



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Rodrigo Dutra Norberto de Oliveira

**Perfil imunológico salivar e sobrevida de pacientes de câncer de cabeça e
pescoço submetidos à radioterapia: uma análise longitudinal retrospectiva**

Rio de Janeiro

2023

Rodrigo Dutra Norberto de Oliveira

**Perfil imunológico salivar e sobrevida de pacientes de câncer de cabeça e pescoço
submetidos à radioterapia: uma análise longitudinal retrospectiva**

Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade
do Estado do Rio de Janeiro. Área de
concentração: Periodontia.

Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Dra. Raquel Richelieu Lima de Andrade Pontes

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CB/B

O48 Oliveira, Rodrigo Dutra Norberto de
 Perfil imunológico salivar e sobrevida de pacientes de câncer de
 cabeça e pescoço submetidos à radioterapia : uma análise longitudinal
 retrospectiva / Rodrigo Dutra Norberto de Oliveira. – 2023.
 81 f.

 Orientadores: Ricardo Guimarães Fischer
 Raquel Richelieu Lima de Andrade Pontes

 Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
 Faculdade de Odontologia.

 1. Perfil de saúde - Teses. 2. Neoplasias de cabeça e pescoço. 3.
 Vigilância imunológica. 4. Biomarcadores - Teses. 5. Sobrevida - Teses. I.
 Fischer, Ricardo Guimarães. II. Pontes, Raquel Richelieu Lima de Andrade.
 III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Enfermagem.
 IV. Título.

CDU 616.314

Bibliotecário: Felipe Vieira Queiroz Xavier CRB: RJ - 230047/S

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta Dissertação, desde que citada a fonte

Assinatura

Data

Rodrigo Dutra Norberto de Oliveira

**Perfil imunológico salivar e sobrevida de pacientes de câncer de cabeça e pescoço
submetidos à radioterapia: uma análise longitudinal retrospectiva**

Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade
do Estado do Rio de Janeiro. Área de
concentração: Periodontia.

Aprovada em 09 de fevereiro de 2023.

Orientadores:

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Faculdade de Odontologia - UERJ

Dra. Raquel Richelieu Lima de Andrade Pontes

Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Fernanda de Brito Silva

Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Geraldo de Oliveira Silva

Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Fernando Luiz Dias

Instituto Nacional de Câncer

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

À todas as pessoas que foram e são parte da minha vida.
Hoje sou um mosaico de tudo o que aprendi com cada um.

AGRADECIMENTOS

A meu pai, exemplo de benevolência e otimismo, que educou seus filhos para serem questionadores do mundo. Nosso vínculo transcende vidas.

À minha mãe, personificação do instinto materno. Disposta a se sacrificar por qualquer um, a qualquer hora. Obrigado por cuidar de todos desde sempre.

Às minhas irmãs, Ariela e Andriela, pelo suporte emocional, pela lealdade e pelo companheirismo.

À minha co-orientadora Raquel, dentista que exala humanização. Obrigado pela confiança e por todo conhecimento que aprendi com você.

À Professora Fernanda, exemplo literal do ser professor. Pacientemente ensina e eternamente inspira. Obrigado por ter a senhora como mestre.

Ao Professor Fischer, um ídolo científico. Agradeço a serenidade sempre que precisei de orientação. Obrigado pela oportunidade de tê-lo como orientador.

À Bárbara Coelho, por sempre estar disposta a ajudar, e por todo o suporte técnico em todas as vezes que precisei.

A todos os professores com quem aprendi nesses três anos, especialmente ao professor Carlinhos, mestre que cuida dos pacientes.

À toda equipe de manutenção da faculdade, que mesmo durante os períodos de isolamento social mantiveram a instituição funcionando e forneceram toda a ajuda necessária.

Aos pacientes oncológicos que pude atender nesses três anos. Verdadeiros exemplos de resistência, resiliência e superação.

