



**CESPU**

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

# Citocinas salivares na deteção do cancro oral: revisão sistemática integrativa

Giulia Attene

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária (Ciclo Integrado)

Gandra, 3 de Maio de 2022



**CESPU**

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Giulia Attene**

**Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária (Ciclo Integrado)**

**Citocinas salivares na deteção do cancro oral: revisão sistemática integrativa**

**Trabalho realizado sob a Orientação de Professor Doutor José Manuel Barbas Amaral**

## Declaração de Integridade

Eu, acima identificado, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.



**CESPU**  
INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Agradecimentos:

À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão que sempre me e encorajaram ao longo deste caminho, que sempre foram os meus pilares e os primeiros a acreditar em mim. Obrigada por todo o amor que me tem dado, obrigada por me apoiar neste projeto de vida, e pela grande oportunidade que me deram, sem vocês nunca teria chegado aqui. Um agradecimento geral a toda a minha família por estar sempre presente.

À Arianna, com quem vivi tantos momentos únicos, a ela que foi a minha primeira companheira aqui em Portugal e que se que se tornou numa grande amiga. Obrigada, por todas as vezes que me apoiaste, sempre pronta a ouvir-me e perceber-me.

As minhas amigas, Mara, Federica, Prudenza e Veronica, obrigada por todos os bons momentos que passámos juntas, pelo apoio, conselhos, pelas nossas conversas e os nossos jantares, sem vocês não teria sido o mesmo.

Obrigada a Matthieu com quem partilhei tanto este último ano, obrigada por apoiar-me e por estar ao meu lado.

Obrigada au meus colegas Giovanni e Nicola.

Obrigada a Eduarda, com quem partilhei muito durante este percurso universitário, obrigada por ter sido um excelente binómio, por estar sempre presente e disponível.

À minha amiga Martina, que sempre esteve presente na minha vida, que sempre me apoiou e acreditou em mim, com quem partilhei tantas aventuras e tantos momentos, obrigada por estar sempre presente.

Uma grande obrigada a todas as minhas amigas: Demetria, Alessandra, Valeria, Federica, Franca, Claudia, Sonia e Giulia apesar da distância, a nossa amizade sempre permaneceu intacta. Obrigada por estar na minha vida.

Obrigada au Portugal, por me ter dado esta maravilhosa experiência de vida que sempre levarei comigo.

Agradeço por fim o meu orientador, Professor Doutor José Manuel Barbosa Amaral obrigada pelo acompanhamento, disponibilidade, gentileza e pela sua ajuda constante durante a realização deste trabalho.



RESUMO:

**Introdução:** O carcinoma epidermóide oral (CEO) é o tipo mais comum de cancro da cabeça e pescoço. Convencionalmente, o CEO é diagnosticado por exame histopatológico de biópsias de lesões orais que parecem suspeitas ao exame visual direto. O uso da saliva como biofluido diagnóstico tem despertado considerável interesse devido à sua proximidade com células cancerígenas, acessibilidade, colheita não invasiva e amostragem económica.

**Objetivo:** O objetivo desta revisão sistemática integrativa é analisar os estudos caso-controlo mais recentes que comparem os níveis de citocinas em pacientes com cancro oral (CO), lesões potencialmente malignas (LPM) e grupo controlo, para determinar se estes marcadores têm validade no diagnóstico precoce da neoplasia.

**Materiais e métodos:** Foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed (via National Library of Medicine) com o utilizo das seguintes palavras-chave: [cytokines], [oral cancer], [saliva], [biomarkers], e segundo critérios de elegibilidade foram considerados relevantes 20 dos 526 artigos encontrados. Foram incluídos artigos de caso-controlo, artigos dos últimos 10 anos e artigos em língua inglesa.

**Resultados/discussão:** As citocinas dependentes de NF-kappaB são mensageiros envolvidos nos processos de inflamação, angiogénese e alterações na imunidade do hospedeiro que tem sido observadas superexpressas em paciente com cancro oral em comparação com controles e indivíduos com LPM.

**Conclusão:** O aumento das citocinas salivares, pode ser considerado um indicador valioso no processo de transformação maligna, mas os níveis de expressão das citocinas parecem não estar significativamente associados ao estadio do tumor.

Palavras-chave: cytokines, oral cancer, saliva, biomarkers.



ABSTRACT:

**Introduction:** Oral epidermoid carcinoma (CEO) is the most common type of head and neck cancer. Conventionally, CEO is diagnosed by histopathological examination of biopsies of oral lesions that appear suspicious on direct visual examination. The use of saliva as a diagnostic biofluid has aroused considerable interest due to its proximity to cancer cells, accessibility, non-invasive collection and cost-effective sampling.

**Objective:** The aim of this integrative systematic review is to analyse the most recent case-control studies comparing cytokine levels in patients with oral cancer (OC), potentially malignant lesions (PML) and control group, to determine whether these markers have validity in the early diagnosis of neoplasia.

**Materials and methods:** A literature search was conducted in the PubMed database (via National Library of Medicine) using the following keywords: [cytokines], [oral cancer], [saliva], [biomarkers], and according to eligibility criteria 20 of the 526 articles found were considered relevant. The inclusion criteria were: clinical trial group-control, articles from the last 10 years and articles in English language

**Results/discussion:** NF-kappaB-dependent cytokines are messengers involved in the processes of inflammation, angiogenesis and changes in host immunity that have been observed overexpressed in oral cancer patient compared to controls and individuals with LPM.

**Conclusion:** Increased salivary cytokines, may be considered a valuable indicator in the process of malignant transformation, but cytokine expression levels do not seem to be significantly associated with tumour stage.

Keywords: cytokines, oral cancer, saliva, biomarkers.





ÍNDICE GERAL:

ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO E HIPÓTESE.....	2
3. MATERIAIS E MÉTODOS:.....	2
3.1 DESENHO DO ESTUDO .....	2
3.2 BASES DE DADOS E PALAVRAS CHAVE CONSULTADAS .....	2
3.3 QUESTÃO PICO: .....	3
3.4 METODOLOGIA DE PESQUISA:.....	3
3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	4
4. RESULTADOS: .....	5
5. DISCUSSÃO: .....	17
5.1 CARCINOMA ORAL:.....	17
5.2 ETIOLOGIA DO CANCRO ORAL: .....	18
5.3 Fumo de tabaco: .....	19
5.4 CITOCINAS.....	19
5.5 SALIVA.....	20
5.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) E IMUNOENSAIO MULTIPLEX: .....	21
5.7 ESTADIO DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL E NÍVEIS DE CITOCINAS SALIVARES : .....	23
6. CONCLUSÕES .....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	26





Índice de figuras:

Figura 1: representação esquemática da estratégia de pesquisa (fluxograma).....	6
Figura 2: Chundru VNS, Nirmal RM, Srikanth B, Bojji M, Midhun N, Lakshmi BJ. Salivaomics for Oral Cancer Detection: An Insight. J Pharm Bioallied Sci. giugno 2021;13(Suppl 1):S52–6. ....	20





Índice de tabelas:

Tabela 1: metodologia de pesquisa .....	3
Tabela 2: critérios de inclusão e exclusão .....	4
Tabela 3: informações relevantes obtidas dos estudos selecionados ( tabela de resultados). .....	17



