua)	24	0,34	2,74	1,55	0,19	2,17	54206,75	2049,50	569,48
C04 (soalho de boca)	15	0,34	2,34	2,90	0,46	2,76	52341,50	2113,00	619,67

Tabela 15 - Mediana da concentração sérica obtida das citocinas para as variáveis histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico

Variável	Mediana (pg/ml)								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Espessura do tumor (mm)									
≤ 10	19	0,31	3,39	2,30	0,20	3,61	46507,50	1966,50	528,44
> 10	19	0,34	2,04	2,43	0,46	1,90	68468,00	2101,00	696,85
Estádio pT									
pT1/pT2	27	0,34	3,24	1,57	0,20	3,29	54517,50	2061,00	572,64
pT3/pT4	12	0,35	1,71	3,49	0,37	1,74	51997,75	2018,00	618,05
Metástase linfonodal									
pN0	22	0,34	3,31	2,66	0,22	2,67	58103,00	2107,25	582,07
pN+	17	0,31	2,20	1,53	0,15	2,32	46507,50	1952,00	584,97
Estádio patológico *									
I/II	12	0,32	3,74	2,04	0,19	3,14	52014,25	2013,75	512,43
III/IV	27	0,34	2,20	2,33	0,46	2,32	52393,00	2094,50	616,43
Grau de diferenciação									
Bem diferenciado	8	0,34	7,86	3,95	0,19	4,82	44235,50	1959,25	491,74
Moderadamente diferenciado	27	0,34	2,20	1,57	0,23	2,32	52393,00	2038,00	604,04
Pouco diferenciado	3	0,27	1,33	0,94	0,14	1,75	54517,50	2167,00	591,51
Infiltração vascular									
sanguínea									
Ausente	38	0,34	2,41	2,32	0,20	2,62	52367,25	2049,50	588,24
Infiltração vascular linfática									
Ausente	32	0,34	2,82	2,38	0,22	2,50	53118,75	2012,75	597,77
Presente	5	0,41	1,96	1,53	0,14	2,57	45417,00	2128,50	572,67
Invasão perineural									
Ausente	21	0,34	3,39	2,30	0,58	3,71	54517,50	2113,00	610,31
Presente	17	0,30	2,18	2,42	0,15	2,28	49511,00	1935,00	566,32
Infiltrado inflamatório									
Escasso	6	0,29	1,87	1,73	0,24	1,66	58191,75	2081,00	588,34
Moderado	24	0,34	3,74	1,65	0,51	3,45	52367,25	2103,75	588,24
Intenso	3	0,29	7,05	2,3	0,14	2,28	61688,50	1966,50	534,76

* I (pT1N0M0) /II (pT2N0M0) /III (pT1N1M0 /pT2N1M0 /pT3N0M0 /pT3N1M0) /IV (pT1N2M0 /pT2N2M0 /pT3N2M0 /pT4aN0M0 /pT4aN1M0 /pT4aN2M0 /N3 /T4b /M1)

Tabela 16 - Associação entre as concentrações séricas das citocinas e variáveis demográficas e clínicas

Variável	Valor p								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Idade (anos)									
≤ 57	20	0,135	0,869	0,634	0,421	0,634	0,264	0,264	0,264
> 57	19								
Gênero									
Masculino	35	1,000	0,066	0,460	0,046	0,576	0,911	0,333	0,876
Feminino	4								
Edentado									
Sim	10	0,232*	0,273*	0,716*	0,480*	1,000*	0,480*	1,000*	0,480*
Não	29								
Tabagismo									
Atual	25	0,061	0,141	0,185	0,342	0,154	0,533	0,342	0,053
No passado	7								
Nunca	7								
Etilismo									
Atual	23	0,690	0,316	1,000	0,728	1,000	0,393	0,587	0,477
No passado	11								
Nunca	5								
Sítio da lesão									
C02 (língua)	24	1,000*	0,839	0,076	0,648	0,265	0,389	0,648	0,265
C04 (soalho de boca)	15								

p- valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p- valor obtido pelo teste de coeficiente de correlação de Pearson

**p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

Tabela 17 - Associação entre as concentrações séricas das citocinas e variáveis histopatológicas obtidas do exame do espécime cirúrgico

Variável	Valor p								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Espessura do tumor (mm)									
≤ 10	19	0,295	0,103	1,000	0,517	0,194	0,194	0,517	0,050
> 10	19								
Estádio pT									
pT1/pT2	27	0,142	0,052	0,188	0,358	0,075	0,753	0,893	0,327
pT3/pT4	12								
Metástase linfonodal									
pN0	22	0,747	0,333	0,210	0,585	0,812	0,790	0,440	0,812
pN+	17								
Estádio patológico ***									
I/II	12	0,063*	0,135	0,557	0,200	0,423	0,915	0,557	0,048
III/IV	27								
Grau de diferenciação									
Bem diferenciado	8	1,000	0,009	0,013	0,766	0,406	0,766	0,211	0,762
Moderadamente diferenciado	27								
Pouco diferenciado	3								
Infiltração vascular linfática									
Ausente	32	0,304	0,050	0,340	0,348	1,000	1,000	0,644	0,340
Presente	5								
Invasão perineural									
Ausente	21	0,495	0,099	0,746	0,099	0,022	0,743	0,325	0,515
Presente	17								
Infiltrado inflamatório									
Escasso	6	0,689	0,178	1,000	0,360	0,436	0,628	0,861	1,000
Moderado	24								
Intenso	3								

p- valor obtido pelo teste exato de Fisher

* p- valor obtido pelo teste de coeficiente de correlação de Pearson

**p-valor obtido pelo teste não paramétrico U Mann-Whitney

*** I (pT1N0M0) /II (pT2N0M0) /III (pT1N1M0 /pT2N1M0 /pT3N0M0 /pT3N1M0) /IV (pT1N2M0 /pT2N2M0 /pT3N2M0 /pT4aN0M0 /pT4aN1M0 /pT4aN2M0 /N3 /T4b /M1)

Figura 6 - Representação gráfica da concentração sérica de IL-8 e sua associação com o grau de diferenciação tumoral ($p=0,009$)

Fonte: Macedo K. T; López R. V. M (2019).

Figura 7 - Representação gráfica da concentração sérica de IL-10 e sua associação com o grau de diferenciação tumoral ($p=0,013$)

Fonte: Macedo K. T; López R. V. M (2019).

Figura 8 - Representação gráfica da concentração sérica de TNF- α e sua associação com a invasão perineural ($p=0,022$)

Fonte: Macedo K. T; López R. V. M (2019).

Figura 9 - Representação gráfica da concentração sérica de TGF- β 3 e sua associação com o estágio patológico(p=0,048)

Fonte: Macedo K. T; López R. V. M (2019).

4.1.2. Correlação da concentração salivar e sérica das citocinas com o pior padrão de invasão

O padrão de invasão tipo 4 foi o mais prevalente, representando 65,79% de todas a amostra, seguido pelo padrão tipo 3 com 23,68% e o tipo 2 com 10,56%. Entre todos os pacientes analisados, não foram observados padrão de invasão tipo 1 e 5 (Figuras 10-12, Tabela 18).

Figura 10 - Representação gráfica de WPOI 2 representado por grandes blocos espiculados na frente de invasão (H.E. 200x)

Fonte: Cunha-Mercante A.M (2019).

Figura 11 - Representação gráfica de WPOI 3 representado por pequenos blocos com mais de 15 células tumorais na frente de invasão (H.E. 200x)

Fonte: Cunha-Mercante A.M (2019).

Figura 12 - Representação gráfica de WPOI 4 representado por pequenos blocos com menos de 15 células tumorais ou células tumorais isoladas na frente de invasão (H.E. 200x)

Fonte: Cunha-Mercante A.M (2019).

As concentrações salivares e séricas de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, 2 e 3 não foram associadas significativamente ao padrão de invasão na interface tumor hospedeiro (Tabelas 19 e 20).

Tabela 18 - Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação WPOI

WPOI – Pior Padrão de Invasão		
TIPO	n	%
1	0	0,00
2	4	10,53
3	9	23,68
4	25	65,79
5	0	0,00
	38	100

Tabela 19 - Associação entre as concentrações salivares das citocinas e o pior padrão de invasão

Variável	Mediana (pg/ml)								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
WPOI									
2	4	123,54	38,68	1,53	52,69	69,10	57,34	1035,33	26,98
3	9	124,47	102,38	1,24	63,63	45,07	25,39	688,39	14,66
4	25	154,98	100,62	1,51	50,06	88,16	5,475	846,05	17,11
Valor p		0,677	0,483	0,993	0,661	0,720	0,943	0,461	0,243

p- valor obtido pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis

Tabela 20 - Associação entre as concentrações séricas das citocinas e o pior padrão de invasão

Variável	Mediana (pg/ml)								
	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-1 β	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
WPOI									
2	4	0,40	2,49	1,98	0,17	4,23	46823,50	1758,75	424,81
3	9	0,34	4,87	2,33	0,28	3,71	41963,50	1952,00	496,43
4	25	0,31	2,20	1,57	0,23	2,32	61688,50	2094,50	616,43
Valor p		0,385	0,393	0,751	0,660	0,245	0,224	0,410	0,153

p- valor obtido pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis

4.2. Influência dos níveis salivares e séricos das citocinas na sobrevida

4.2.1. Influência dos níveis salivares e séricos das citocinas na sobrevida global

Não foram observadas associações significativas das concentrações das citocinas na saliva com menor sobrevida global (Tabela 21). Apesar de não observarmos valores significativos, podemos notar ligeira redução da sobrevida global naqueles casos com concentração salivar mediana de IL-8 maior que 94,45 pg/ml e TNF- α maior que 77,27 pg/ml. As demais citocinas apresentaram concentrações salivares medianas com valores iguais ou menores a mediana associados à menor sobrevida global.

Figura 13 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função de tempo (meses)

Tabela 21 - Distribuição da sobrevida global (%) em 24 meses de seguimento em relação à mediana da concentração salivar das citocinas

Variável	Concentração mediana (pg/ml)	Sobrevida global 24 meses (%)	Valor p
IL-6	≤ 145,37	50,63	0,304
	> 145,37	62,79	
IL-8	≤ 94,45	58,41	0,943
	> 94,45	51,44	
IL-10	≤ 1,505	49,71	0,377
	> 1,505	61,48	
IL-1β	≤ 63,63	51,80	0,253
	> 63,63	62,21	
TNF-α	≤ 77,27	60,33	0,813
	> 77,27	54,38	
TGF-β1	≤ 5,91	51,21	0,552
	> 5,91	61,15	
TGF-β2	≤ 867,24	50,10	0,870
	> 867,24	57,77	
TGF-β3	≤ 17,21	46,63	0,555
	> 17,21	62,73	

p- valor obtido pelo teste de logrank

Menor sobrevida global foi observada em pacientes com concentrações medianas de TNF- α no soro $\leq 2,565$ pg/ml (41,79%) quando comparados a pacientes com concentração mediana $> 2,565$ pg/ml (73,40) ($p= 0,008$) (Tabela 22, Figura 14).

Citocinas como IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 β no soro apresentaram pequena redução na sobrevida global em pacientes com concentrações iguais ou menores que a mediana, enquanto que TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 indicaram menor sobrevida global naqueles casos com concentrações maiores que a mediana. Mesmo que sem valores significativos, o possível impacto dessas citocinas sobre esse parâmetro se mostra evidente (Tabela 22).