Perguntas que você não pode responder são geralmente muito melhores para você do que respostas que você não pode questionar.

Yuval Harari

RESUMO

DE OLIVEIRA, Rodrigo Dutra Norberto. *Perfil imunológico salivar e sobrevida de pacientes de câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia: uma análise longitudinal retrospectiva*. 2023. 81 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

As respostas imunoinflamatórias por meio de efetores celulares e seus produtos podem eliminar células neoplásicas recém-formadas através do reconhecimento de antígenos associados ao tumor. A radioterapia (RdT) é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada para o manejo do câncer de cabeça e pescoço (CCP), e que além de provocar a morte celular direta, pode elicitar proteínas e moléculas compartimentalizadas com propriedades antigênicas e capazes de regular respostas imunes que podem contribuir para a erradicação neoplásica. Diante disso, o presente estudo objetivou analisar as concentrações de biomarcadores inflamatórios em amostras de saliva de pacientes com CCP e submetidos à RdT relacionando com a desfecho clínico pós-tratamento. Para isso, amostras de saliva de 48 pacientes diagnosticados com CCP foram coletadas em três períodos de acordo com a RdT e analisadas para quantificação de biomarcadores inflamatórios. Após um período médio de dois anos, o estado de saúde de todos os pacientes foi atualizado, levando a formação de dois grupos com 24 indivíduos cada: vivos e falecidos. A partir disso, foram realizadas análises estatísticas para avaliar as diferenças intra e intergrupo dos níveis de biomarcadores das amostras coletadas. Os resultados indicaram que somente para os pacientes vivos ocorreu uma variação estatisticamente significativa para os analitos IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IFN α 2 e TNF- α , com a formação de uma curva de ascendência entre o início da RdT (T0) e o 25º dia (T3), e uma curva de descendência entre o T3 e o 35º dia após a última sessão de RdT (T5). Além disso, o TNF- α e a IL-4 exibiram concentrações estatisticamente menores entre os grupos no T5. Assim, considerando as funções que cada biomarcador pode exercer nas respostas imunoinflamatórias, as variações significantes observadas fornecem indícios de uma imunorreatividade associada à RdT e relacionada a melhores desfechos pós-tratamento. Estudos futuros precisarão validar as observações aqui descritas.

Palavras-chave: radioterapia; câncer de cabeça e pescoço; vigilância imunológica; biomarcadores inflamatórios; sobrevida.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Rodrigo Dutra Norberto. *Salivary immune profile and survival of head and neck cancer patients submitted to radiotherapy: a retrospective longitudinal analysis*. 2023. 81 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Immunoinflammatory responses via cellular effectors and their products can target and eliminate newly formed neoplastic cells by recognizing tumor-associated antigens. Radiotherapy (RdT) is a widely used therapeutic modality for managing Head and Neck Cancer (HNC). In addition to causing direct cell death, it can release compartmentalized proteins and molecules with antigenic properties and capable of coordinate immune responses, potentially aiding in the eradication of neoplastic cells. This study intended to analyze the concentrations of inflammatory biomarkers from HNC patients submitted to RdT and correlating it to the post-treatment survival. For this, saliva samples from forty-eight patients with HNC were collected at three periods according to the RdT aiming inflammatory biomarkers quantification. After an average follow-up of two years, the health status of all forty-eight patients was updated, leading to the formation of two groups with twenty-four subjects each: survivors and deceased. Statistical analysis was performed to compare biomarker levels within and between the groups. The results indicated a statistically significant variation only for the survivor's group and specially for IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IFN α 2 and TNF- α during the treatment. An ascending curve was observed from the beginning of the RdT (T0) to the 25th day of treatment (T3), followed by a descending curve from T3 to the 35th day after the last session of RdT (T5). Furthermore, TNF- α and IL-4 also showed a significant lower level for the survivor's group at the T5. Thus, regarding each biomarker's functions in the immunoinflammatory responses, their significant variations likely reflect an immunoreactivity associated with the RdT, correlating with improved outcomes following antineoplastic therapy. Hereafter, future studies are needed to validate these findings and further explore the role of these biomarkers in immunoinflammatory responses during RdT.