**ABREVIATURAS:**

CEO- carcinoma epidermoide oral

CO- cancro oral

CR- consumidores de rapé

DEO- displasia epitelial oral

HPV- vírus do papiloma humano

IL- interleucina

LPM- lesões potencialmente malignas

LPO- líquen plano oral

LVP- leucoplasia verrucosa proliferativa

MON- mucosa oral normal

PC – periodontite crónica

TNF-  $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa

TNM- tumor nódulo metástases

VIH- vírus da imunodeficiência humana



## 1. INTRODUÇÃO:

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é o tipo mais comum de cancro da cabeça e pescoço. A taxa de sobrevivência aos 5 anos permaneceu abaixo de 50% nas últimas duas décadas, pelo que são necessárias novas ferramentas para o seu diagnóstico precoce.<sup>(1)</sup> A taxa de sobrevivência aos cinco anos para o CEO é de cerca de 85% se diagnosticada precocemente. A mortalidade é alta devido à natureza assintomática inicial.<sup>(2)</sup> Assim, o diagnóstico precoce é um importante fator prognóstico para doentes com cancro oral (CO).<sup>(3)</sup> Convencionalmente, o CEO é diagnosticado por exame histopatológico de biópsias de lesões orais que parecem suspeitas ao exame visual direto. Embora a biópsia seja eficaz no diagnóstico, esse método apresenta desvantagens como a invasividade. Assim, são necessários novos métodos auxiliares de triagem.<sup>(4)</sup> O CEO, geralmente é diagnosticado em estadios clínicos avançados devido ao seu caráter assintomático e ausência de sinais patognomónicos na sua fase inicial de desenvolvimento. Por isso o desenvolvimento de abordagens alternativas de diagnóstico é fundamental para melhorar a deteção precoce e as taxas de sucesso terapêutico.<sup>(3)</sup> O uso da saliva como biofluido diagnóstico tem despertado considerável interesse devido à sua proximidade com células cancerígenas, acessibilidade, colheita não invasiva e amostragem económica. O progresso na compreensão do desenvolvimento do CEO a nível molecular tem favorecido a identificação, na saliva total não estimulada, de vários biomarcadores potenciais que relatam atividade proteómica ou metabólica, bem como alterações genómicas e epigenéticas de células malignas, favorecendo assim a deteção precoce e o diagnóstico de um possível estadio patológico.<sup>(5)</sup> Foi comprovado que certas citocinas são produzidas por células do CEO. Entre eles estão as interleucinas (IL) -1, -6, -8 e o fator de necrose tumoral (TNF - $\alpha$ .) que são significativamente superexpressas por esses tumores, sugerindo a sua utilidade como indicadores substitutos de transformação carcinogénica de pré-cancro oral para cancro oral.<sup>(1)(2)</sup> Foi sugerido um papel das citocinas na angiogénese e na progressão do tumor. Além disso, níveis mais elevados de algumas das citocinas acima mencionadas foram detetados no soro de doentes com CEO em comparação com o soro de controlos saudáveis.<sup>(1)</sup>

O objetivo desta revisão sistemática integrativa é de analisar os estudos caso-controlo mais recentes que comparem os níveis de citocinas em doentes com cancro oral (CO), lesões potencialmente malignas (LPM) e grupo controlo, para determinar se estes marcadores têm validade no diagnóstico precoce da neoplasia.

## 2. OBJETIVO E HIPÓTESE

O objetivo desta revisão sistemática integrativa é de analisar os estudos de caso-controlo mais recentes que comparem os níveis de citocinas em doentes com CO, LPM e grupo controlo, para perceber se estes marcadores são úteis no diagnóstico precoce da neoplasia.

Objetivos secundários:

- Possível relação entre níveis aumentados de citocinas em doentes com cancro oral e LPM.
- Perceber se as citocinas são bons marcadores para o diagnóstico precoce do CEO e quais as melhores entre elas.
- Identificar se existe uma correlação entre os níveis de citocinas salivares e o estado do tumor (TNM).

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS:

### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo é uma revisão sistémica integrativa e compreende estudos de revisão sistemática, estudos de caso-controlo, estudos de meta-analise. Os estudos de revisão sistemática e meta-analise só foram utilizados para integrar a discussão e introdução de este trabalho.

### 3.2 BASES DE DADOS E PALAVRAS CHAVE CONSULTADAS

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed (via National Library of Medicine) usando a seguinte combinação de termos de pesquisa/palavras-chaves: "mouth "biomarkers OR "cytokines", AND "saliva" AND "oral cancer" AND "oral squamous cell carcinoma".

Através diferentes combinações das palavras: [cytokines], [oral cancer], [saliva], [biomarkers].

Usámos a estratégia de pesquisa PRISMA 2020 como metodologia para abordar o conhecimento existente sobre o assunto e escrever resultados e discussão deste estudo.

A hipótese nula primária deste estudo foi: "não há diferenças significativas entre o n° de citocinas de indivíduos saudáveis e doentes com cancro oral".

Como ponto de partida desta revisão sistemática integrativa os estudos foram selecionados de acordo com os critérios da estratégia PICO -" Population, Intervention,

Comparison, Outcomes, Study design” com o objetivo de fornecer uma estrutura eficiente para a busca de dados em bases eletrónicas.

Foi utilizado o modelo PICO: Population, Intervention, Comparison, Outcome, Study design.

- População (POPULATION) : (doentes com neoplasia da cavidade oral).
- Intervenção (INTERVENTION): (medir o número de citocinas inflamatórias na saliva).
- Comparação (COMPARATION): (indivíduos sem CEO) e (indivíduos com CEO).
- Resultados (OUTCOMES): (encontrar métodos pouco invasivos para o diagnostico precoce de CEO).
- Desenho do estudo (STUDY DESIGN): estudos de caso-controlo.

### 3.3 QUESTÃO PICO:

Questão de pesquisa PICO: As citocinas salivares podem ser consideradas bons biomarcadores para a detecção precoce do cancro oral?

### 3.4 METODOLOGIA DE PESQUISA:

Tabela 1: metodologia de pesquisa

Nº PROCURA	PALAVRAS-CHAVE	ARTIGOS
1	Cytokines AND saliva AND oral cancer AND biomarkers	90
2	Saliva AND mouth neoplasm OR oral squamous cell carcinoma AND biomarkers AND cytokine	683
3	((("Mouth Neoplasms"[Mesh]) AND "Saliva"[Mesh]) AND "Cytokines"[Mesh])	61
		834 totais

### 3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Tabela 2: critérios de inclusão e exclusão

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO
Estudos de caso-controlo que analisassem os níveis das citocinas salivares.	Artigos que não abordassem os interesses deste estudo.
Artigos escritos na língua inglesa.	Artigos não redigidos em inglês.
Artigos dos últimos 10 anos.	Artigos publicados antes do 2012.
Estudos realizados em humanos.	Estudos realizados em animais.

#### 4. RESULTADOS:

Um total de 526 artigos foram identificados na base de dados PubMed entre o mês de fevereiro do ano 2012 até fevereiro de 2022. Com a aplicação de critérios de elegibilidade do estudo, 40 artigos foram levados em consideração. Após triagem e aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 20 artigos foram incluídos para análise qualitativa. Os estudos de revisões sistemáticas e meta-análise identificados, mas não selecionados, foram usados posteriormente para aprofundar e ampliar o conhecimento sobre o assunto da revisão e para enriquecer a introdução. Todo o procedimento é explicado em uma figura de fluxograma (figura 1). Em 20 estudos selecionados, todos foram caso-controlo realizados em humanos onde foram estudadas várias citocinas. Os dados extraídos dos artigos selecionados foram compilados com a referência aos autores, ano, objetivo do estudo, materiais e métodos, técnica utilizada para avaliação e resultados. Os resultados foram reunidos e organizados na seguinte secção:

Fluxograma de pesquisa bibliográfica:

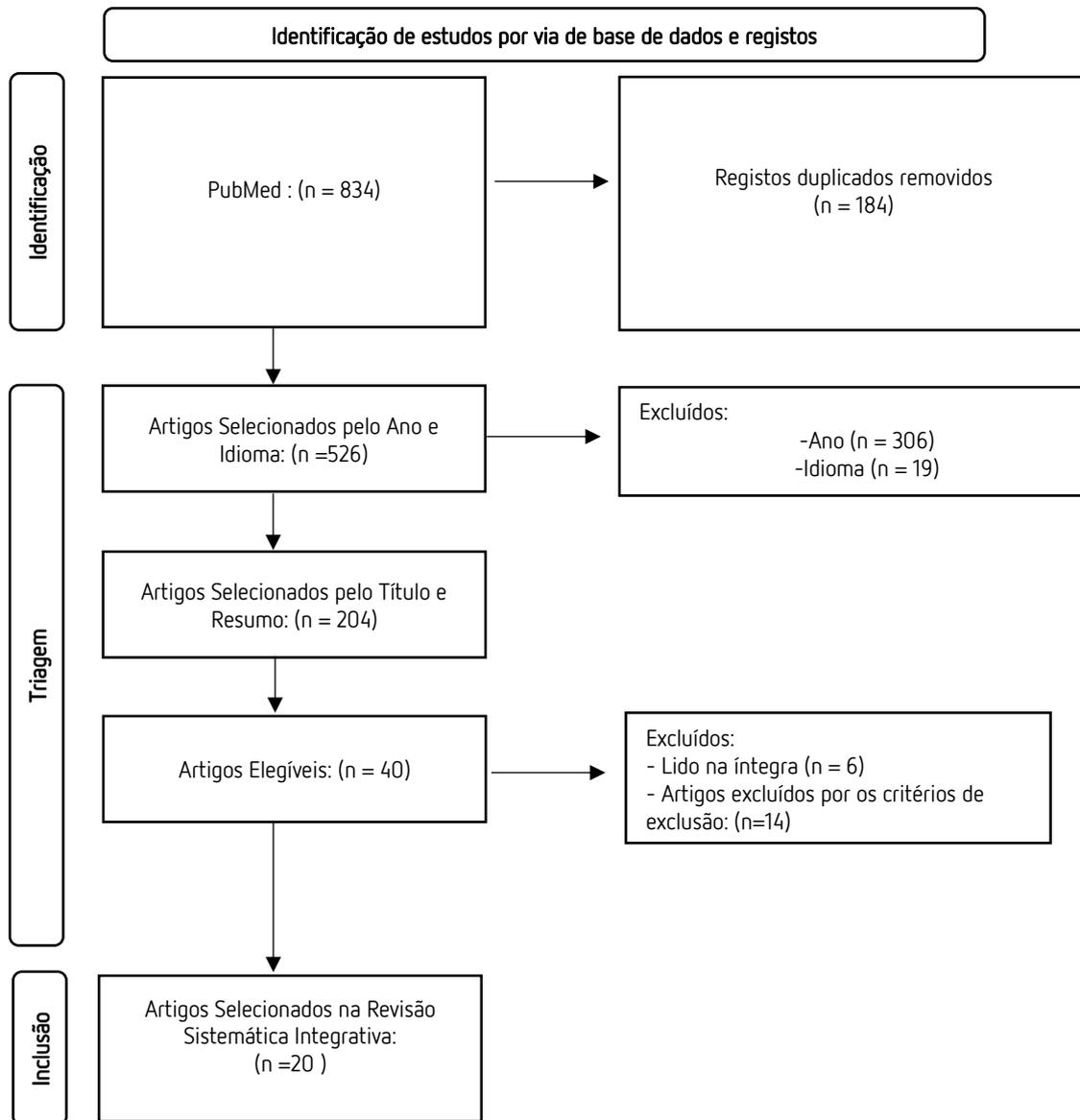


Figura 1: representação esquemática da estratégia de pesquisa (fluxograma)

Autores (ano)	Objetivo estudo	Materiais e métodos	Métodos	Citocinas estudadas	Resultados
David Elashoff et al. (2012)	O objetivo deste estudo é validar se os sete mRNAs e três proteínas previamente relatadas como biomarcadores são capazes de discriminar doentes com carcinoma espinocelular oral (CEO) de indivíduos saudáveis em coortes independentes.	395 indivíduos de cinco coortes independentes.	ELISA	IL-8, SAT, IL-1B, OAZ1, H3F3A, DUSP, S100P.	Aumento da interleucina (IL)-8 e do tecido adiposo subcutâneo (SAT) foi estatisticamente significativo (IL-8, SAT e S100P); Aumento significativo para o coorte 4 e 5 de (IL-8, IL-1B).
Vlaho Brailo, et al. (2012)	O objetivo do estudo foi comparar as concentrações salivares e séricas de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em indivíduos com leucoplasia oral, cancro oral e controles.	Os participantes foram divididos em três grupos.  Grupo I : 29 doentes com leucoplasia oral.  Grupo II : 28 doentes com carcinoma espinocelular.  Grupo III: 31 participantes sem patologia da mucosa oral.	ELISA	IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$ e IL-6 salivares foram significativamente maiores em doentes com cancro oral do que em indivíduos com leucoplasia e grupo controle (p<0,05). Não foram observadas diferenças nas concentrações de TNF- $\alpha$ salivar em nenhum dos grupos.



Sedoso Rajesh Punyani et al. (2013)	Este estudo foi desenhado para estimar os níveis de IL-8 salivar em doentes com pré-cancro-oral e carcinoma espinocelular oral (CEO) e compará-los com controlos saudáveis.	Grupo I: doentes com CEO ( n = 25); Grupo II: doentes com cancro oral. (n = 25) Grupo III: indivíduos saudáveis, inscritos como controlos. (n = 25)	ELISA	IL-8	O presente estudo mostrou que a citocina pró-inflamatória e pró-angiogénica IL-8, foi significativamente elevada na saliva total de indivíduos com CEO em comparação com o grupo de pré-cancro e controlos saudáveis.
M Juretić, et al. (2013)	O objetivo deste estudo foi determinar as concentrações salivares de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) em doentes com LPM e lesões malignas.	O estudo envolveu: 19 doentes com LPM 19 com CEO. 19 voluntários saudáveis de controlo.	ELISA	TNF- $\alpha$ IL-6	As diferenças na concentração salivar de TNF- $\alpha$ entre todos os grupos foram estatisticamente significativas (P < 0,001;). Doentes com CEO apresentaram a maior concentração de TNF- $\alpha$ (0,739 $\pm$ 0,176 pg/mL) e o grupo controle (0,013 $\pm$ 0,033 pg/mL) a menor concentração de TNF- $\alpha$ (P < 0,001). Também houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração salivar de IL-6 entre todos os grupos, sendo a maior no CEO (0,707 $\pm$ 0,234 pg/mL) e a menor no

					grupo controle (0,002 ± 0,002 pg/mL) (P<0,001 ;).
T.Kamatani et al. (2013)	O objetivo deste estudo foi avaliar citocinas em saliva total não estimulada (SNE) de doentes com CEO em comparação com aqueles com pré e pós-operatório para avaliação como marcadores de CEO.	16 doentes com CEO foram incluídos neste estudo.	ELISA	IL-1b	Os resultados deste estudo sugerem que apenas a IL-1 beta está elevada em (SNE) de doentes com CEO, o que pode ser útil para significância diagnóstica e/ou prognóstica.
Marzieh Hamzavi et al. (2013)	O presente estudo foi desenhado para avaliar a relação entre a expressão tecidual, níveis séricos e salivares de IL-10 em carcinomas espinocelular.	30 doentes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e 24 voluntários saudáveis.	ELISA	IL-10	Houve aumento da expressão de IL-10 nos tecidos do CEO, mas não houve relação entre expressão tecidual, níveis séricos e salivares desse marcador. (P>0,05).
Yi-Shing Lisa Cheng, et al. (2014)	O objetivo deste estudo preliminar é investigar se a periodontite crónica (PC) e/ou líquen plano oral (LPO) podem confundir o uso de IL-6 e IL-8	grupo A = 18 doentes com CEO recém diagnosticado antes do início de qualquer tratamento. grupo B = 21 doentes com PC, grau moderado a grave.	ELISA	IL-6 e IL-8	Os níveis salivares de IL-6 foram significativamente maiores em doentes com CEO do que em doentes com PC. (P <0,001), LPO ativo na doença (P =0,001), LPO inativo da doença (P <0,001), e