Tabela 22 - Distribuição da sobrevida global (%) em 24 meses de seguimento em relação a mediana da concentração sérica das citocinas

Variável	Concentração mediana (pg/ml)	Sobrevida global 24 meses (%)	Valor p
IL-6	$\leq 0,335$	55,30	0,752
	$> 0,335$	58,33	
IL-8	$\leq 2,48$	47,88	0,087
	$> 2,48$	69,17	
IL-10	$\leq 2,3$	49,58	0,303
	$> 2,3$	62,90	
IL-1 β	$\leq 0,2$	49,31	0,182
	$> 0,2$	65,36	
TNF- α	$\leq 2,565$	41,79	0,008
	$> 2,565$	73,40	
TGF- β 1	≤ 52393	58,50	0,943
	> 52393	55,67	
TGF- β 2	≤ 2061	64,93	0,209
	> 2061	48,52	
TGF- β 3	≤ 584965	60,21	0,668
	> 584965	54,89	

p- valor obtido pelo teste de logrank

Figura 14 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida global (%) em função de tempo (meses) segundo a concentração mediana de TNF- α no soro

4.2.2. Influência dos níveis salivares e séricos das citocinas na sobrevida livre de doença

Não houve associação significativa de menor sobrevida livre de doença com nenhuma das citocinas analisadas na saliva e no soro (Tabelas 23 e 24).

Mesmo que sem valor estatístico, é possível observar concentração salivar mediana igual ou menor de IL-10, IL-1 β , TGF- β 2 e TGF- β 3 reduzindo ligeiramente a sobrevida livre de doença. Enquanto que concentrações maiores que a mediana de IL-6, IL-8, TNF- α e TGF- β 1 também parecem impactar de forma negativa na sobrevida livre de doença (Tabela 23).

Figura 15 - Representação gráfica (curva Kaplan Meier) da probabilidade de sobrevida livre de doença (%) em função de tempo (meses)

Tabela 23 - Distribuição da sobrevida livre de doença (%) em 24 meses de seguimento em relação à mediana da concentração salivar das citocinas

Variável	Concentração mediana (pg/ml)	Sobrevida livre de doença 24 meses (%)	Valor p
IL-6	≤ 145,37	57,55	0,382
	> 145,37	49,63	
IL-8	≤ 94,45	55,29	0,877
	> 94,45	50,32	
IL-10	≤ 1,505	42,83	0,282
	> 1,505	62,31	
IL-1β	≤ 63,63	45,70	0,219
	> 63,63	62,54	
TNF-α	≤ 77,27	54,98	0,957
	> 77,27	54,28	
TGF-β1	≤ 5,91	56,60	0,608
	> 5,91	51,01	
TGF-β2	≤ 867,24	43,71	0,821
	> 867,24	55,12	
TGF-β3	≤ 17,21	41,35	0,523
	> 17,21	59,43	

p- valor obtido pelo teste de logrank

Menor sobrevida livre doença foi observada naqueles casos com concentração igual ou menor que a mediana de IL-8, IL-10, IL-1β, TNF-α e TGF-β1. Enquanto concentrações maiores que a mediana de TGF-β2 e TGF-β3 também reduziram a sobrevida livre de doença. Apesar dessas observações não apresentarem valores significativos, a redução modesta da sobrevida livre de doença de acordo com padrão elevado ou não citocina se faz presente na amostra estudada (Tabela 24).

Tabela 24 - Distribuição da sobrevida livre de doença (%) em 24 meses de seguimento em relação à mediana da concentração sérica das citocinas

Variável	Concentração mediana (pg/ml)	Sobrevida livre de doença 20 meses (%)	Valor p
IL-6	≤ 0,335	55,09	0,991
	> 0,335	53,67	
IL-8	≤ 2,48	50,12	0,584
	> 2,48	58,42	
IL-10	≤ 2,3	49,73	0,455
	> 2,3	58,82	
IL-1β	≤ 0,2	53,93	0,952
	> 0,2	54,99	
TNF-α	≤ 2,565	44,15	0,086
	> 2,565	65,87	
TGF-β1	≤ 52393	48,26	0,285
	> 52393	61,47	
TGF-β2	≤ 2061	63,66	0,124
	> 2061	43,27	
TGF-β3	≤ 584965	58,77	0,425
	> 584965	49,89	

p- valor obtido pelo teste de logrank

5. DISCUSSÃO

5.1. Concentrações salivares e séricas de citocinas inflamatórias

Para o presente estudo, selecionamos diferentes citocinas que desempenham diversas ações biológicas no CECB, podendo atuar na condução da iniciação tumoral, crescimento celular e metástase (IL-6); na transição epitélio-mesenquimal e crescimento tumoral (IL-8 e TGF- β); angiogênese e EMT (IL-1 β); proliferação celular, metástase, angiogênese e EMT (TNF- α); na proliferação, diferenciação, migração, apoptose, adesão, angiogênese, vigilância imunológica e a sobrevivência celular (TGF- β) e na invasão celular e metástase (IL-10). A utilização de materiais biológicos como soro e saliva se mostra como uma ferramenta diagnóstica promissora, principalmente por serem materiais biológicos de fácil obtenção, com mínima invasão e, portanto, oferecem menos estresse aos pacientes. O perfil sérico e ou salivar de pacientes com câncer pode ser útil e de fácil aplicabilidade para predição de desfecho e identificação de um perfil que possa direcionar para um tratamento menos agressivo. Estudos que avaliam o impacto desempenhado por citocinas durante a progressão tumoral em amostras de saliva e soro de pacientes com CECB ainda são limitados e apresentam diferentes resultados descritos para uma mesma citocina. Aqui, selecionamos a IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β para serem investigadas de forma a se estabelecer se suas concentrações séricas ou salivares apresentam correlação com a progressão da doença em pacientes com CECB, visto que a secreção, ação e concentração das citocinas inflamatórias está intimamente associada ao meio em que se encontra, seja saliva ou soro, podendo apresentar impactos biológicos diferentes, impulsionando o desenvolvimento tumoral ou contribuindo para apoptose daquela célula neoplásica.

A IL-6 é uma citocina descrita como importante potenciadora da angiogênese, crescimento e proliferação celular (GOPINATHAN et al., 2015). Na amostra estudada, a concentração salivar mediana de IL-6 foi 145,37 pg/ml, sendo esse valor considerado como ponto de corte para classificação alta ou baixa concentração da citocina. Concentrações aumentadas de IL-6 na saliva em pacientes com CECB já foram anteriormente observadas. Brailo et al. (2012) relataram concentração salivar mediana elevada de IL-6 (129 pg/ml) em pacientes com CECB em comparação a

pacientes com leucoplasia bucal e indivíduos saudáveis. Lee et al. (2017) em sua casuística composta de 41 pacientes com CECB encontraram concentração salivar mediana de IL-6 aumentada (198,33 pg/ml) em pacientes com CECB e esses valores foram significativamente elevados em comparação ao grupo controle. Na presente casuística, a concentração sérica mediana de IL-6 foi 0,34 pg/ml. Brailo et al. (2012) relataram concentração sérica mediana de IL-6 de 3 pg/ml, Cottin et al. (2018) em pacientes com CEC de cabeça e pescoço, e Mojtahedi et al. (2011) em pacientes com CECB, relataram valores semelhantes, 3,1 pg/ml e 3,8 pg/ml respectivamente, enquanto Schiegnitz et al. (2018) encontraram concentração mediana de 10,8 pg/ml e Duffy et al. (2008) relataram mediana de 13 pg/ml. Principalmente no soro, os relatos para a concentração de IL-6 ainda são controversos, mostrando a necessidade de novos estudos para delimitação de um valor específico de corte para esta citocina em pacientes com CECB.

A concentração mediana de IL-8 na saliva foi de 94,45 pg/ml em nossa amostra. Na literatura são encontradas diferentes concentrações descritas para pacientes com CECB. Lee et al. (2017) relataram concentração mediana de 2060,32 pg/ml, enquanto John et al. (2004) encontraram 720 pg/ml em sua casuística. No soro, observamos concentração mediana de IL-8 de 2,48 pg/ml e da mesma forma que na saliva, são encontradas diferentes concentrações descritas. Shiegnitz et al. (2018) encontraram concentração mediana de 62,8 pg/ml no soro de pacientes com CECB, já Fujita et al. (2014) relataram uma concentração mediana de 7,5 pg/ml. Esses resultados, podem ser reflexo das diferentes populações, etiologias e metodologias aplicadas nos diferentes estudos.

A IL-10 é descrita como uma citocina que possui duplo papel em tumores sólidos, podendo desempenhar ação antitumoral ou contribuindo para a evasão de células neoplásicas do sistema imunitário (FUJIEDA et al., 1999; HAMZAVI et al., 2013). Observamos concentração mediana de IL-10 na saliva de 1,51 pg/ml. Na literatura valores heterogêneos são descritos para esta citocina. Lee et al. (2017) relataram concentração salivar mediana de 14,91 pg/ml, enquanto Gonçalves et al. (2015) encontraram valores medianos de 0,037 pg/ml e ambos tinham uma casuística composta por pacientes com CECB. Nosso estudo encontrou o valor mediano de 2,30 pg/ml de IL-10 no soro. Polz-Dacewicz et al. (2016) observaram o mesmo valor em sua casuística composta por 78 pacientes com CEC de orofaringe. Alhamarneh et al. (2010) relataram concentração mediana de 1,17 pg/ml no soro de pacientes com CEC

de cabeça e pescoço. Diferentes observações para a concentração de IL-10 na saliva podem ser devido às diferentes populações estudadas, apesar do mesmo tipo histológico e diferentes técnicas aplicadas para quantificação das citocinas.

Na amostra estudada, encontramos concentração salivar mediana de 63,63 pg/ml de IL-1 β . Outros autores relataram valores medianos aumentados em comparação ao observado em nossa amostra. Lee et al. (2017) descreveram concentração de 391,43 pg/ml de IL-1 β , já Brailo et al. (2012) 906 pg/ml, ambos estudos realizados em pacientes com CECB. No soro, observamos concentração mediana de IL-1 β igual a 0,20 pg/ml. Na literatura estudos relatam concentrações abaixo do nível de detecção, como por exemplo Brailo et al. (2012) e estudos que trabalharam somente com os valores médios. Aqui optamos por não utilizar como valor de corte a média das concentrações das citocinas, devido à alta variação observadas dessas concentrações.

A concentração mediana de TNF- α na saliva foi 77,27 pg/ml. Autores descrevem diferentes concentrações medianas para TNF- α , porém todas as concentrações encontradas foram menores do que a observada na presente casuística. Brailo et al. (2012) e Lee et al. (2017) descreveram concentrações medianas salivares de TNF- α de 34 pg/ml e 27,75 pg/ml respectivamente em dois estudos realizados em pacientes com CECB, enquanto Polz-Dacewicz et al. (2016), em pacientes com CEC de orofaringe, observaram concentração mediana de 23,10 pg/ml. No soro, a mediana encontrada de TNF- α para a presente amostra foi de 2,57 pg/ml. Da mesma forma que o relatado para a saliva, são encontradas diferentes concentrações séricas de TNF- α descritas. Schiegnitz et al. (2018) encontraram concentração mediana igual a 7,9 pg/ml, Brailo et al. (2012) observaram concentração de 5 pg/ml e Polz-Dacewicz et al. (2016) 15,90 pg/ml.

A concentração mediana de TGF- β 1 na saliva foi 5,91 pg/ml em nossa amostra. Gonçalves et al. (2015) relataram concentração mediana de TGF- β 1 de 0,037 pg/ml em pacientes com CECB. No soro a concentração mediana observada para TGF- β 1 foi 52393,00 pg/ml. Não encontramos na literatura estudos determinando um valor mediano de TGF- β 1 no soro em pacientes com CECB, porém alguns autores estudaram a concentração plasmática de TGF- β 1 entre pacientes com câncer e controles saudáveis. Fukai et al. (2003) encontraram no plasma concentração média de 10,500 pg/ml de TGF- β 1 em pacientes com CEC de esôfago. Krasagakis et al. (1998) mostraram concentração mediana de 13,900 pg/ml de TGF- β 1 em pacientes

com melanoma. Ambos estudos observaram concentração elevada TGF- β 1 em pacientes com câncer em relação ao grupo controle.