Keywords: radiotherapy; head and neck cancer; immune surveillance; inflammatory biomarker; survival.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Linha do tempo do período de observação e detalhamento dos procedimentos realizados durante o estudo.....	40
Figura 2 –	Kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Screening Panel, 48-Plex.....	41
Figura 3 –	Agitador orbital digital para microplaca MTS 2/4. IKA, Wilmington, NC, EUA.....	43
Figura 4 –	Analisador Multiplex Bio-plex 200®, Luminex® conjugado ao software.	44
Figura 5 –	Analisador Multiplex Bio-plex 200®, Luminex®.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Gradação da Mucosite oral no período T2 para ambos os grupos (n=48): porcentagem de pacientes apresentando Ausência de mucosite; Mucosite leve ou moderada; ou Mucosite Severa.....	51
Gráfico 2 –	Gradação da Mucosite oral no período T3 para ambos os grupos (n=48): porcentagem de pacientes apresentando Ausência de mucosite; Mucosite leve ou moderada; ou Mucosite Severa.....	52
Gráfico 3 –	Gradação da Mucosite oral no período T4 para ambos os grupos (n=48): porcentagem de pacientes apresentando Ausência de mucosite; Mucosite leve ou moderada; ou Mucosite Severa.....	53
Gráfico 4 –	Gradação da Mucosite oral no período T5 para ambos os grupos (n=48): porcentagem de pacientes apresentando Ausência de mucosite; Mucosite leve ou moderada; ou Mucosite Severa.....	54
Gráfico 5 –	Frequência de óbitos em função do T0.....	55
Gráfico 6 –	Frequência das lesões por sítio anatômico nos falecidos (n=24)	55
Gráfico 7 –	Frequência das lesões por sítio anatômico nos vivos (n=24).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Número de pacientes do sexo masculino; pacientes com histórico de tabagismo e etilismo; portadores de Diabetes Mellitus e Hipertensão arterial; diagnosticados com CEC; pacientes submetidos à quimioterapia adjuvante; e regimes de intervenção odontológica e laserterápica durante a RdT em pacientes vivos e falecidos.....	48
Tabela 2 –	Média (+DP) da idade, dose de radiação, sialometria no T0 e T5, e CPOD em pacientes vivos e falecidos.....	49
Tabela 3 –	Mediana e intervalo interquartil dos parâmetros periodontais no T0 e T5.....	50
Tabela 4 –	Média de tempo de sobrevivência em relação ao T0 (+DP) para os pacientes falecidos.....	54
Tabela 5 –	Interleucinas pró-inflamatórias salivares nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos.....	57
Tabela 6 –	Interleucina anti-inflamatória salivar nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos.....	58
Tabela 7 –	Quimiocinas salivares nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos.....	59
Tabela 8 –	Citocinas pró-inflamatórias salivares nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos.....	60
Tabela 9 –	Fatores de crescimento salivares nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	Comitê Conjunto Americano sobre Câncer
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ATP	Adenosina Trifosfato
BFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
CCR1	Receptor de quimiocina CC tipo 1
CCR4	Receptor de quimiocina CC tipo 4
CCR5	Receptor de quimiocina CC tipo 5
CD	Célula Dendrítica
CEC	Carcinoma de Células Escamosas
CPOD	índice de Dentes Cariados Perdidos e Obturados
CSF	Fator Estimulador de Colônias
CXCR2	Receptor de quimiocina CXC tipo 2
DAMPS	Padrões Moleculares Associados a Danos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Acurácia de Teste Diagnóstico
ELR	Segmento de glutamato, leucina e arginina em quimiocinas cxc
GCSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GRO α	Quimiocina acrônimo para Oncogene Relacionado a Crescimento α
Gy	Unidade de dose de radiação absorvida Gray
HMGB1	Proteína de Alta Mobilidade do grupo 1
HPV	Papillomavirus Humanos
HSP	Proteína de Choque Térmico
IBV	Índice de Biofilme Visível
IFN α	Interferon alfa
IFN γ	Interferon gama
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18