	salivares para detecção de CEO.	grupo C = 21 doentes com LPO ativo na doença com múltiplas lesões sintomáticas visíveis. grupo D = 20 doentes com LPO sem lesões ou com lesões reticulares assintomáticas grupo E = 21 controles saudáveis.			controles saudáveis (P <0,001). Os níveis salivares de IL-8 foram significativamente maiores em doentes com CEO do que em doentes com PC. (P <0,001), mas apenas significativamente maior do que em controles saudáveis (P =0,014).
Rajkumar Krishnan et al. (2014)	Objetivo deste estudo é avaliar a utilidade de TNF- $\alpha$ como biomarcador para distinguir entre LPM e lesões malignas usando uma grande população.	Amostras de soro e saliva de - 100 indivíduos do grupo de controlo saudável. - 100 indivíduos com LPM. - 100 indivíduos com CEO.	ELISA	TNF- $\alpha$	Foi observado um aumento do nível de TNF- $\alpha$ sérico e salivar em doentes com CEO em comparação com o grupo controlo e com o grupo LPM. Houve aumento significativo do nível de TNF- $\alpha$ na lesão moderada e pouco diferenciada em relação à lesão bem diferenciada e no estágio IV do estadio clínico.
Niranzana Panneer Selvam et al. (2015)	Objetivo do estudo é estimar se a interleucina-6 salivar (IL-6) pode ser utilizada como marcador	A amostra de 75 casos foi dividida em três grupos de 25 indivíduos. Grupo I: leucoplasia oral;	ELISA	IL-6	Quando a concentração de IL-6 salivar entre os três grupos foi comparada, os resultados foram estatisticamente

	molecular para diagnosticar a leucoplasia e o carcinoma espinocelular oral. (CEO)	grupo II: CEO; grupo III: grupo controle.			altamente significativos no grupo com CEO comparado com LO e grupo controle. (P<0,001)
Salman Aziz et al. (2015)	O objetivo deste estudo foi destacar a importância das citocinas imunossupressoras como potenciais biomarcadores no CEO.	30 doentes não tratados com CEO foram categorizados em três grupos: Grau 1: bem diferenciado; Grau 2: moderadamente diferenciado; Grau 3; pouco diferenciado. 33 indivíduos saudáveis foram selecionados como controles.	Imunoensaio multiplex	IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1RA	As concentrações salivares médias de citocinas estudadas em doentes com CEO foram maiores (IL-4 = 1,17 pg/mL, IL-10 = 4,45 pg/mL, IL-13 = 0,76 pg/mL, IL-1RA = 2831,69 pg/mL) do que suas contrapartes saudáveis (IL-4 = 1,01 pg/mL, IL-10 = 1,17 pg/mL, IL-13 = 0,23pg/mL, IL-1RA = 1949,20 pg/mL) A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa No caso de IL-10 e IL-13 (p= .004 ep= .010, respetivamente
Leticia Bagan et al. (2015)	Este estudo teve como objetivo analisar as diferenças nos níveis séricos e salivares de IL-6 entre doentes com leucoplasia verrucosa proliferativa (LPV),	Três grupos de doentes: 20 com LPV 20 com CEO 20 controles saudáveis.	ELISA	IL-6	Houve diferenças significativas (p < 0,01) nos níveis séricos e salivares de IL-6 entre os três grupos e entre os três graus de extensão das áreas verrucosas ( p = 0,01).

	carcinoma espinocelular oral (CEO) e controles saudáveis e examinar a relação entre os níveis salivares de IL-6 e a extensão da área verrucosa.				No grupo CEO, houve diferença significativa nos níveis de IL-6 salivar entre os doentes com e sem metástase linfonodal ao diagnóstico ( $p = 0,02$ ).
Frederico Omar Gleber Netto, et al. (2016)	O objetivo principal desta análise é avaliar o poder discriminatório de sete marcadores transcriptômicos salivares (IL1b, IL8, SAT1, OAZ1, DUSP1, S100P,eH3F3A) e dois marcadores proteômicos (IL8 e IL1b) em distinguir doentes com CEO e LPM de indivíduos saudáveis.	60 doentes com CEO, 60 controles e 60 com LPM	ELISA	IL-8 IL-1b	Entre os marcadores proteômicos, a concentração de IL-8 e IL-1b foi significativamente maior em doentes com CEO do que controles e doentes com displasia.
Thayalan Dineshkumar et al. (2016)	Avaliar a utilidade diagnóstica dos níveis séricos e salivares de IL-6 no diagnóstico diferencial de lesões e condições potencialmente malignas e carcinoma espinocelular oral em uma região de	Amostras de saliva e sangue foram coletadas de 100 participantes em cada grupo (CEO, LPM e controles saudáveis).	ELISA	IL-6	Os resultados do presente estudo sugerem que a citocina pró-inflamatória, IL-6, está elevada na saliva de doentes com CEO em comparação com LPM e controles, e, portanto, pode ter significado diagnóstico e/ou prognóstico.

	alta prevalência de cancro oral. (CO)				Diferenças significativas na concentração de IL-6 foram observadas entre doentes com CEO e LPM, tanto no soro quanto na saliva, com níveis salivares sendo duas a três vezes maiores que os valores séricos em todos os grupos.
LT Lee et al. (2017)	O objetivo deste estudo foi investigar potenciais biomarcadores na saliva e plasma humanos para auxiliar no diagnóstico precoce do CEO.	doentes com CEO (n =41) e controles (n = 24)	Imunoensaio multiplex	IL-1b, IL-6, IL-8, MIP-1b, eotaxina IFN-ge e TNF	Os resultados do estudo indicam que os biomarcadores salivares podem ter um papel útil como adjuvante complementar para a detecção precoce do CEO. No que diz respeito à avaliação da progressão tumoral, a eotaxina plasmática, G-CSF e IL-6 podem ajudar na detecção do CEO avançado.
Deepthi G et al. (2019)	Avaliar a eficácia do fator de necrose tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ) como biomarcador salivar em casos diagnosticados histopatologicamente de leucoplasia oral e carcinoma espinocelular oral.	O grupo de estudo incluiu 90 sujeitos que foram divididos em três grupos. CEO (n=30), LO (n=30) controles (n=30).	ELISA	TNF- $\alpha$	Os resultados do presente estudo demonstraram níveis mais elevados de TNF- $\alpha$ salivar em indivíduos com CEO em comparação com leucoplasia e controles saudáveis com alto nível de significância estatística. Houve um

					aumento dos níveis salivares de TNF- $\alpha$ diretamente proporcional ao grau histológico de diferenciação no CEO.
Karolina Babiuch, et al. (2020)	O objetivo do estudo foi avaliar interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em amostras de tecido e saliva de doentes com CEO e LPM.	As citocinas foram avaliadas em 60 doentes com LPM e em 7 controles com mucosa oral normal, (MON) e na saliva de 45 doentes com CEO ou LPM e 9 controles.	ELISA	IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$	Expressão significativamente maior de IL-8 em espécimes de CEO e TNF- $\alpha$ em CEO e LPM com displasia, em comparação com MON. A expressão de TNF- $\alpha$ foi significativamente maior na leucoplasia oral e líquen plano oral sem displasia, enquanto a expressão de IL-8 apenas na leucoplasia oral sem displasia em comparação com MON. As concentrações salivares de todas as citocinas avaliadas foram significativamente maiores nos doentes com CEO do que nos controles. Os níveis de IL-8 foram significativamente maiores na saliva de doentes com LPM com displasia em comparação com os controles e em doentes