Na saliva, a concentração mediana de TGF- β 2 foi 867,24 pg/ml e no soro 2061,00 pg/ml. Não foram encontrados estudos relatando um valor mediano da concentração de TGF- β 2 na saliva e soro em pacientes com CECB para que pudéssemos fazer uma comparação com o observado aqui, somente estudos descrevendo a concentração plasmática. Kopp et al. (1995) observaram concentrações plasmáticas de TGF- β 2 que variaram entre 27 pg/ml e 121 pg/ml em pacientes com câncer de mama no pré-tratamento. Krasagakis et al. (1998) encontraram concentração plasmática elevada de TGF- β 2 (285 pg/ml) em pacientes com melanoma quando comparados ao grupo controle.

Na presente amostra a concentração salivar mediana de TGF- β 3 foi 17,11 pg/ml, enquanto no soro foi 584,97 pg/ml. Igualmente ao TGF- β 2, não encontramos descritos na literatura valores da concentração salivar ou sérica de TGF- β 3 em pacientes com CECB. Krasagakis et al. (1998) em sua amostra composta por pacientes com melanoma, relataram concentrações medianas de TGF- β 3 no plasma de 290 pg/ml, mas essa concentração não diferiu significativamente do grupo controle. Lu et al. (2004) em estudo realizado para determinar os níveis de expressão de TGF- β 1 em 32 pacientes com CEC de cabeça e pescoço (cavidade bucal, faringe, tonsila e laringe) e tecido adjacente correspondente, foram observados que 14 amostras exibiram aumento significativo em comparação aos tecidos de controles saudáveis e todas as amostras analisadas apresentaram níveis elevados da expressão de TGF- β 1 em comparação s amostras de tecidos adjacentes. Esses resultados sugerem que a alta expressão de TGF- β 1 observada pode ser um evento precoce que ocorre durante o desenvolvimento do CEC de cabeça e pescoço.

5.2. Concentração das citocinas e o pior padrão de invasão

O padrão de invasão tumoral determina a maneira pelo qual as células neoplásicas se infiltram no tecido na interface tumor hospedeiro e espera-se que aquela neoplasia que infiltra de maneira dispersa seja mais agressiva do que aquelas que crescem e invadem os planos subjacentes sob a forma de grandes blocos ou faixas (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2005, 2010). Aqui esperávamos encontrar uma possível associação dos níveis séricos e ou salivares de citocinas inflamatórias e o

pior padrão de invasão, visto que esse critério tem sido utilizado para prever a ocorrência de recidiva local, sobrevida livre de doença e global.

Estudos investigando essa associação entre a concentração salivar e sérica de citocinas e o pior padrão de invasão ainda são escassos segundo o nosso conhecimento, mas de grande importância, sendo que o WPOI pode atuar como fator prognóstico histopatológico e que sua avaliação pode ajudar a determinar o tipo de acompanhamento oferecido para pacientes com CECB em estágios iniciais da doença (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2005, 2010; ALMANGUSH et al., 2015; HORI et al., 2019).

Não demonstramos possíveis associações das concentrações salivares e séricas de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β e TGF- β com o pior padrão de invasão na interface tumor/hospedeiro. Na literatura não encontramos outros trabalhos levantando a hipótese dessas concentrações impactando no WPOI em pacientes com CECB para corroborar nossos resultados. O estudo de Shinagawa et al. (2016) investigou a expressão tecidual de IL-6 por imuno-histoquímica em 116 pacientes com CECB e essa expressão foi significativamente associada ao pior padrão de invasão ($p = 0,004$) e, no mesmo estudo, observaram associação com a invasão vascular e presença de metástase linfonodal, sugerindo que a IL-6 possa estar envolvida na linfangiogênese e recorrência no CECB.

Wolf et al. (2018) observaram em seu estudo com pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço que a expressão de WPOI de baixo grau foi significativamente associado a sobrevida global e livre de doença favoráveis. O escore WPOI foi correlacionado com os níveis de CD4, CD8 e FoxP3. Quando os pacientes foram agrupados segundo o tipo de tratamento recebido, os graus 1 e 2 estavam relacionados a melhor sobrevida global e livre de doença naqueles pacientes tratados com cirurgia primária do que aqueles tratados com quimiorradiação. Esses achados sugerem que WPOI pode ser um fator prognóstico significativo, e esse fator se correlacionou com a diminuição da infiltração de células T e que pode ser útil na seleção de pacientes para cirurgia primária. Trabalhos como esse, embasam a atuação que WPOI pode desempenhar no CECB e nos fazem crer que novas investigações associando o possível papel existente entre citocinas inflamatórias e WPOI devem receber maior atenção.

5.3. Concentração das citocinas e metástases linfáticas

Muitas citocinas inflamatórias estão envolvidas no desenvolvimento e progressão do CECB e as altas taxas de mortalidade nesse tipo de câncer são principalmente associadas ao processo de invasão celular e metástase. Aqui, analisamos o perfil das concentração salivar e sérica de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β e sua correlação com a presença de metástase linfonodal, considerada importante indicadora de pior prognóstico, a fim de estabelecer se estas citocinas podem desempenhar papel na ocorrência e identificação de metástase linfonodal e ter aplicabilidade como marcador biológico no CECB.

Tanto na saliva, quanto no soro, a concentração de IL-6 não indicou possíveis correlações com metástase linfonodal, apesar da literatura apontar que a IL-6 está envolvida na promoção do crescimento de células epiteliais e possui papel importante no crescimento, migração, invasão celular e no desenvolvimento de metástase. Michalaki et al. (2004), estudaram pacientes com câncer de próstata e observaram níveis séricos significativamente maiores de IL-6 em pacientes com metástase linfonodal e metástase a distância, sugerindo que a IL-6 desempenha papel de indicador de progressão da doença nesse tipo de câncer. Jinno et al. (2015) observaram em pacientes com CECB correlação significativa entre a alta expressão de IL-6 e presença de metástase linfonodal ($p < 0,05$) e destacam o papel fundamental que esta citocina desempenha na progressão tumoral. Essa correlação significativa descrita pelos autores entre IL-6 e metástase linfonodal pode ser resultado da ação de IL-6 expressa por tumores na promoção da angiogênese (SHINRIKI et al., 2011). Em relação a concentração sérica de IL-6 e metástase linfonodal, encontramos diferentes resultados descritos. Schutter et al. (2005) relataram níveis séricos elevados de IL-6 naqueles pacientes com CEC de cabeça e pescoço que apresentavam metástase linfonodal ($p = 0,04$). Schiegnitz et al. (2018) observaram que pacientes com CECB e comprometimento linfonodal apresentaram diferença significativa em comparação ao grupo sem comprometimento linfonodal ($p = 0,037$). Enquanto Lotfi et al. (2015) e Park et al. (2019), corroborando nossos resultados, não observaram associações entre a concentração sérica de IL-6 em pacientes com CECB e a presença de metástase linfonodal. Apesar de não observarmos correlação com essa variável histopatológica, a concentração salivar de IL-6 mostrou-se associada aos estágios pT3 e pT4. Diferentemente, Sato et al. (2010) não relataram correlação

significativa entre a concentração salivar de IL-6 e estágio pT1/pT2 e pT3/pT4 em sua casuística composta por 29 pacientes com CECB. Selvam e Sadaksharam (2015) notaram diferença significativa da concentração salivar de IL-6 entre pacientes com CECB e estadiamento II/IV, mostrando que o comprometimento linfonodal e metástase a distância podem contribuir para a produção de IL-6. Novas investigações podem confirmar se a IL-6 possivelmente fornece vantagem no crescimento tumoral e se sua utilização como marcador biológico na identificação de tumores avançados é promissora, visto que os resultados observados aqui e os descritos na literatura, correlacionaram importantes parâmetros indicadores de pior prognóstico em pacientes com CECB.

Fujita et al. (2014) em estudo realizado para investigar o papel que a IL-8 reflete no microambiente tumoral e o seu valor prognóstico no soro de 50 pacientes com CECB, não encontraram correlações significativas com a presença de metástase linfonodal, estágio pT ou estadiamento patológico, embora nesse último parâmetro o nível sérico de IL-8 tenha sido elevado em pacientes com estadiamento III/IV, porém sem valor significativo. Lee et al. (2017) investigaram potenciais biomarcadores salivares para diagnóstico precoce de CECB e confirmaram que pacientes com estadiamento I/II diferiram significativamente do grupo controle. Esses relatos sugerem que a IL-8 pode representar um potencial biomarcador no CECB em estágios precoces da doença e novas investigações devem ser realizadas a fim de se estabelecer o impacto gerado pela IL-8 no soro ou saliva em relação à presença de metástase linfonodal e qual material biológico é o mais promissor para atuar como biomarcador.

Em concordância ao relatado no presente estudo, Hamzavi et al. (2013) e Gonçalves et al. (2015) não relataram possíveis associações da concentração de IL-10 na saliva e presença de metástase em pacientes com CEC de cabeça e pescoço. Lee et al (2017), não encontraram associações significativas entre a concentração salivar de IL-10 e pacientes com estádios mais avançados da doença ou aqueles com presença de metástase linfonodal. Apesar de Gonçalves et al. (2015) e Lee et al. (2017) não terem relatado resultados significativos em relação a esse parâmetro, ambos observaram que a alta concentração de IL-10 salivar permitiu distinguir pacientes com CECB daqueles indivíduos saudáveis, mostrando que esta citocina imunossupressora e anti-inflamatória na saliva pode ser adequada para diagnóstico precoce de CECB.

A saliva é um fluido corporal de fácil obtenção e com invasão mínima, que tem sido empregada para diagnóstico de doenças sistêmicas e como marcadores tumorais. Apesar dessas características positivas, a IL-10 salivar em nossa casuística composta por pacientes com CECB parece não exercer impacto, porém diferentes técnicas de coleta de saliva parecem impactar nos resultados. Wozniak et al. (2002) relataram que a saliva total coletada diretamente da cavidade bucal tem efeito inibitório na concentração de citocinas em comparação com a saliva coletada da glândula parótida, sugerindo que a degradação de citocinas por proteínas semelhantes à mucina pode ser um dos mecanismos inibitórios exercidos pela saliva. Portanto, acreditamos que novas investigações devam ser realizadas na concentração salivar de IL-10 colhida da glândula parótida, esta que parece ser relevante e mais promissora do que a saliva total não estimulada.

Polz-Dacewicz et al. (2016) não evidenciaram possíveis associações da concentração sérica de IL-10 e metástase em pacientes com CEC de orofaringe, mas a concentração sérica de IL-10 permitiu diferenciar os casos do grupo controle. Da mesma forma, Hamzavi et al. (2015) não encontrou correlação significativa entre a concentração sérica de IL-10 e a presença de metástase linfonodal em pacientes com CEC de cabeça e pescoço. Em contraste, Alhamarneh et al. (2011) analisando a concentração sérica de IL-10 em pacientes com CEC de cabeça e pescoço (laringe, hipofaringe, orofaringe, cavidade bucal e nasal) observaram associação significativa dessa concentração em pacientes com presença de metástase linfonodal ($p=0,017$), tumores maiores $p=0,001$ e estadiamentos patológicos mais avançados (III e IV) ($p=0,001$), ou seja, níveis séricos elevados de IL-10 mostraram-se fortemente associadas com a progressão da doença, indicando o papel potencial de IL-10 como fator prognóstico no soro em pacientes com CEC de cabeça e pescoço. Outro estudo que observou correlação entre o aumento de IL-10 no soro e estádios avançados da doença foi de Linkov et al. (2007). A IL-10 apresenta grande influência em tumores em estágios mais avançados, devido à sua ação antagônica na produção de citocinas inflamatórias, como a IL-6, IL-1 β e TNF- α , além de contribuir para inibição do processo inflamatório, que apresenta grande papel no desenvolvimento da doença. As divergências observadas nos trabalhos podem ter relação com o número de amostras analisadas ou até diferença de localização tumoral. Aqui trabalhamos com 39 amostras de soro em pacientes com CECB (língua e soalho), enquanto Linkov et al.