IL-1Ra	Antagonista do Receptor da Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMRT	Radioterapia de Intensidade Modulada
InGaAIP	Arseneto de Alumínio e Gálio
IP10	Proteína Induzida por Interferon gama
ISOO	Sociedade Internacional de Oncologia Oral
ISS	Índice de Sangramento a Sondagem
JAK/STAT	Via de sinalização Janus quinase/ Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição
MASCC	Associação Multinacional de Terapia de Suporte no Câncer
MCSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
MHC	Moléculas do Complexo de Histocompatibilidade
MIG	Monocina Induzida por Interferon gama
MIP1 α	Proteína Inflamatória de Macrófago 1 α
MO	Mucosite Oral
NF κ B	Fator Nuclear κ B
NIC	Nível de Inserção Clínica
NK	Linfócito Exterminador Natural
NLRP3	Inflamassoma NLRP3
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORN	Osteorradioneecrose
PBM	Fotobiomodulação
PBS	Profundidade de Bolsa a Sondagem
PDGFBB	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
RdT	Radioterapia
SARS-CoV-2	Vírus SARS-CoV 2
STAT1	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição do tipo 1
STAT6	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição do tipo 6

Th	Linfócito T auxiliador
TNFR-1	Receptor de TNF do tipo 1
TNFR-2	Receptor de TNF do tipo 2
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao Fator de Necrose Tumoral
Treg	Linfócito T regulador
UICC	União para o Controle Internacional do Câncer
VCAM-1	Proteína de Adesão Celular Vascular 1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1	O câncer.....	18
1.1.1	<u>O câncer de cabeça e pescoço.....</u>	18
1.1.2	<u>O sistema de classificação.....</u>	19
1.2	A radioterapia.....	20
1.2.1	<u>Efeitos adversos da RdT</u>	21
1.2.1.1	A mucosite oral radioinduzida como efeito agudo da RdT.....	21
1.2.1.2	As repercussões tardias da RdT & Tratamento odontológico.....	22
1.3	Vigilância imunológica e Imunoedição.....	24
1.3.1	<u>Efeitos da Radioterapia na imunogenicidade dos tumores</u>	25
1.4	Biomarcadores inflamatórios relacionados ao câncer.....	26
1.4.1	<u>Interleucinas.....</u>	27
1.4.1.1	Família da IL-1.....	27
1.4.1.2	IL-4.....	28
1.4.1.3	IL-6.....	29
1.4.1.4	IL-17.....	30
1.4.2	<u>Citocinas.....</u>	30
1.4.2.1	TNF- α	30
1.4.2.2	IFN γ	31
1.4.3	<u>Quimiocinas.....</u>	32
1.4.4	<u>Fatores de crescimento.....</u>	33
2	OBJETIVO.....	35
3	METODOLOGIA.....	36
3.1	Desenho do estudo.....	36
3.2	Seleção de pacientes e obtenção das amostras.....	36
3.3	Exames clínicos	37
3.4	Obtenção das amostras de saliva.....	37
3.5	Intervenções odontológicas em função da RdT.....	38
3.5.1	<u>Fotobiomodulação via Laserterapia de Baixa Intensidade.....</u>	38