					com CEO em comparação com doentes com lesões displásicas. Também houve aumento significativo nas concentrações salivares de IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ em doentes com CEO em comparação com doentes com LPM sem displasia.
Kinga Zielińska, Et al. (2020)	O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F e TNF- $\alpha$ na saliva em doentes com cancro de boca e orofaringe, dependendo do grau de malignidade e culturas bacteriológicas da cavidade oral como potenciais biomarcadores de cancro.	O estudo incluiu 71 doentes submetidos a testes de triagem com diagnóstico histopatológico de cancro boca e/ou orofaringe. 24 doentes com tumor bem diferenciado (G1), 29 doentes com grau intermediário (G2) e 13 doentes com baixo grau de diferenciação histopatológica (G3). Em 5 doentes, o grau não foi determinado.	ELISA	IL-17A, IL-17E/IL-25 e IL-17F, TNF- $\alpha$	Foram encontrados níveis salivares significativamente maiores de IL-17A ( $p < 0.001$ ), IL-17F ( $p < 0.01$ ), e TNF- $\alpha$ ( $p < 0.01$ ) em indivíduos com doença mais avançada. Não encontramos diferença significativa na concentração salivar de IL-17E/IL-25 entre indivíduos com diferentes estadios da doença. As concentrações salivares de IL-17A, IL-17F e TNF- $\alpha$ foram maiores em doentes em estadio IV e menores em doentes em estadio I ou II.

<p>Prerana Singh et al. (2020)</p>	<p>O objetivo foi validar biomarcadores salivares previamente avaliados na população indiana.</p>	<p>O estudo envolveu: 31 doentes (TNM estágio I-II) 27 doentes (TNM estágio III-IV), 30 doentes com LPM. 29 pós-tratamento. 42 sujeitos de controle.</p>	<p>ELISA</p>	<p>IL-1<math>\beta</math>, IL-8 e LGALS3BP</p>	<p>Dos três marcadores de proteína, IL-1<math>\beta</math> e IL-8 mostraram níveis aumentados em doentes com CEO em comparação com controles, mas foram fortemente discriminatórios, especialmente no caso de estadio III-IV em comparação com os controles, com <math>p &lt; 0,05</math>. LGALS3BP mostrou níveis aumentados nos casos de CEO em estágio inicial e LPM de alto risco (<math>p &lt; 0,05</math>), bem como níveis relativamente reduzidos em CEO em estadio tardio e doentes em quimioterapia ou casos pós-operatórios com recorrência.</p>
<p>Waqar Muhammad et al. (2021)</p>	<p>O objetivo do estudo foi determinar os níveis de TNF-<math>\alpha</math> e dos micronúcleos celulares na saliva total não estimulada em consumidores de rapé (CR) em comparação com</p>	<p>Foi recrutado um total de 60 pacientes, que foram divididos em consumidores de rapé e controles.</p>	<p>ELISA</p>	<p>TNF-<math>\alpha</math></p>	<p>Os níveis de TNF-<math>\alpha</math> em CR foram significativamente maiores do que os controles (<math>p &lt; 0,05</math>). Também os números de micronúcleos celulares foram comparativamente maiores nos CR do que</p>

	indivíduos controles saudáveis.				nos controles. ( $p < 0,05$ )
Valentina Dikova et al. (2021)	Este estudo teve como objetivo investigar o papel de um painel de citocinas salivares como biomarcadores para detecção precoce de carcinoma espinocelular oral (CEO), comparando seus níveis entre indivíduos saudáveis, pacientes com leucoplasia oral (LO) e lesões malignas.	Sujeitos com CEO no estadio inicial (n = 33) doença avançada (n = 33), LO com verrugas homogéneas (n = 33) e proliferativas (n = 33) controlos saudáveis (n = 25).	imunoens aio multiplex	IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, TNF- $\alpha$ , HCC-1 e PF-4	Os níveis médios de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , HCC-1, MCP-1 e PF-4 diferiram significativamente entre CEO, LO e saliva de controle ( $p < 0,05$ ). Encontramos IL-6 e TNF- $\alpha$ notavelmente mais elevados em estadios avançados em comparação com os estágios iniciais de CEO.

Tabela 3: informações relevantes obtidas dos estudos selecionados (tabela de resultados).

## 5. DISCUSSÃO:

### 5.1 CARCINOMA ORAL:

O cancro oral (CO) é um tumor maligno da cavidade oral, sendo o sexto cancro mais comum no mundo. O exame visual e táctil convencional continua a ser a forma mais comum de deteta-lo. <sup>(4)</sup> O carcinoma espinocelular oral (CEO) é a neoplasia maligna mais prevalente da cavidade oral, responsável por mais de 90% de todos os cancros de cabeça e pescoço (CCP). <sup>(6)</sup> O cancro oral é frequentemente antecedido por uma fase clínica pré-maligna acessível à inspeção visual e, portanto, há oportunidades para deteção precoce e redução da morbidade e mortalidade. Geralmente é detetado em estadios tardios devido a sua característica

assintomática resultando num mau prognóstico, por esta razão o diagnóstico precoce da doença é de importância fundamental. <sup>(7)(8)</sup> De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o carcinoma da cavidade oral é mais frequente nos homens que nas mulheres sendo duas vezes maiores do que para as mulheres. Do mesmo modo que em vários outros carcinomas, o risco de cancro intraoral aumenta com o aumento da idade. <sup>(7)</sup> A carcinogénese envolve múltiplas alterações genómicas, a soma de estas alterações que ocorrem na mucosa oral são de relevância diagnóstica e prognóstica e são definidas alterações pré-cancerosas. O papel da inflamação na carcinogénese foi sugerido pela primeira vez por Rudolf Virchow há mais de 150 anos. Vários estudos confirmaram que a inflamação crónica pode influenciar a homeostase celular e vários processos metabólicos, induzindo alterações em nível genómico, que podem promover carcinogénese. As citocinas dependentes de NF-kappaB são mensageiros envolvidos nos processos de inflamação, angiogénese e alterações na imunidade do hospedeiro que tem sido observadas como características patológicas em pacientes com CO. A relação entre cancro oral/pré cancro e inflamação crónica parece ser relacionada com a inflamação crónica e o desequilíbrio nos níveis de citocinas imunomoduladores locais e sistémicas que podem promover o crescimento e proliferação tumoral. <sup>(9)</sup>

## 5.2 ETIOLOGIA DO CANCRO ORAL:

A causa do carcinoma de células escamosas oral é multifatorial. Os principais fatores de risco são: tabagismo, mastigação de betel, consumo excessivo de álcool, exposição à radiação ultravioleta e ionizante, infeção pelo papilomavírus humano (HPV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV). <sup>(6)</sup>

Muhammad et al. <sup>(10)</sup> investigaram a diferença nas concentrações de TNF- $\alpha$  e micronúcleos celulares na saliva total não estimulada em consumidores de rapé (CR) em comparação com os indivíduos controles saudáveis, não consumidores. De acordo com estes resultados, os níveis de TNF- $\alpha$  e os números de micronúcleos celulares em (CR) foram significativamente maiores do que os controles ( $p < 0,05$ ). Vários carcinomas de células escamosas orais têm sido documentados em associação ou têm sido precedidos por uma lesão pré-cancerosa, especialmente a leucoplasia oral (LO). As características mais proeminentes em quase todos os cancros, incluindo o CEO, são o crescimento descontrolado

e a inflamação. Como mediadores da inflamação, as citocinas têm sido fortemente implicadas na patogénese do tumor. <sup>(11)</sup>