(2007) analisou 116 amostras, porém de pacientes com CEC de cabeça e pescoço, incluindo cavidade bucal, laringe e faringe.

Lee et al. (2017) além de relatarem concentração salivar IL-1 β elevada em pacientes com CECB em comparação a indivíduos saudáveis, observaram que pacientes com estadiamento mais precoce (I/II) apresentavam diferença significativa em comparação ao grupo controle, sugerindo que esta citocina possa atuar como indicador no diagnóstico precoce do CECB, porém ainda são necessárias novas investigações a fim de se determinar seu potencial como biomarcador nesse tipo de doença. Val et al. (2019) apesar de observarem aumento da concentração salivar de IL-1 β em pacientes com CECB, não demonstraram associações significativas entre esses indivíduos, nem na presença ou ausência de CECB e associaram esses resultados ao pequeno tamanho da amostra (20 pacientes) e que para determinar se IL-1 β realmente desempenha papel potencial como biomarcador para o CECB são necessárias novas avaliações, com uma casuística maior o suficiente para se determinar valores de referência indicando presença ou ausência de doença. Estudos como o realizado por Brailo et al. (2012) mostram que a IL-1 β é mais expressa na saliva do que no soro, indicando que a saliva como fluido biológico apresenta papel mais adequado para ser estudado na carcinogênese e progressão tumoral em pacientes com CECB. Citocinas pertencentes a família das Interleucinas-1 (IL-1) são importantes indutoras de diferentes genes envolvidos na promoção do crescimento e metástase, além de contribuir para a angiogênese, quimiotaxia e aumento da adesão celular, apoiando o crescimento celular e disseminação do tumor (LIU et al., 2010; BRAILO et al., 2012; LAMKANFI; DIXIT, 2014; LEE et al. 2017). Todas essas ações desempenhadas por IL-1 β no processo carcinogênico, evidenciam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre seu impacto no microambiente tumoral, de forma a estabelecer se na saliva esta citocina é capaz de refletir toda essa cascata de efeitos pró inflamatórios descritos.

Não observamos associações de TNF- α na saliva e soro com metástase linfonodal em nosso estudo. Lee et al. (2017) observaram que TNF- α possivelmente tem papel potencial como biomarcador de tumores em estágios precoces em pacientes com CECB, tendo relatado diferença significativa entre aqueles pacientes com estadiamento patológico I/II e o grupo controle. Enquanto Ameena e Rathy (2019) encontraram diferença significativa entre pacientes com estadiamento I/II e III/IV ($p \leq 0,05$), as maiores concentrações foram observadas naqueles com tumores mais

avanzados. Notaram também que TNF- α estava mais elevada na saliva em pacientes com CECB do que aqueles com leucoplasia bucal quando comparados ao grupo controle e houve diferença significativa de TNF- α entre os diferentes graus de diferenciação histológica. Os autores levantam a hipótese de TNF- α ser uma molécula de monitoramento potencial para a transformação da pré-malignidade em malignidade. Em relação a concentração sérica de TNF- α , Polz-Dacewicz et al. (2016) não encontraram associação significativa entre a concentração de TNF- α e a presença de metástase linfonodal em pacientes com CEC de orofaringe, enquanto Michalaki et al. (2004) observaram diferenças significativas naquele grupo de pacientes com tumores em estágios mais avançados, com presença de metástase linfonodal e metástase a distância. Esses resultados indicam que TNF- α se associa com a extensão da doença em pacientes com câncer de próstata e que esta citocina pode auxiliar no monitoramento em conjunto com outros marcadores da doença.

A concentração salivar e sérica de TGF- β 1 não mostrou possíveis associações com presença de metástase linfonodal. Fukai et al. (2003) investigaram a correlação da expressão tecidual e o nível plasmático de TGF- β 1 com características clínico-patológicas de pacientes com CEC de esôfago e observaram TGF- β 1 com expressão tecidual aumentada em 29 (36,3%) amostras e apresentou associação significativa apenas com a profundidade do tumor ($p = 0,0335$), porém não foram observadas correlações com metástase linfonodal ou a distância. No mesmo estudo, os níveis plasmáticos de TGF- β 1 apresentaram diferença significativa em comparação aos controles saudáveis ($p < 0,01$) e à medida que os tumores progrediam essa concentração aumentava; porém, não foram observadas diferenças significativas com o estadiamento patológico. Não houve associação significativa da concentração plasmática de TGF- β 1 com metástase linfonodal ou a distância. Os resultados observados indicam que TGF- β 1 pode desempenhar importante papel na progressão do CEC de esôfago. Gonçalves et al. (2015) não encontraram correlação entre a concentração salivar de TGF- β 1 com presença de metástase em pacientes com CECB e sugeriram que a presença de TGF- β 1 na saliva possivelmente exerce um papel fisiológico que contribui para a homeostase da cavidade bucal e portanto não se mostra um forte candidato como biomarcador salivar. Nós evidenciamos concentração elevada de TGF- β 2 na saliva associada aos estágios pT3/pT4 em comparação aos pacientes pT1/pT2. Arantes et al. (2016) investigaram a expressão tecidual de TGF- β 2 em amostras de CECB e sua relação com parâmetros clínicos e

de prognóstico e não observaram associações significativas entre a expressão tecidual de TGF- β 2 em células neoplásicas com a presença de metástase linfonodal ou estadiamento patológico, mas de forma semelhante TGF- β 2 apresentou alta expressão em casos mais avançados (pT3/pT4) da doença, porém sem valor significativo. Bellone et al. (2001) avaliaram a expressão tecidual e a concentração sérica das três isoformas de TGF- β no adenocarcinoma de cólon e observaram que a progressão da doença foi associada ao aumento gradual e significativo da expressão do mRNA de TGF- β 1 e TGF- β 2, enquanto TGF- β 3 foi mais expressa em tecidos normais. Os níveis séricos de TGF- β 1 e TGF- β 2 foram significativamente mais altos em pacientes com adenocarcinoma de cólon do que no grupo controle. Esses resultados indicam diferentes padrões de expressão para as três isoformas de TGF- β nesse tipo de câncer e que TGF- β 1 e TGF- β 2 desempenham papéis sistêmicos em pacientes com adenocarcinoma de colón.

A concentração sérica de TGF- β 3 mostrou-se associada com o estadiamento patológico III/IV, indicando aumento da concentração mediana nesse grupo. Estes resultados nos levam a pensar, que na nossa casuística a presença de TGF- β 3 sistemicamente possa estar agindo como um promotor de crescimento, invasão e metástase. Bellone et al. (2001) não observaram associação significativa entre a expressão de TGF- β 3 e diferentes estágios da doença em pacientes com adenocarcinoma de cólon, sendo a expressão uniforme em todos os estágios analisados, a análise da concentração sérica de TGF- β 3 no período do estudo realizado por Bellone et al. (2001) foi impedida pela falta de um kit Elisa sensível a esta citocina.

5.4. Concentração das citocinas e invasão perineural e espessura do tumor

Nossos resultados mostraram menor concentração sérica de TNF- α em pacientes com presença de invasão perineural. O diagnóstico de invasão perineural é descrito como a presença de câncer no interior ou ao redor de no mínimo 33% do nervo, o que leva à tomada de decisão por um tratamento mais agressivo no CECB. Aqui pacientes com presença de invasão perineural apresentaram redução da concentração de TNF- α e segundo a literatura, esta citocina possui propriedade antitumorigênica porém, quando sua produção crônica é reduzida pelas células neoplásicas ou células estromais pode contribuir na promoção do crescimento tumoral e favorecimento para

a ocorrência de metástases (BALKWILL, 2006; BALKWILL, 2009; HO et al., 2012; SCHMITD et al., 2018). Nossos resultados mostram que novas investigações devem ser realizadas a fim de se determinar a influência de TNF- α sobre a invasão perineural. Investigações futuras podem confirmar se TNF- α realmente é um potencial biomarcador sistêmico de pior prognóstico.

Observamos a concentração salivar de TGF- β 3 associada com a espessura do tumor maior que 10mm, indicando redução da concentração mediana dessa citocina. Na literatura não foram encontrados relatos descrevendo o impacto de TGF- β 3 em relação a espessura do tumor em CECB. Mas sabe-se que TGF- β 3 exibe importantes atividades reguladoras, atuando na manutenção da proliferação, migração e diferenciação celular, além de regular a EMT (YE et al., 2003).

5.5. Concentração das citocinas e sobrevida

Fatores que podem ser detectáveis na saliva ou sangue são fortes candidatos a biomarcadores de prognóstico em pacientes com CECB, sendo facilmente mensurados e as técnicas de coletas sendo consideradas minimamente invasivas, além de permitir que aqueles pacientes com tumores irresssecáveis sejam avaliados segundo o perfil de biomarcadores presentes em seus fluídos e não somente em espécimes cirúrgicos. Os achados na nossa casuística mostram que TNF- α no soro impactou significativamente na sobrevida global, enquanto as concentrações salivares ou séricas de todas as citocinas (IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β) não apresentaram diferença significativa na sobrevida livre de doença. Muitos estudos relatam concentrações elevadas associadas à redução da sobrevida livre de doença ou global em pacientes com CECB, indicando que de fato essas citocinas desempenham papel importante no desfecho da doença e que devem continuar sendo investigadas em uma casuística maior.

Encontramos na literatura diferentes relatos associando IL-6 à sobrevida livre de doença e global. Shinagawa et al. (2016) relataram impacto negativo da expressão elevada de IL-6 em pacientes com CECB na sobrevida livre de doença em 5 anos ($p=0,010$). Observaram que pacientes com alta expressão apresentaram taxa de 56,6% de sobrevida, enquanto aqueles com baixa expressão 88,0% e sugerem que a avaliação por imuno-histoquímica de IL-6 seria útil para prever o tempo de recorrência, abrangendo a ocorrência de metástase a distância. Em acordo com o que

encontramos, Chen et al. (2012) não relataram nenhuma correlação da expressão de IL-6 com a sobrevida livre de doença e global em sua extensa casuística de 337 casos com CECB. Vale ressaltar que uma citocina pode apresentar expressão ou concentrações diferentes dependendo do material biológico (amostra de tumor, sangue ou saliva) analisado. Um dos fatores de influência sobre a produção das citocinas é o meio em que ela se encontra e se existem outros fatores impulsionando sua produção ou causando sua inibição. Schiegnitz et al. (2018) observaram que pacientes com CECB que tinham concentrações séricas de IL-6 ≥ 5 pg/ml apresentaram sobrevida livre de doença significativamente menor (76,3%) após os 18 meses de seguimento quando comparada aos níveis de pacientes com valor sérico de IL-6 < 5 pg/ml (97,2%). De Schutter et al. (2005) observaram em pacientes com CEC de cabeça e pescoço que a concentração sérica mediana de IL-6 ($>5,4$ pg/ml) impactou na redução da sobrevida global em relação ao grupo de pacientes com menor concentração de IL-6 (11,9% vs. 74,9%, $p=0,0009$) e foi observado também redução significativa na sobrevida livre de doença (8,6% vs. 57,7%, $p=0,05$). Michalaki et al. (2004) relataram que concentrações séricas de IL-6 acima de 2,1 pg/ml¹ impactaram significativamente na redução da sobrevida global de pacientes com câncer de próstata. Esses relatos indicam que concentrações séricas de IL-6 elevadas impactam na sobrevida global e sobrevida livre de doença, além de apresentarem aplicabilidade como preditor de recorrência, demonstrando seu papel como biomarcador para o CECB. Os diferentes resultados observados entre os estudos já realizados com IL-6 tanto no soro, quanto na saliva intensificam a necessidade de novas investigações correlacionando seus níveis com variáveis demográficas, clínicas e histopatológicas em pacientes com CECB. Estabelecer um padrão desta citocina para este tipo de câncer pode fornecer importantes correlações desses níveis com a progressão da doença.