### 5.3 Fumo de tabaco:

O consumo de tabaco continua a prevalecer como o risco de cancro mais importante. Todos os cancros orais mostraram uma forte associação com o consumo de álcool e o tabagismo: acredita-se que o tabaco seja implicado em mais de 80% dos casos de cancro oral. A exposição crónica das superfícies epiteliais a estas substâncias pode causar hiperplasia, displasia e carcinoma, ou seja, o desenvolvimento de lesões potencialmente malignas que podem então sofrer alterações malignas. <sup>(12)</sup> Foi demonstrado que o consumo de álcool atua sinergicamente com o tabaco no aumento do risco de desenvolvimento de CO. Entre as LPM a leucoplasia oral (LO) parece ter o maior risco de transformação maligna, chegando a 17 %. Esta última apresenta diferentes subtipos, dos quais a leucoplasia verrucosa proliferativa não homogénea que apresenta maior tendência à conversão cancerosa do que a forma clínica homogénea. A análise imunológica de espécimes de LO revelou a presença de diferentes células inflamatórias no tecido conjuntivo, sugerindo inflamação crónica, estando intimamente ligada a aspetos disfuncionais do sistema imunológico. <sup>(6)</sup>

### 5.4 CITOCINAS

As citocinas são reguladores críticos do microambiente tumoral e inflamação crónica pró-tumorigénica que medeiam o crescimento normal, proliferação celular, reparo tecidual e angiogénese sendo envolvidas na resposta imune contra infeção e inflamação. <sup>(9) (13)</sup> São polipeptídeos solúveis, de baixo peso molecular e multifuncionais, produzidos principalmente por células do sistema imune inato e adaptativo, mas também por tecidos residentes e células tumorais. Influenciam muitos aspetos do comportamento celular como: crescimento, diferenciação e função. A função das citocinas inclui: inflamação, apoptose, resistência do hospedeiro, respostas hematopoiéticas e imunológicas. Apresentando atividade fisiológica desregulada durante a inflamação e carcinogénese. <sup>(9)</sup>

Sendo mensageiros moleculares recrutam outras células inflamatórias no microambiente tumoral para aumentar a proliferação e sobrevivência das células tumorais geneticamente alteradas. <sup>(14)</sup>

As citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , por um lado são responsáveis pelo crescimento e proliferação de células imunes e tumorais, enquanto por outro lado, aumentam programas de vigilância imunológica, sendo elevadas na saliva do cancro e pré-cancro oral em comparação com controles sugerindo assim a sua utilidade como indicadores de transformação maligna. Em contraste, fatores anti-inflamatórios como o antagonista do recetor de IL-1 (IL-1ra) IL-4, IL-10, IL-13, neutralizam o potencial proliferativo das citocinas pró-inflamatórias e regulam negativamente o efeito anti-inflamatório. <sup>(6) (11)</sup>

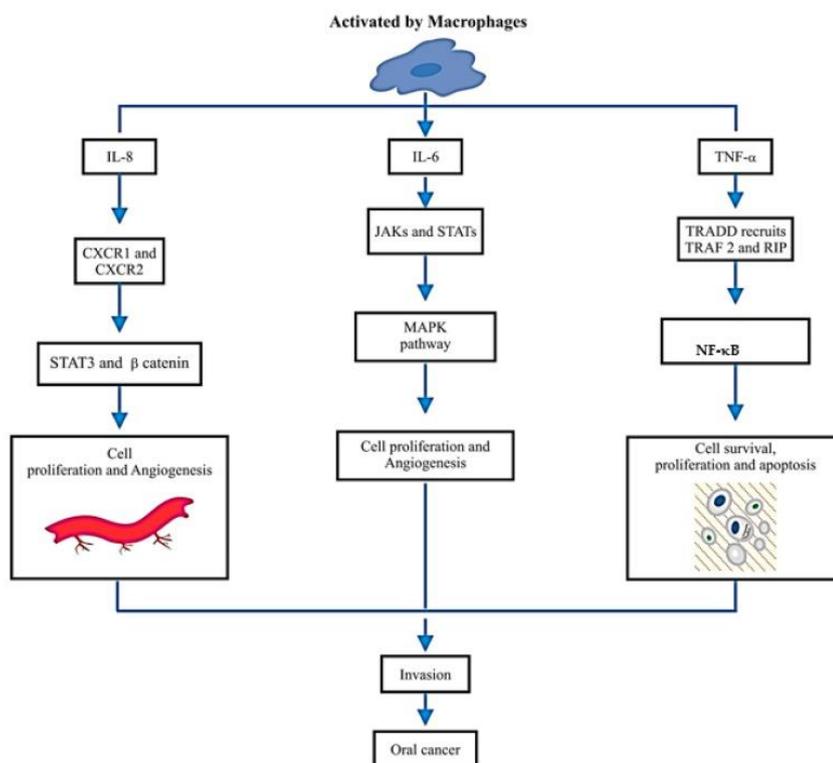


Figura 2: Chundru VNS, Nirmal RM, Srikanth B, Bojji M, Midhun N, Lakshmi BJ. Salivaomics for Oral Cancer Detection: An Insight. J Pharm Bioallied Sci. giugno 2021;13(Suppl 1):S52–6.

## 5.5SALIVA

A saliva pode ser considerada um fluido diagnóstico promissor e importante porque contém proteínas que podem discriminar o processo da doença. Citocinas pró-inflamatórias e pró-angiogénicas podem ser detetadas na saliva de indivíduos com lesões pré-neoplásicas orais e também estão elevadas quando comparadas com o grupo controlo. Concentrações

aumentadas de citocinas salivares em doentes com CEO em comparação com controlos saudáveis também foram relatadas. Os papéis das citocinas têm sido mencionados no processo de transformação maligna. <sup>(8)</sup>

A saliva apresenta diferentes vantagens sobre o soro e o tecido como: processo de colheita simple, não invasivo e facilmente adaptável para usos laboratoriais, podendo ser assim usados como ferramenta para rastrear grandes populações. <sup>(15)</sup>

Na literatura, diferentes artigos analisaram a presença de citocinas nas LPM e CO. Para reduzir o risco de variáveis que poderiam interferir no estudo, os indivíduos com doenças inflamatórias agudas ou crónicas na cavidade oral e doenças sistémicas foram excluídos, uma vez que poderiam ter influenciado a quantidade de citocinas presentes. No entanto, Cheng et al. <sup>(15)</sup> no seu estudo analisaram as diferenças entre as concentrações de citocinas salivares em doentes com periodontite crónica (PC), líquen plano oral (LPO) e carcinoma espinocelular oral (CEO) para excluir a hipótese de que PC e a LPO poderiam confundir o uso de IL-6 e IL-8 salivares no diagnóstico de CEO. O resultado obtido sugere que CP ou LPO não interferem na potencial aplicação de IL-6 salivar como biomarcador de CEO. Este resultado concorda com o estudo de Lee et al. <sup>(13)</sup> onde os investigadores descobriram que a contribuição da CEO para a elevação das citocinas supera qualquer potencial condição inflamatória no hospedeiro, e não afeta significativamente os níveis salivares das citocinas.