A concentração salivar e sérica de IL-8 não mostrou influenciar na sobrevida na presente amostra. Fujita et al. (2014) apesar de observarem ligeira redução na sobrevida livre de doença e global em pacientes com CECB com maior concentração sérica de IL-8 não encontraram diferenças significativas, mas pacientes com estadiamento I e II apresentaram aumento significativo na sobrevida livre de doença, indicando o papel potencial de IL-8 no CECB em estágios iniciais. Já em relação a expressão de IL-8, Fujita et al. (2014) observou que aqueles pacientes com baixa expressão apresentaram sobrevida livre de doença e global significativamente mais

longas do que aqueles com alta expressão de IL-8. Novas investigações se fazem necessárias em uma casuística maior a fim de se estabelecer de forma cautelosa a atuação da IL-8 em tumores menos agressivos e na evolução da doença

Arantes et al. (2016) não relataram associações significativas entre a expressão de IL-10 em células neoplásicas e tempo de sobrevida em pacientes com CECB, apesar de observarem ligeira redução no tempo de sobrevida. Green et al. (2011) não mostraram resultados significativos entre a concentração sérica de IL-10 e sobrevida livre de doença ou global em sua amostra de 108 pacientes com CEC de cabeça e pescoço. Diferentemente, Alhamarneh et al. (2011) observaram correlação significativa entre a concentração sérica de IL-10 e baixa sobrevida livre de doença após um período médio de 15 meses de seguimento em casos com CEC de cabeça e pescoço. Os resultados são heterogêneos em relação a sobrevida e IL-10, mas diferentes desfechos podem ser observados de acordo com os sítios anatômicos analisados, levando em consideração que os sítios analisados nos relatos citados podem apresentar biologias diferentes.

Os diferentes resultados descritos para as concentrações séricas ou salivares de IL-1 β em pacientes com CECB e a literatura escassa dando enfoque ao reflexo que essa citocina pode exercer na progressão tumoral em pacientes com CECB evidenciam como é importante e necessário novos estudos que objetivem analisar a presença desta citocina na saliva e no soro e seu impacto no prognóstico desses pacientes, visto que IL-1 β é descrita como importante agente promotor da angiogênese, EMT e formação de metástases (SORIA et al., 2011; LEE et al., 2015).

A concentração sérica de TNF- α mostrou causar impacto somente na sobrevida global e não na sobrevida livre de doença. Pacientes com concentração sérica menor ou igual a 2,565 pg/ml apresentaram redução significativa na sobrevida global. Michalaki et al. (2004) observaram em sua amostra que pacientes com níveis séricos acima de 1,9 pg/ml¹ de TNF- α apresentaram redução na sobrevida global. Aqueles pacientes com presença de metástase em comparação aos pacientes com doença localizada ou controles apresentaram níveis elevados de TNF- α . Segundo os autores TNF- α se mostrou como um importante marcador prognóstico no soro em relação a progressão da doença. Nosso estudo indica a importância que TNF- α pode representar sistemicamente na tomada de decisão sobre um tratamento menos agressivo. No entanto, mais estudos são necessários para identificar e provar a

atuação de TNF- α sérico sobre variáveis histopatológicas que podem influenciar em decisões relacionadas ao tratamento e prognóstico de pacientes com CECB

Estudos correlacionando TGF- β 1 no soro e saliva com variáveis histopatológicas e o impacto na sobrevida de pacientes com CECB ainda são escassos. Este fato torna relevante a necessidade de novas investigações que utilizem materiais biológicos de fácil obtenção e com invasão mínima, podendo assim contribuir de forma expressiva na avaliação do prognóstico desses pacientes. Arantes et al. (2016) não encontraram associações significativas entre a expressão de TGF- β 2 em células neoplásicas e o tempo de sobrevida em casos com CECB, ainda que tenham observado ligeira redução no tempo de sobrevida. Kloen et al. (1997) estudaram a expressão tecidual das três isoformas de TGF- β no osteosarcoma e observaram a presença da expressão de TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 em todas as amostras analisadas de osteossarcomas clássicos. A imunorreatividade para TGF- β 1 e TGF- β 3 foi mais forte do que para TGF- β 2 e quando analisaram a influência da expressão de TGF- β na progressão da doença, somente TGF- β 3 foi associada com a diminuição estatisticamente significativa do período livre de doença ($p = 0,027$).

Os resultados observados no presente estudo para TGF- β mostram como esta citocina é multifatorial. A literatura a descreve como uma citocina que desempenha duplo papel como um importante componente no desenvolvimento e progressão de tumores epiteliais. Em estágios pré-malignos pode atuar como um supressor tumoral nas células epiteliais, regulando a proliferação, diferenciação, sobrevivência e adesão celular, porém em estágios avançados da doença atua como um promotor de crescimento, invasão e metástase, contribuindo para um pior prognóstico (BIERIE; MOSES, 2006; MASSAGUÉ, 2008). Estudos avaliando a correlação de TGF- β na saliva e no soro com parâmetros clínicos e histopatológicos em pacientes com CECB são insuficientes, porém os resultados apresentados aqui mostram que pesquisas nessa linha de investigação devem continuar e serem intensificadas em uma casuística maior que possibilite a determinação do perfil de cada uma dessas citocinas na progressão do CECB.

Os resultados observados no presente estudo e na literatura existente para citocinas inflamatórias no CECB ainda são heterogêneos e apresentam resultados controversos em relação a progressão da doença e no impacto do valor prognóstico destas citocinas. Assim, novos estudos investigando a atuação de citocinas inflamatórias no CECB e avaliando seus mecanismos de ação durante a progressão

da doença poderão fornecer dados valiosos e complementar de forma significativa a literatura existente.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, nosso trabalho não observou associações das concentrações salivares e séricas de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α e TGF- β com o padrão de invasão na interface tumor/hospedeiro, com a presença de metástase linfonodal e sobrevida livre de doença como era esperado, visto que a literatura destaca estas citocinas como importantes proteínas envolvidas no processo de carcinogênese e progressão tumoral

Aqui nosso trabalho evidenciou:

1. um aumento da concentração salivar de IL-6 e TGF- β 2 em pacientes classificados com estágio pT3 e pT4;
2. TGF- β 3 na saliva mostrou-se relacionada à espessura do tumor, enquanto TGF- β 3 no soro indicou associação com estadiamento patológico avançado;
3. TNF- α no soro apresentou concentração reduzida em pacientes com invasão perineural.

Todos esses critérios são considerados importantes indicadores de pior prognóstico em pacientes com CECB e esses resultados indicam que estas citocinas podem exercer importante papel durante a progressão da doença e estudos futuros mais aprofundados se fazem necessários.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para o nosso conhecimento, este é um dos poucos estudos realizados a fim de se investigar o TGF- β 1 no soro e TGF- β 2 e TGF- β 3 na saliva e soro em pacientes com CECB e sua possível associação com variáveis clínicas, de tratamento e histopatológicas. Estudos futuros podem ser realizados com as três isoformas para confirmar seu papel como potenciais biomarcadores de prognóstico no CECB por meio de utilização da saliva e do soro, considerados materiais biológicos de fácil obtenção por meio de técnicas pouco invasivas. Estas investigações poderão contribuir de forma significativa na melhor compreensão do papel biológico, fisiológico desempenhado por estas citocinas na progressão do CECB.

Além disso, os resultados observados para IL-6 na saliva, IL-8 e TNF- α no soro mostraram-se potencialmente importantes para estudos futuros em uma casuística maior, estas citocinas devem ser melhor avaliadas e o conhecimento de suas vias de sinalização é fator importante para entendimento da atuação das mesmas na progressão da doença e desenvolvimento de diferentes abordagens de tratamento e até fornecer uma maior individualização do tratamento oferecido.

REFERÊNCIAS

- ALHAMARNEH, O. et al. Serum IL10 and circulating CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cell numbers as predictors of clinical outcome and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 33, n. 3, p. 415-423, March 2011.
- ALMANGUSH, A. et al. For early-stage oral tongue cancer, depth of invasion and worst pattern of invasion are the strongest pathological predictors for locoregional recurrence and mortality. **Virchows Archiv**, v. 467, n. 1, p. 39-46, April 2015.
- ALVAREZ, K. L. F. et al. Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9002, 2017.
- AMEENA, M.; RATHY, R. Evaluation of tumor necrosis factor: Alpha in the saliva of oral cancer, leukoplakia, and healthy controls – A comparative study. **Journal of International Oral Health**, v. 11, n. 2, p. 92-99, mar./apr. 2019.
- ARANTES, D. A. C. et al. Overexpression of immunosuppressive cytokines is associated with poorer clinical stage of oral squamous cell carcinoma. **Archives of Oral Biology**, v. 61, p. 28-35, 2016.
- ARELLANO-GARCIA, M. E. et al. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. **Oral Diseases**, v. 14, p. 705-712, 2008.
- ASADULLAH, K. et al. Interleukin-10 in cutaneous disorders: implications for its pathophysiological importance and therapeutic use. **Arch Dermatol Res**, v. 291, n. 12, p. 628-636, 1999.
- AVI, A. L. R. O. et al. Neoplasia de boca e orofaringe: um estudo transversal na Fundação PIO XII – Hospital do Câncer de Barretos, Brasil. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 41, n. 4, p. 273-280, jul./aug. 2012.
- AZIZ, S. et al. Salivary immunosuppressive cytokines IL-10 and IL-13 are significantly elevated in oral squamous cell carcinoma patients. **Cancer Investigation**, v. 33, n. 7, p. 318-328, 2015.
- BAGAN, L. et al. Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 4, p. 737-743, 2016.
- BALKWILL, F. TNF- α in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, p. 409-416, 2006.
- _____. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, 9:361-371, May 2009.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. **The Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, February 2001.

BAPAT, R. et al. Role of Interleukin 8 in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 436-442, mar./apr. 2016.

BARKER, H. E. et al. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, p. 409-425, July 2015.

BELLONE, G. et al. Differential expression of transforming growth factors- β 1, - β 2 and - β 3 in human colon carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 37, n. 2, p. 224-233, 2001.

BENNETT, I. L. Jr; BEESON, P. B. Studies on the pathogenesis of fever, II: characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exudates. **J. Exp. Med.** v. 98, p. 493-508, 1953.

BIERIE, B.; MOSES, H. L. TGF β and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, p. 29-40, 2006.

BOING, A. F. et al. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk?. **J Epidemiol Community Health**. v. 65, p. 709-714, 2011.

BRAILO, V. et al. Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n. 1, p. e10-05, January 2012.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am J Surg Pathol**, v. 29, n. 2, p. 167-178, February 2005.

_____. et al. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 5, p. 676-688, May 2010.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRIERLEY, J. D.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours**. 8th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2016.

BRINKMANN, O. et al. Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. **Oral Oncology**, v. 47, p. 51-55, 2011.

CAMPANA, I. G.; GOIATO, M. C. Tumores de cabeça e pescoço: epidemiologia, fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 34, n. 1, p. 20-26, 2013.

CANCELA, M. C. et al. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. **Head Neck**, v. 32, p. 357-367, March 2010.

CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U. S. A**, v. 72, p. 3666-3670, 1975.

CHANG, K. P. et al. Prognostic cytokine markers in peripheral blood for oral cavity squamous cell carcinoma identified by multiplexed immunobead-based profiling. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 980-987, 2011.

CHEN, C-J. et al. Gender difference in the prognostic role of interleukin 6 in oral squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50104, 2012.

CHEN, L. et al. The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases. **Scientific Reports**, v. 4, n. 5911, p. 1-7, 2014.

COTTIN, S. C. et al. Predictors of circulating interleukin-6 levels in head and neck cancer patients. **Cancers of the Head & Neck**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2018.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, p. 584- 596, 2015.