No entanto, o LPO, independentemente da atividade da doença, parece afetar os níveis salivares de IL-8 o suficiente para interferir no seu uso como biomarcador salivar para detecção de CEO. <sup>(13)</sup>

#### 5.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) E IMUNOENSAIO MULTIPLEX:

A análise bioquímica de citocinas foi feita através um ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoensaio multiplex, as quantidades de citocinas foram determinadas em (pg/ml). O ensaio imunoenzimático, acabou sendo o método de escolha para a quantificação de citocinas, e foi utilizado na maioria dos estudos. <sup>(5)</sup> O método permite a detecção precisa do anticorpo, mas as principais limitações são o protocolo prolongado e o custo relativamente elevado ao analisar um pequeno número de componentes, com conseqüente gasto de amostra. <sup>(13)</sup> Em três estudos que investigaram a variação na concentração de várias citocinas, foi preferido o imunoensaio multiplex baseado em grânulos. <sup>(6) (11) (13)</sup> A principal

vantagem é a sua faixa dinâmica mais ampla de concentração de citocinas mensurável em comparação com o teste ELISA, que permite obter uma grande quantidade de dados a partir de uma pequena amostra, fornecendo uma consistência ideal, pois todas as amostras e citocinas são testadas nas mesmas condições.<sup>(11)</sup>

As citocinas mais estudadas foram : IL-6<sup>(6) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (19) (20)</sup>, TNF- $\alpha$ ,<sup>(6) (9) (10) (12) (13) (14) (17) (24)</sup> IL-8,<sup>(6) (7) (9) (13) (16) (21) (22) (23)</sup> e IL-1b.<sup>(8) (13) (17) (21) (22) (23)</sup> Elashoff et al.<sup>(21)</sup> relataram que a expressão de todos os sete mRNA e três marcadores de proteína salivares (IL-8 IL-1B e M2BP) foi aumentada em CEO em comparação com os controles, de acordo com outros estudos.<sup>(13) (17) (22) (23)</sup> No estudo de Brailo et al.<sup>(17)</sup> os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 salivares foram significativamente maiores em doentes com cancro oral do que em doentes com leucoplasia oral e grupo controle ( $p < 0,05$ ). Resultados semelhantes também foram observados em outros estudos<sup>(12) (13)(15) (16) (18) (20) (22)</sup>, contudo, não foram observadas diferenças nas concentrações de TNF- $\alpha$  salivar entre nenhum dos grupos. Inversamente, Juretic et al.<sup>(12)</sup> observaram que os valores médios de TNF- $\alpha$  eram mais elevados no CEO ( $0,739 \pm 0,176$ ) do que LPM ( $0,601 \pm 0,178$ ) e controlos ( $0,013 \pm 0,033$ ). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por outros estudos.<sup>(10) (13) (14) (16) (24) (25)</sup>

No presente estudo, a totalidade de artigos que analisaram as concentrações de IL-8, observaram um aumento significativo nos indivíduos com CEO comparados com os controles.<sup>(13) (16) (21) (22) (23)</sup> Punyani et al:<sup>(7)</sup> de acordo com os resultados obtidos sugeriram que a IL-8 salivar pode ser utilizada como um potencial biomarcador para CEO, mas não provou ser um biomarcador útil para a identificação de LPM, inversamente ao resultado obtido por Netto et al.<sup>(22)</sup> Os níveis de citocinas podem ser alterados devido a outras condições orais, por esta razão Cheng et al.<sup>(16)</sup> compararam os níveis de IL-6 em doentes com cancro oral, LPO e PC, de acordo com os seus resultados, os níveis salivares de IL-6 foram significativamente maiores em doentes com CEO do que PC, LPO e controles saudáveis. Os níveis de IL-8 também foram significativamente maiores em doentes com CEO do que em doentes com PC, mas apenas marginalmente significativamente maiores do que em controles saudáveis. No estudo do Selvam et al.<sup>(15)</sup> a concentração de IL-6 salivar foi maior em doentes com CEO do que em doentes com LO e controles saudáveis. Porém mostrou que não há diferença significativa na concentração de IL-6 salivar entre diferentes graus

histológicos de CEO, sugerindo que não há relação entre a agressividade do tumor e o nível de IL-6 salivar.

Segundo Salman Aziz, <sup>(11)</sup> as concentrações salivares médias de citocinas (IL-4,-IL-10,IL-13) estudadas em doentes com CEO foram maiores do que suas contrapartes saudáveis. A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa no caso de IL-10- e IL-13. Este resultado discorda do resultado obtido por Hamzavi et al. <sup>(26)</sup> onde embora os níveis salivares de IL-10 foram maiores em CEO do que em controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa, podendo ser devido pelo facto que foram examinados só doentes em estadio I e II. No estudo de Netto et al. <sup>(22)</sup> os marcadores proteómicos tiveram melhor desempenho do que os marcadores transcriptómicos na distinção entre CO, LPM e controles. De acordo com Singh et al. <sup>(23)</sup> entre os marcadores proteómicos, a concentração proteica de IL-8 e IL-1b foi significativamente maior em doentes com CEO do que controles e doentes com displasia. Para CEO em estadio avançado, IL-1b e IL-8 tiveram poder preditivo ainda maior. No entanto, tem como principal limite o facto de não ter verificada a condição periodontal. Lee et al. <sup>(13)</sup> relataram níveis salivares significativamente mais elevados de IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  em CEO em comparação com controles e constataram que a saliva foi mais eficaz que o plasma no diagnóstico precoce. De acordo com os resultados obtidos por Babiuch et al. <sup>(9)</sup> as concentrações de IL-1a, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  foram mais elevadas na saliva de pacientes com CEO em comparação com voluntários saudáveis e os níveis de IL-8 foram significativamente maiores na saliva de doentes com displasia epitelial oral (DEO) em comparação com os controles. ( $p=0,0492$ ) e em doentes com CEO em comparação com DEO ( $p=0,0345$ ). A coloração imuno-histoquímica revelou diferenças na distribuição de citocinas in CEO- LPM- MON, entre estes IL-1 $\alpha$  estava presente mais frequentemente em todas as camadas do epitélio do CEO do que em LPM e estava ausente em MON. Os níveis de IL-8 foram comparados de acordo com o estágio TNM e graduação histopatológica, entretanto a diferença entre estadio foi estatisticamente não significativa.

## 5.7 ESTADIO DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL E NÍVEIS DE CITOCINAS SALIVARES :

Na maioria dos estudos os indivíduos com cancro oral foram agrupados de acordo com o sistema de estadiamento TNM que avalia o status do tamanho do tumor, a extensão do envolvimento, presença de metástase regional ou envolvimento ganglionar e metástase à distância. De acordo com estes parâmetros os pacientes com CEO foram amplamente

categorizados em estadios precoce ( I e II) e tardio (III e IV) <sup>(23)</sup> com base nos resultados obtidos os níveis de expressão dos marcadores não foram significativamente associados ao estadio do tumor. <sup>(21)</sup> No seu estudo Punyani et al. <sup>(7)</sup> relataram que embora os níveis de IL-8 fossem mais elevados em indivíduos em estadio IV, a diferença entre estadios foi estatisticamente não significativa, de acordo com outros estudos.<sup>(9)</sup> <sup>(21)</sup> Lee et al. encontraram níveis de IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  significativamente mais elevados no início do CEO (estágios I+II) em comparação com indivíduos controle, mas sem distinção entre doença precoce e avançada (estágios III+IV). <sup>(13)</sup> Da mesma forma, Dineshkumar et al. afirmaram que não houve diferença significativa na concentração de IL-6 salivar com base no estadiamento clínico do CEO. <sup>(18)</sup> Krishnan et al revelaram importante superexpressão de TNF- $\alpha$  na saliva de pacientes com CEO no estadio IV em comparação com os estadios clínicos I, II e III, <sup>(25)</sup> de acordo com Dikova et al. que encontraram níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  consideravelmente mais elevados em estadios avançados comparado com os estadios iniciais.<sup>(6)</sup> Zielinska et al. descobriram que o aumento da concentração salivar de IL-17A, IL-17F e TNF- $\alpha$  está associada a um estadio avançado de CEO, sendo a IL-17A significativamente correlacionada com o estadio da doença, com o tamanho do tumor primário e com envolvimento de gânglios linfáticos. Não foram encontradas diferenças significativas na concentração salivar de IL-17E e IL-25 entre doentes com diferentes estadios de doença. <sup>(24)</sup>

No estudo de Selvam et al. <sup>(15)</sup> : foi comparada a concentração de IL-6 em doentes em estadio I, II,III e IV, os resultados foram significativos apenas entre estadio II e IV.