CURRAN, M. A. et al. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 9, p. 4275-4280, 2010.

DAMICO, R. et al. p53 mediates cigarette smoke–induced apoptosis of pulmonary endothelial cells: inhibitory effects of macrophage migration inhibitor factor. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 44, p. 323-332, 2011.

DEEPTHI, G.; NANDAN, S. R. K.; KULKARNI, P. G. Salivary Tumour Necrosis Factor- α as a Biomarker in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 20, n. 7, p. 2087, 2019.

DERYNCK, R. et al. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nature Genetics**, v. 29, p. 117-129, October 2001.

DETHLEFSEN, C. et al. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 138, n. 3, p. 657-664, 2013.

DE SCHUTTER, H. et al. The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT 1 and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy $\pm$ chemotherapy. **BMC Cancer**, v. 5, n. 42, p. 1-11, 2005.

DE VISSER, K. E.; KORETS, L. V.; COUSSENS, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer cell**, v. 7, n. 5, p. 411-423, 2005.

DINARELLO, C. A. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade?. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 2, p. 317-329, 2010.

DUFFY, S. A. et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 113, n. 4, p. 750-757, 2008.

DUMONDE, D. C. et al. Lymphokines: non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. **Nature**, v. 224, p. 38-42, 1969.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, p. 1471-1474, 2010.

EMMERICH, J. et al. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8+ T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. **Cancer Research**, v. 72, n. 14, p. 3570-3581, July 2012.

Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. C. **Oncologia Molecular**. 1. ed. Atheneu, São Paulo, 2004.

FILLEY, A. C.; DEY, M. Dendritic cell based vaccination strategy: an evolving paradigm. **Journal of neuro-oncology**, v. 133, n. 2, p. 223-235, 2017.

FREUND, A. et al. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen- receptor-negative status of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 22, p. 256-265, 2003.

FUJITA, Y. et al. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 1-17, December 2014.

FUJIEDA, S. et al. IL-10 expression is associated with the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. **Cancer Letters**, v. 136, n. 1, p. 1-9, 1999.

FUKAI, Y. et al. Reduced expression of transforming growth factor- β receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 104, n. 2, p. 161-166, 2003.

FURUTA, H. et al. Selective inhibition of NF- κ B suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 5, p. E625-635, 2012.

GALLO, O. et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **Human pathology**, v. 33, n. 7, p. 708-714, 2002.

GHOLAMIN, M. et al. Overexpression and interactions of Interleukin-10, transforming growth factor β , and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. **World Journal of Surgery**, v. 33, p. 1439-1445, 2009.

GOPINATHAN, G. et al. Interleukin-6 stimulates defective angiogenesis. **Cancer Research**, v. 75, n. 15, p. 3098-3107, August 2015.

GOERTZEN, C. et al. Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasion. **Oncotarget**, v. 9, n. 49, p. 29047-29063, 2018.

GOKHALE, A. S. et al. Serum concentrations of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell cancer of the head and neck. **Oral Oncology**, v. 41, n. 1, p. 70-76, 2005.

GONÇALVES, et al. Immunosuppressive mediators of oral squamous cell carcinoma in tumour samples and saliva. **Human Immunology**, v. 76, n. 1, p.52-58, 2015.

GOUMANS, M. J. et al. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 7, p. 1743-1753, 2002.

GUNDERSON, J; COUSSENS, L. M. B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. **Experimental cell research**, v. 319, n. 11, p. 1644-1649, 2013.

HAMAD, A. W. R. et al. Study of serum and salivary levels of proinflammatory cytokines, potential biomarkers in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Academic Journal of Cancer Research**, v. 4, n. 2, p. 47-55, 2011.

HAMZAVI, M. et al. Tissue Expression, serum and salivary levels of IL-10 in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 3, p. 1681-1685, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, p. 646-674, March 2011.

HATANAKA, K. et al. Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. **Annals of Oncology**, v. 11, n. 7, 815-819, 2000.

HO, M. Y. et al. TNF- α induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3 β -dependent mechanism. **Molecular Cancer Research**, v. 10, p. 1109-1119, June 2012.

HODGE, D. R. et al. Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. **Cancer Research**, v. 65, n. 11, p. 4673-4682, 2005.

HORI, Y. et al. Predictive significance of tumor depth and budding for late lymph node metastases in patients with clinical N0 early oral tongue carcinoma. **Head and Neck Pathology**, v. 11, n. 4, p. 477-486, 2017.

_____. et al. Association between pathological invasion patterns and late lymph node metastases in patients with surgically treated clinical No early oral tongue carcinoma. **Head & Neck**, p. 1-6, 2019.

International Agency for Research on Cancer - World Health Organization. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. GLOBOCAN 2018. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 04 fev.2018.

ISAACS, A; LINDENMANN, J. Virus interference. 1. The interferon. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 147, p. 258-267, 1957.

JABLONSKA, E. et al. Serum Levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , sTNF-RI and CRP in patients with oral cavity cancer. **Pathology Oncology Research**, 1997; 3(2): 126-129.

JAKOWLEW, S. B. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, p. 435-457, 2006.

JINNO, T. et al. Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v. 33, n. 5, p. 2161-2168, 2015.

JOHN, M. A. R. S. et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Archives of Otolaryngol Head & Neck Surgery**, v. 130, n. 8, p. 929-935, August 2004.

JURETIĆ, M. et al. Salivary levels of TNF- α and IL-6 in patients with oral premalignant and malignant lesions. **Folia Biologica (Praha)**, v. 59, p. 99-102, 2013.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p.1420-1428.

KAPRAL, M. et al. Transforming growth factor β isoforms (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) messenger RNA expression in laryngeal cancer. **American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery**, v. 29, n. 4, p. 233-237, 2008.

KARIN, M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 431-436, May 2006.

KLOEN, P. et al. Expression of transforming growth factor- β (TGF- β) isoforms in osteosarcomas: TGF- β 3 is related to disease progression. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 80, n. 12, p. 2230-2239, 1997.

KOPP, A. et al. Transforming growth factor β 2 (TGF- β 2) levels in plasma of patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen. **Cancer Research**, v. 55, n. 20, p. 4512-451, October 1995.

KRASAGAKIS, K. et al. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)- β 1 and TGF- β 2 in patients with disseminated malignant melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 77, n. 9, p. 1492-1494, 1998.

KUDINOV, A. E.; BECK, T. N. Transforming growth factor Beta (TGF- β) signaling in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Molecular Determinants of Head and Neck Cancer. Humana Press, Cham**, p. 89-115, 2018.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670-691, 2017.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-1022, May 2014.

LEE, C. H. et al. IL-1 β promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 4, p. 875-884, 2014.

LEE, L. T. et al. Evaluation of saliva and plasma cytokine biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 47, n. 6, p. 699-707, 2017.

LEE, S.; MARGOLIN, K. Cytokines in cancer immunotherapy. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 3856-3893, 2011.

LEVI-MONTALCINI, R; HAMBURGER, V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. **J. Exp. Zool.** v. 116, p. 321-361, 1951.

LI, Y. et al. IL-1 β promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. **Molecular Cancer**, v. 11, n. 87, p. 1-13, 2012.

LIN, D. T. et al. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. **Head Neck**, v. 24, p. 792-799, 2002.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, May 2007.

LINKOV, F. et al. Early detection of head and neck cancer: development of a novel screening tool using multiplexed immunobead-based biomarker profiling. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 16, n. 1, p. 102-107, 2007.

LIU, X. et al. Three polymorphisms in interleukin-1 β gene and risk for breast cancer: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 124, n. 3, p. 821-825, 2010.

LOTFI, A. et al. Serum level of interleukin-6 in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. **Iranian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 27, n. 3, p. 207-211, May 2015.

LONGATTO, F. A. et al. How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 5, n. 140, p. 1-9, 2007.

LU, S-L. et al. Overexpression of transforming growth factor β 1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. **Cancer Research**, v. 64, n. 13, p. 4405-4410, July 2004.

MA, G-F. et al. Transforming growth factor- β 1 and - β 2 in gastric precancer and cancer and roles in tumor-cell interactions with peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. e54249, 2013.

MACCIÒ, A.; MADEDDU, C. The role of interleukin-6 in the evolution of ovarian cancer: clinical and prognostic implications - a review. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 12, p. 1355-1368, 2013.

MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature**, v. 457, p. 36-37, 2009.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.

MASSAGUÉ, J. TGF β in Cancer. **Cell**, v. 134, p. 215-230 July 2008.

_____. TGF beta signalling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 616-630, October 2012.

MASSAGUÉ, J; OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, January 2016.

MICHALAKI, V. et al. Serum levels of IL-6 and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 2312-2316, 2004.

MOJTAHEDI, Z. et al. Serum interleukine-6 concentration, but not interleukine-18, is associated with head and neck squamous cell carcinoma progression. **Pathology & Oncology Research**, v. 17, n. 1, p. 7-10, 2011.

MULLEN, A. C. et al. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. **Cell**, v. 147, p. 565-576, October 2011.

MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 2-8, January 2013.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT M. **Imunobiologia de Janeway**. 7^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NEMUNAITIS, J. et al. Comparison of serum interleukin-10 (il-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. **Cancer Investigation**, v. 19, n. 3, p. 239-247, 2001.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 22, p. 83-89, 2011.

NGUYEN, D. P. et al. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). **BJU International**, v. 113, p. 986-992, 2014.

PARK, DAE-GUN. et al. Serum levels of Interleukin-6 and titers of antibodies against Porphyromonas gingivalis Could Be Potential Biomarkers for the Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2749, 2019.

PARK, M. H.; HONG, J. T. Roles of NF-B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. **Cells**, v. 5, n. 15, p. 1-13, 2016.

PATERSON, I. C. et al. Decreased expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 193, p. 458-467, 2001.

PINDBORG, J. J.; WAHI, P. N. **Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. World Health Organization Classification of Tumours**. 2th ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997.

POLZ-DACEWICZ, M. et al. Salivary and serum IL-10, TNF- α , TGF- β , VEGF levels in oropharyngeal squamous cell carcinoma and correlation with HPV and EBV infections. **Infectious Agents and Cancer**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2016.

PURDUE, M. P. et al. Type of alcoholic beverage and risk of head and neck cancer - a pooled analysis within the INHANCE consortium. **American Journal of Epidemiology**, n. 169, n. 2 132-42, 2009.

RIEDEL, F. et al. Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 25, p. 2761-2766, 2005.

RIUS, J. et al. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . **Nature**, v. 453, p. 807-812, June 2008.

ROSSETTI, R. A. M. et al. B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses. **PloS one**, v. 13, n. 7, p. e0199034, 2018.

SANJABI, S. et al. Regulation of the immune response by TGF- β : from conception to autoimmunity and infection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, p. a022236, 2017.

SAHEBJAMEE, M. et al. Salivary concentration of TNF α , IL1 α , IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 13, n. 5, p. E292-E295, May 2008.

SATO, J. et al. Changes in saliva interleukin-6 levels in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 110, n. 3, p. 330-336, 2010.

SCHAFER, Z. T.; BRUGGE, J. S. IL-6 involvement in epithelial cancers. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 12, p. 3660-3663, December 2007.

SCHIEGNITZ, E. et al. Proinflammatory cytokines as serum biomarker in oral carcinoma - A prospective multibiomarker approach. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 3, p. 268-274, 2018.

SCHMITD, L. B. et al. Redefining perineural invasion: integration of biology with clinical outcome. **Neoplasia**, v. 20, n. 7, p. 657-667, July 2018.

SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 13, p. 800-812, 2013.

SEMENZA, G. L; RUVOLO, P. P. Introduction to tumor microenvironment regulation of cancer cell survival, metastasis, inflammation, and immune surveillance. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 3, p. 379-381, March 2016.

SELVAM, N. P.; SADAKSHARAM, J. Salivary interleukin-6 in the detection of oral cancer and precancer. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 11, p. 236-241, 2015.

SHIMIZU, S. et al. Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0195451, 2018.

SHINAGAWA, K. et al. Clinical roles of interleukin-6 and STAT3 in oral squamous cell carcinoma. **Pathology & Oncology Research**, v. 23, n. 2, p. 425-431, 2016.

SHINRIKI, S. et al. Interleukin-6 signalling regulates vascular endothelial growth factor-C synthesis and lymphangiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. **The Journal of Pathology**, v. 225, p. 142-150, 2011.

SORIA, G. et al. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. **BMC Cancer**, v. 11, n. 130, p. 1-20, 2011.

SPILL, F. et al. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 40, p. 41-48, 2016.

STEARNS, M. E. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 189-196, January 1999.

SUHAIL, Y. et al. Systems biology of cancer metastasis. **CellSystems**, v. 9, n. 2, p. 109-127, 2019.

TAKAMUNE, Y. et al. Involvement of NF- κ B-mediated maturation of ADAM-17 in the invasion of oral squamous cell carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, p. 393-398, 2008.

VAL, M. et al. Variations of salivary concentration of cytokines and chemokines in presence of oral squamous cell carcinoma. A case-crossover longitudinal prospective study. **Cytokine**, v. 120, p. 62-65, 2019.

VAN GORP, H; LAMKANFI, M. The emerging roles of inflammasome-dependent cytokines in cancer development. **EMBO reports**, v. 20, n. 6, p. 1-15, 2019.

VICARI, A. P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth?. **Immunological Reviews**, v. 202, n. 1, p. 223-236, 2004.

VIRCHOW, R. Cellular Pathology as Based Upon Physiological and Pathological Histology. **JB Lippincott**, 1863.

WALDNER, M. J. et al. Interleukin-6 - A key regulator of colorectal cancer development. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 1248-1253, 2012.

WANG, F. et al. Current and potential inflammation targeted therapies in head and neck cancer. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 389-395, 2009.

WATERS, J. P. et al. Tumour necrosis factor and cancer. **The Journal of Pathology**, v. 230, p. 241-48, 2013.

WAUGH, D. J. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6735-6741, November 2008.

WOLF, G. T. et al. Histologic pattern of invasion and epithelial-mesenchymal phenotype predict prognosis in squamous carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, v. 87, p. 29-35, 2018.

WOZNIAK, K. L. et al. Inhibitory effects of whole and parotid saliva on immunomodulators. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 17, n. 2, p. 100-107, 2002.

WRANA, J. L. et al. TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. **Cell**, v. 71, p. 1003-1014, December 1992.

YANG, L. et al. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 6, p. 220-227, 2010.

YE, P. et al. Differential expression of transforming growth factors- β 1, - β 2, - β 3 and the type I, II, III receptors in the lining epithelia of inflamed gingiva. **Pathology**, v. 35, n. 5, p. 384-392, 2003.

ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **International Journal of Biology Sciences**, v. 7, n. 5, p. 651-658, 2011.

ZANG, Z. et al. Compositional and functional analysis of the microbiome in tissue and saliva of oral squamous cell carcinoma. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1439, p. 1-11, 2019.

ZIJL, F. V. et al. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 728, p. 23-34, 2012.

GLOSSÁRIO

Antigenicidade: Qualidade da substância capaz de estimular a produção de anticorpos; condição de antígeno.

Fator de Transcrição Ap-2: Pertence à família de proteínas ligantes de DNA que regulam a expressão de diversos genes nas fases de diferenciação celular e apoptose, além de estarem envolvidos na dimerização e na ligação a sequências específicas do DNA.

Inflamassoma: Complexo de detecção de agentes patogênicos multiproteico no sistema imunitário inato.

Naive: conceito funcional de uma célula que não está polarizada para uma função.

Tolerogênico: Antígenos para os quais é induzida a tolerância.

Quimiotaxia: Movimento celular induzido pela presença de substâncias químicas.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do projeto de pesquisa: “Estudo da concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias e a correlação com a progressão tumoral em pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cavidade bucal”

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA OS CASOS - Data: ____/____/____

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo para investigar o papel de fatores inflamatórios no câncer de cabeça e pescoço. Estamos consultando o (a) Sr.(a) sobre a possibilidade de que as suas amostras excedentes de seu sangue, saliva e tumor coletados durante o Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (FAPESP nº2010/05168-0), que se encontram armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis, possam ser utilizadas neste projeto de pesquisa. Seu médico nos forneceu seu nome e nos concedeu autorização para convidá-lo a participar deste estudo. Sua participação neste estudo é voluntária. O(A) Sr.(a) pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento médico que o(a) Sr.(a) está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que você possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, o pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa irá consultar os seus dados clínicos, para identificar se poderá utilizar seu material biológico já coletado durante o Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (FAPESP nº2010/05168-0). A partir deste material biológico realizarei exames laboratoriais para analisar as concentrações salivares e séricas de citocinas inflamatórias e o possível papel dessas proteínas na evolução do carcinoma epidermoide da cavidade bucal.

ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O sangue, a saliva e as amostras de tumor serão enviados a laboratórios para análise. Essas amostras serão testadas para as características genéticas e celulares que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença. Suas amostras serão armazenadas por até 30 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas no presente estudo. Ao concordar em participar deste estudo, o(a) Sr.(a) concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Nenhuma destas amostras será testada para detectar o uso de drogas ilegais. Qualquer uso futuro das amostras ou estudo de acompanhamento será aprovado por um comitê de ética.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

As amostras biológicas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado continuará a ser armazenado para ser utilizado no futuro para ajudar os cientistas a aprender mais sobre os fatores relacionados ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para o(a) Sr.(a). Não haverá nenhum custo financeiro para o(a) Sr.(a) participar neste estudo e não há nenhuma compensação ou pagamento pela autorização concedida para utilização das amostras biológica.

DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS

Toda pesquisa realizada com seres humanos pode oferecer alguma possibilidade de risco. Mas como no presente estudo não está previsto nenhum tipo de coleta ou procedimento invasivo, então nenhum risco imediato está previsto para o(a) Sr.(a), devido a utilização apenas de suas amostras biológicas que já foram coletadas durante

o Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (FAPESP nº2010/05168-0). Neste projeto de pesquisa, nenhum dano imediato ou tardio que possa comprometer sua saúde está previsto. O pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa se compromete a interromper a pesquisa se qualquer risco ou dano ocorrer a sua saúde, previstos ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Não haverá benefícios diretos para o(a) Sr.(a) que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica.

GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE

As informações relativas à sua participação no estudo serão mantidas confidenciais e serão usadas apenas para fins científicos, em conformidade com a legislação aplicável do Brasil. Ninguém, exceto os membros da equipe de pesquisa terão acesso às suas respostas e aos resultados de testes. Seu empregador (patrão) não terá acesso a quaisquer resultados ou informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer. As amostras biológicas utilizadas não serão identificadas com o seu nome. Seu nome não será usado em nenhum relatório e nem divulgado de forma alguma.

DIREITO A SE RETIRAR DO ESTUDO

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) Sr.(a) pode se recusar a participar e/ou retirar o seu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou perda de algum benefício que tenha recebido anteriormente. Se o(a) sr.(a) decidir dar agora seu consentimento para a guarda das amostras biológicas para a presente pesquisa, mas depois mudar de ideia, poderá enviar sua recusa por escrito para (inserir o nome do pesquisador responsável na instituição, endereço e telefone de contato): _____

_____, todos os remanescentes das suas amostras biológicas serão então destruídos. A sua decisão sobre esse assunto não afetará o seu tratamento médico ou seu emprego.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado “sim” e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado “não”. “Declaro que recebi uma via original deste termo de consentimento”.

SIM	NÃO	Parte do estudo
()	()	Acesso aos prontuários médicos
()	()	Amostra de sangue
()	()	Amostras de saliva
()	()	Amostras de tumor

Assinatura do paciente: _____ Assinatura da testemunha: _____

Nome do paciente: _____ Nome da testemunha: _____

Data: _____ Data: _____

ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo da concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias e a correlação com a progressão tumoral em pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cavidade bucal

Pesquisador: Marcos Brasilino de Carvalho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71198317.4.0000.0065

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.289.565

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de tese descrevendo o estudo como retrospectivo em uma população pacientes com a confirmação histológica de carcinoma epidermoide da cavidade bucal já operados entre 2011 e 2016.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a concentração salivar e sérica de citocinas inflamatórias em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos.

Os benefícios esperados serão refletidos na população oncológica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é descrito como prospectivo para a análise e correlação. A casuística será composta por amostras já coletadas de 40 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico por carcinoma

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 2.289.565

epidermoide da cavidade bucal, compreendendo os sítios C02 (Língua) e C04 (Soalho de boca), com estadiamento patológico do tumor primário pT1, pT2, pT3 ou pT4. As informações clínicas, anatomopatológicas e de seguimento serão levantadas do prontuário médico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE solicita a autorização para o uso do material anteriormente coletado e para levantar os dados do prontuário médico, com a devida autorização do Departamento.

Recomendações:

Sugerimos adequar a casuística como 40 amostras de pacientes, considerando-se que os pacientes não serão estudados, e sim as amostras coletadas e dados previamente anotados em prontuário.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Estudo bem delineado de interesse clínico e científico.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_940021.pdf	06/09/2017 13:23:11		Aceito
Outros	Termo_de_autorizacao.pdf	06/09/2017 12:15:19	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	06/09/2017 12:10:07	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Keila_Taira_Macedo.docx	06/09/2017 12:02:21	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	04/07/2017 14:44:41	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 2.289.565

SAO PAULO, 21 de Setembro de 2017

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

ANEXO C – Resultados observados por diferentes autores para IL-6 segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos

IL-6				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Bagan et al. (2015)	CECB (20)	Saliva	ELISA	1. Metástase linfonodal
		Soro	ELISA	Nenhuma correlação
Brailo et al. (2012)	CECB (28); leucoplasia (29); grupo controle (31)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. leucoplasia e grupo controle
		Soro	ELISA	Nenhuma correlação
Chen et al. (2012)	CECB (337)	Tecido	Imunohistoquímica	1. Gênero 2. Grau de diferenciação 3. Metástase linfonodal
Cottin et al. (2018)	CEC cabeça e pescoço	Soro	Imunomérico quimioluminescence	1. idade 2. Gênero 3. Estado civil 4. IMC 5. Tabagismo 6. Sítio da lesão
De Schutter et al. (2005)	CEC cabeça e pescoço (34)	Soro	ELISA	1. N+ 2. Sobrevida global 3. Sobrevida livre de doença
Duffy et al. (2008)	CEC cabeça e pescoço (444)	Soro	ELISA	1. Idade 2. Tabagismo 3. Estadiamento clínico
Goertzen et al. (2018)	CECB (17); grupo controle (13)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Hamad et al. (2011)	CECB (30); grupo controle (20)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle

Continua

Continuação

IL-6				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Hamad et al. (2011)	CECB (30); grupo controle (20)	Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Jablonska et al. (1997)	CECB (42); grupo controle (15)	Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle 2. Estadiamento patológico
Jinno et al. (2015)	CECB (78)	Tecido	Imunohistoquímica	1. Metástase à distância 2. Metástase linfonodal 3. Estadiamento clínico
John et al. (2004)	CECB (32); grupo controle (32)	Saliva	ELISA	Nenhuma correlação
		Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Juretic et al. (2014)	CECB (19); displasia (19); grupo controle (19)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB e displasia vs. grupo controle
Lee et al. (2017)	CECB (41); grupo controle (24)	Saliva	xMAP	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle 2. Estádio I/II vs. grupo controle
Lotfi et al. (2015)	CECB (17); grupo controle (17)	Plasma	xMAP	1. Estadiamento patológico
		Soro	ELISA	Nenhuma correlação
Michalaki et al. (2004)	CA próstata (80); grupo controle (38)	Soro	ELISA	1. Metástase à distância 2. Metástase linfonodal 3. Estágio pT 4. Sobrevida global