## 6. CONCLUSÕES:

O presente estudo analisou diferentes tipos de citocinas, entre estas as mais estudadas e mais relevantes foram as IL-6, IL-8 e TNF alfa. De acordo com os resultados obtidos, os vários estudos confirmaram a super-expressão das citocinas pro- inflamatórias dependentes de NF-kappaB em pacientes com LPM e CEO em comparação com controles, podendo ser relacionadas com um aumento no tecido patológico e podendo ser consideradas bons indicadores no processo de transformação maligna. Muitos estudos questionaram a possibilidade de interferência de doenças inflamatórias agudas orais nos níveis de citocinas, dois estudos excluíram esta hipótese, no entanto, são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese. O aumento das citocinas salivares, pode ser considerado um indicador valioso no processo de transformação maligna, mas os níveis de expressão das citocinas parecem não estar significativamente associados ao estadio do tumor; entretanto mais estudos com uma amostra maior devem ser feitos para confirmar a utilidade diagnóstica e prognóstica das citocinas salivares.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Osman TA, Costea DE, Johannessen AC. The use of salivary cytokines as a screening tool for oral squamous cell carcinoma : A review of the literature. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(2):256–61.
2. Chundru VNS, Nirmal RM, Srikanth B, Bojji M, Midhun N, Lakshmi BJ. Salivaomics for Oral Cancer Detection: An Insight. *J Pharm Bioallied Sci.* giugno 2021;13(Suppl 1):S52–6.
3. Chiamulera MMA, Zancan CB, Remor AP, Cordeiro MF, Gleber-Netto FO, Baptistella AR. Salivary cytokines as biomarkers of oral cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 27 febbraio 2021;21(1):205
4. Ishikawa S, Sugimoto M, Kitabatake K, Sugano A, Nakamura M, Kaneko M, et al. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Sci Rep.* 19 agosto 2016;6:31520.
5. Ferrari E, Pezzi ME, Cassi D, Pertinhez TA, Spisni A, Meleti M. Salivary Cytokines as Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences.* gennaio 2021;22(13):6795.
6. Dikova V, Jantus-Lewintre E, Bagan J. Potential Non-Invasive Biomarkers for Early Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Med.* 13 aprile 2021;10(8):1658.
7. Punyani SR, Sathawane RS. Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig.* marzo 2013;17(2):517–24.
8. Kamatani T, Shiogama S, Yoshihama Y, Kondo S, Shirota T, Shintani S. Interleukin-1 beta in unstimulated whole saliva is a potential biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Cytokine.* novembre 2013;64(2):497–502.
9. Babiuch K, Kuśnierz-Cabala B, Kęsek B, Okoń K, Darczuk D, Chomyszyn-Gajewska M. Evaluation of Proinflammatory, NF-kappaB Dependent Cytokines: IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  in Tissue Specimens and Saliva of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders. *J Clin Med.* 21 marzo 2020;9(3):867.
10. Muhammad W, Khan MM, Zafar S, Alqutub MN, AIMubarak AM, Mokeem S, et al. Assessment of Unstimulated Whole Salivary Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) and Cellular Micronuclei Levels in Snuff (Naswar) Users and Non-Users for Early

- Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Environ Res Public Health*. 6 luglio 2021;18(14):7230.
11. Aziz S, Ahmed SS, Ali A, Khan FA, Zulfiqar G, Iqbal J, et al. Salivary Immunosuppressive Cytokines IL-10 and IL-13 Are Significantly Elevated in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Cancer Invest*. 2015;33(7):318 – 28.
  12. Juretić M, Cerović R, Belušić-Gobić M, Brekalo Pršo I, Kqiku L, Špalj S, et al. Salivary levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in patients with oral premalignant and malignant lesions. *Folia Biol (Praha)*. 2013;59(2):99 – 102.
  13. Lee LT, Wong YK, Hsiao HY, Wang YW, Chan MY, Chang KW. Evaluation of saliva and plasma cytokine biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. giugno 2018;47(6):699 – 707.
  14. G D, Nandan SRK, Kulkarni PG. Salivary Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  as a Biomarker in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 1 luglio 2019;20(7):2087 – 93.
  15. Panneer Selvam N, Sadaksharam J. Salivary interleukin-6 in the detection of oral cancer and precancer. *Asia Pac J Clin Oncol*. settembre 2015;11(3):236 – 41.
  16. Lisa Cheng YS, Jordan L, Gorugantula LM, Schneiderman E, Chen HS, Rees T. Salivary interleukin-6 and -8 in patients with oral cancer and patients with chronic oral inflammatory diseases. *J Periodontol*. luglio 2014;85(7):956 – 65.
  17. Brailo V, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Biocina-Lukenda D, Zilic-Alajbeg I, Milenovic A, 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*. 1 gennaio 2012;17(1):e10-15.
  18. Dineshkumar T, Ashwini BK, Rameshkumar A, Rajashree P, Ramya R, Rajkumar K. Salivary and Serum Interleukin-6 Levels in Oral Premalignant Disorders and Squamous Cell Carcinoma: Diagnostic Value and Clinicopathologic Correlations. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(11):4899 – 906.
  19. Babiuch K, Kuśnierz-Cabala B, Kęsek B, Okoń K, Darczuk D, Chomyszyn-Gajewska M. Evaluation of Proinflammatory, NF-kappaB Dependent Cytokines: IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  in Tissue Specimens and Saliva of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders. *J Clin Med*. 21 marzo 2020;9(3):867.

20. Bagan L, Sáez GT, Tormos MC, Labaig-Rueda C, Murillo-Cortes J, Bagan JV. Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. *Clin Oral Investig.* maggio 2016;20(4):737–43.
21. Elashoff D, Zhou H, Reiss J, Wang J, Xiao H, Henson B, et al. Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* aprile 2012;21(4):664–72.
22. Gleber-Netto FO, Yakob M, Li F, Feng Z, Dai J, Kao HK, et al. Salivary Biomarkers for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma in a Taiwanese Population. *Clin Cancer Res.* 1 luglio 2016;22(13):3340–7.
23. Singh P, Verma JK, Singh JK. Validation of Salivary Markers, IL-1 $\beta$ , IL-8 and Lgals3bp for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma in an Indian Population. *Sci Rep.* 30 aprile 2020;10:7365.
24. Zielińska K, Karczmarek-Borowska B, Kwaśniak K, Czarnik-Kwaśniak J, Ludwin A, Lewandowski B, et al. Salivary IL-17A, IL-17F, and TNF- $\alpha$  Are Associated with Disease Advancement in Patients with Oral and Oropharyngeal Cancer. *J Immunol Res.* 2020;2020:3928504.
25. Krishnan R, Thayalan DK, Padmanaban R, Ramadas R, Annasamy RK, Anandan N. Association of serum and salivary tumor necrosis factor- $\alpha$  with histological grading in oral cancer and its role in differentiating premalignant and malignant oral disease. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(17):7141–8.
26. Hamzavi M, Tadbir AA, Rezvani G, Ashraf MJ, Fattahi MJ, Khademi B, et al. Tissue expression, serum and salivary levels of IL-10 in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(3):1681–5.