Continua

Continuação

IL-6				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Jablonska et al. (1997)	CECB (42); grupo controle (15)	Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. Grupo controle 2. Estadiamento patológico
Jinno et al. (2015)	CECB (78)	Tecido	Imunohistoquímica	1. Metástase à distância 2. Metástase linfonodal 3. Estadiamento clínico
John et al. (2004)	CECB (32); grupo controle (32)	Saliva	ELISA	Nenhuma correlação
		Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Juretic et al. (2014)	CECB (19); displasia (19); grupo controle (19)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB e displasia vs. grupo controle
Lee et al. (2017)	CECB (41); grupo controle (24)	Saliva	xMAP	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle 2. Estádio I/II vs. grupo controle
Lotfi et al. (2015)	CECB (17); grupo controle (17)	Plasma	xMAP	1. Estadiamento patológico
		Soro	ELISA	Nenhuma correlação
Michalaki et al. (2004)	CA próstata (80); grupo controle (38)	Soro	ELISA	1. Metástase à distância 2. Metástase linfonodal 3. Estágio pT 4. Sobrevida global

Continua

Continuação

IL-6				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Riedel et al. (2005)	CEC cabeça e pescoço (90); grupo controle (39)	Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CEC vs. grupo controle 2. Estágio pT 3. Metástase linfonodal
Selvam e Sadaksharam. (2015)	CECB (25); Leucoplasia (25); grupo controle (25)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB e leucoplasia 2. Estadiamento patológico
Shinagawa et al. (2016)	CECB (116)	Tecido	Imunohistoquímica	1. Padrão de invasão 2. Invasão vascular 3. Metástase linfonodal 4. Sobrevida livre de doença
Val et al. (2019)	CECB (27)	Saliva	xMAP	1. Concentração aumentada
Macedo (presente estudo)	CECB (39)	Saliva	xMAP	1. Sítio da lesão 2. Estágio pT
		Soro	xMAP	Nenhuma correlação

Conclusão

ANEXO D – Resultados observados por diferentes autores para IL-8 segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos

IL-8				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Arellano-Garcia (2008)	CECB (20); Grupo controle (20)	Saliva	xMAP + ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Brinkmann et al. (2011) Fujita et al. (2014)	CECB (35) CECB (50)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
		Soro	ELISA	1. Sobrevida livre de doença
		Tecido	Imunohistoquímica	1. Sobrevida livre de doença
Goertzen et al. (2018)	CECB (17); grupo control (13)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Gokhale et al. (2005)	CEC cabeça e pescoço (15)	Soro	ELISA	1. Metástase
Hamad et al. (2011)	CECB (30); Grupo controle (20)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
		Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
John et al. (2004)	CECB (32); grupo controle (32)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
		Soro	ELISA	Nenhuma correlação
Lee et al. (2017)	CECB (41); grupo controle (24)	Saliva	xMAP	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle 2. Estádio I/II vs. grupo controle

Continua

Continuação

IL-8				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Rhodus et al. (2005)	CECB (13); displasia (13); grupo controle (13)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. displasia e grupo controle
SahebJamee et al. (2008)	CECB (18)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. displasia e grupo controle
Schiegnitz et al. (2018)	CECB (81); leucoplasia (75); grupo controle (49)	Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. leucoplasia e grupo controle
Val et al. (2019)	CECB (27)	Saliva	xMAP	1. Concentração aumentada
Macedo (presente estudo)	CECB (39)	Saliva	xMAP	Nenhuma correlação
		Soro	xMAP	1. Grau de diferenciação

Conclusão

ANEXO E – Resultados observados por diferentes autores para IL-10 segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos

IL-10				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Alhamarneh et al. (2010)	CEC cabeça e pescoço (108)	Soro	ELISA	1. Metástase linfonodal 2. Estágio PT 3. Estadiamento patológico 4. Sítio da lesão 5. Sobrevida livre de doença
Arantes et al. (2016)	CECB (43)	Tecido	Imunohistoquímica	1. Estágio pT
Aziz et al. (2015)	CECB (30)	Saliva	xMAP	Nenhuma correlação
Gonçalves et al. (2015)	CECB (22); grupo controle (23)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Green et al. (2011)	CEC cabeça e pescoço (107)	Soro	ELISA	1. Estágio pT2. Estadiamento 3. Metástase linfonodal
Hamzavi et al. (2013)	CEC cabeça e pescoço (30); grupo controle (24)	Saliva	ELISA	Nenhuma correlação
Linkov et al. (2007)	CEC cabeça e pescoço (116)	Soro	xMap	1. Estadiamento patológico
Pols-Dacewicz et al. (2016)	CEC orofaringe (78); grupo controle (40)	Saliva		1. Aumento da concentração no CECB vs. displasia e grupo controle 2. Tabagismo
Macedo (presente estudo)	CECB (39)	Saliva	xMAP	Nenhuma correlação
		Soro	xMAP	1. Grau de diferenciação

ANEXO F – Resultados observados por diferentes autores para IL-1 β segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos

IL-1 β				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Arellano-Garcia (2008)	CECB (20); grupo controle (20)	Saliva	xMAP + ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Brailo et al. (2012)	CECB (28); Leucoplasia (29); grupo controle (31)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. leucoplasia bucal e grupo controle
		Soro	ELISA	Abaixo do nível de detecção
Brinkmann et al. (2011)	CECB (35)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
		Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Goertzen et al. (2018)	CECB (17); grupo controle (13)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Jablonska et al. (1997)	CECB (42); grupo controle (15)	Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle 2. Estadiamento patológico
Lee et al. (2017)	CECB (41); grupo controle (24)	Saliva	xMAP	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle 2. Estádio I/II vs. grupo controle

Continua

Continuação

IL-1 β				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Soria et al. (2011)	CA mama (88); grupo controle (38)	Tecido	Imunohistoquímica	1. Aumento da expressão nas células tumorais vs. grupo controle 2. Aumento da expressão em pacientes com recidiva
Val et al. (2019)	CECB (27)	Saliva	xMAP	1. Concentração aumentada
Macedo (presente estudo)	CECB (39)	Saliva	xMAP	Nenhuma correlação
		Soro	xMAP	1. Gênero

Conclusão

ANEXO G – Resultados observados por diferentes autores para TNF- α segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos

TNF- α				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Amena e Rathy (2019)	CECB (30); Leucoplasia bucal (30); grupo controle (30)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração CECB vs. Grupo controle 2. Grau de diferenciação 3. Estadiamento patológico
Brailo et al. (2012)	CECB (28); leucoplasia bucal (29); grupo controle (31)	Saliva	ELISA	Nenhuma correlação
		Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no grupo controle vs. CECB e leucoplasia
Deepthi et al. (2019)	CECB (30); leucoplasia bucal (30); grupo controle (30)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle e leucoplasia bucal 2. Grau de diferenciação
Goertzen et al. (2018)	CECB (17); grupo controle (13)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle
Jablonska et al. (1997)	CECB (42); grupo controle (15)	Soro	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle 2. Estádios II vs. IV 3. Estadiamento patológico
Juretic et al. (2014)	CECB (19); displasia (19); grupo controle (19)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB e displasia vs. grupo controle
Lee et al. (2017)	CECB (41); grupo controle (24)	Saliva	xMAP	1. Aumento da concentração no CECB vs. grupo controle 2. Estádio I/II vs. grupo controle
Michalaki et al. (2004)	CA próstata (80); grupo controle (38)	Soro	ELISA	1. Metástase à distância 2. Metástase linfonodal 3. Estágio PT 4. Sobrevida global
Pols-Dacewicz et al. (2016)	CEC orofaringe (78); grupo controle (40)	Saliva		1. Grau de diferenciação
Rhodus et al. (2005)	CECB (13); displasia (13); grupo controle (13)	Saliva	ELISA	Nenhuma correlação

Continua

Continuação

TNF- α				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
SahebJamee et al. (2008)	CECB (18)	Saliva	ELISA	1. Aumento da concentração no CECB vs. displasia e grupo controle
Schiegnitz et al. (2018)	CECB (81); Leucoplasia (75); grupo controle (49)	Soro	ELISA	Nenhuma correlação
Soria et al. (2011)	CA mama (88); grupo controle (38)	Tecido	Imunohistoquímica	1. Aumento da expressão nas células tumorais vs. grupo controle 2. Aumento da expressão em pacientes com recidiva
Macedo (presente estudo)	CECB (39)	Saliva	xMAP	Nenhuma correlação
		Soro	xMAP	1. Invasão perineural 2. Sobrevida global

Conclusão

ANEXO H – Resultados observados por diferentes autores para TGF- β segundo o tipo de câncer, material biológico e métodos

TGF- β				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Arantes et al. (2016)	CECB (43)	Tecido	Imunohistoquímica	Nenhuma correlação (TGF- β 2)
Bellone et al. (2001)	Adenocarcinoma de cólon (10); grupo controle (10)	Soro	ELISA	1. TGF- β 1 e TGF- β 2: aumento da concentração vs. grupo controle 2. TGF- β 3: sem kit Elisa disponível
		Tecido	Imunohistoquímica	1. Aumento da expressão de TGF- β 1 e TGF- β 2 em estádios III/IV
Fukai et al. (2003)	CEC esôfago (70); grupo controle (30)	Plasma	ELISA	1. TGF- β 1: aumento da concentração vs. grupo controle
		Tecido	Imunohistoquímica	1. Aumento da expressão de TGF- β 1 em 36,3% das amostras 2. Profundidade de invasão
Gonçalves et al. (2015)	CECB (22); grupo controle (23)	Saliva	ELISA	Nenhuma correlação (TGF- β 1)
Kapral et al. (2008)	CEC laringe (32)	Tecido	qPCR	1. Expressão aumentada de TGF- β 1 e TGF- β 2
Kloen et al. (1997)	Osteosarcoma (25)	Tecido	Imunohistoquímica	1. Expressão positiva das 3 isoformas 2. Imunorreatividade mais forte de TGF- β 1 e TGF- β 3 3. TGF- β 3 reduziu período livre de doença

Continua

Continuação

TGF- β				
Autores (ano)	Sítio (n)	Material biológico	Método	Resultados
Kopp et al. (1995)	CA mama (20); grupo controle (7)	Plasma	Imunohistoquímica	1. Pacientes (remissão): aumento concentração de TGF- β 2 nas 4-6 semanas de tratamentos 2. Pacientes sem resposta: níveis inalterados/diminuídos após início da terapia, seguido de aumento que precedeu progressão maligna
Krasagakis et al. (1998)	Melanoma (25); grupo controle (12)	Plasma	ELISA	1. TGF- β 1 e TGF- β 2 níveis elevados vs. grupo controle
Lu et al. (2004)	CEC cabeça e pescoço (?); grupo controle (5)	Tecido	ELISA	1. TGF- β 1 aumento da concentração vs. grupo controle
Ma et al. (2013)	CA gástrico (73); grupo controle (20)	Soro	ELISA	1. Aumento da concentração de TGF- β 1 e TGF- β 2 em pacientes estágios iniciais e avançados vs. grupo controle
		Tecido	Imunohistoquímica	1. Expressão aumentada de TGF- β 1 associou-se com a progressão da doença
Paterson et al. (2001)	CECB (13); grupo controle (8)	Tecido	Imunohistoquímica	Nenhuma correlação
Pols-Dacewicz et al. (2016)	CEC orofaringe (78); grupo controle (40)	Saliva		1. Metástase linfonodal
Macedo (presente estudo)	CECB (39)	Saliva	xMAP	1. Estágio pT (TGF- β 2) 2. Espessura do tumor (TGF- β 3)
		Soro	xMAP	1. Estadiamento patológico (TGF- β 3)

Conclusão