3.5.2	<u>Tratamento odontológico e periodontal</u>	39
3.6	Linha do tempo do estudo	39
3.7	Análise imunológica das amostras de saliva	40
3.7.1	<u>Preparação inicial</u>	41
3.7.2	<u>O experimento</u>	42
3.8	Avaliação do desfecho clínico dos pacientes	45
3.9	Análise estatística	46
4	RESULTADOS	48
4.1	Dados demográficos	48
4.2	Dados periodontais	49
4.3	Avaliação da severidade de mucosite oral radioinduzida	51
4.4	Média de tempo de sobrevida após o T5	54
4.5	Sítio do tumor primário	55
4.6	Análise dos biomarcadores salivares	56
4.6.1	<u>Interleucinas pró-inflamatórias</u>	56
4.6.2	<u>Interleucina anti-inflamatória & Quimiocinas</u>	58
4.6.3	<u>Citocinas pró-inflamatórias</u>	59
4.6.4	<u>Fatores de crescimento</u>	61
5	DISCUSSÃO	62
	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

Muitos fatores contribuintes convergem para a origem tumoral, como a exposição à agentes químicos e físicos, infecções por agentes biológicos, e a persistência de eventos fisiológicos capazes de perturbar a homeostase genômica. Ao rompimento dessa estabilidade, surge o câncer, uma doença genética caracterizada por uma elevada capacidade proliferativa e invasividade, a qual interage com estruturas adjacentes e coordena mecanismos que possibilitam sua perpetuação. Conforme evoluem, tumores sólidos alteram as funções fisiológicas de tecidos e órgãos, tornando-se uma ameaça à vida do paciente. (1–5)

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) engloba tumores heterogêneos que acometem estruturas anatômicas compreendidas na cavidade oral, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, seios paranasais e laringe. (6,7) O Brasil é o sétimo país com maior incidência de CCP, onde surgem 27.026 novos casos a cada ano, e dos quais 78% são homens na quinta década de vida. Entre os anos de 2015 e 2020 o CCP afetou homens em uma proporção 3,4 vezes mais que mulheres, e especificamente para o câncer oral, estima-se que em 2023 cinco em cada 100 mil habitantes serão diagnosticados com a doença a nível nacional. (8–10)

Anualmente, o CCP contabiliza 5% das mortes por câncer no mundo, e no Brasil ele é responsável por 53% dos óbitos sobre os casos incidentes. (8) Mais de 60% são diagnosticados em estágio localmente avançado (6) e 50% desses morrem dentro de cinco anos. (11) Além da morbidade associada à severidade da doença, a recidiva do CCP, bem como o desenvolvimento de novos tumores na área de irradiação, podem explicar o motivo dos óbitos. (11,12)

A radioterapia (RdT) de cabeça e pescoço é uma abordagem terapêutica bem consolidada para o manejo do CCP, e que agrupa um conjunto de técnicas que se utilizam da radiação ionizante para promover a morte celular neoplásica. (13–15) A estomatotoxicidade é inerente ao tratamento radioterápico, repercutindo no surgimento de lesões de mucosite oral radioinduzida, cáries rampantes, e osteorradionecrose, tornando o tratamento odontológico prévio à RdT um método de mitigar os efeitos adversos da irradiação. (16–18)

O microambiente tumoral consiste em um tecido heterogêneo e complexo, formado por células mesenquimais e imunológicas capazes de produzir citocinas, quimiocinas e outros produtos celulares que exercem sobre o câncer efeitos que estimulam e inibem a progressão neoplásica. (5,19,20) A literatura descreve a capacidade da RdT em modular e coordenar reações imunes a partir da exteriorização de antígenos intracelulares, que podem culminar na morte imunogênica do tumor. (19,21,22) Em contrapartida, a irradiação pode direcionar o

microambiente para um fenótipo imunossuprimido e radiorresistente, bem como contribuir para o surgimento de mutações em células sadias do campo irradiado, aumentando as recidivas da doença. (12,23) Desse modo, identificar o teor e as origens das reações imunológicas que acontecem durante a RdT, pode fornecer informações a respeito do comportamento do paciente diante da terapia antineoplásica.

Nesse sentido, e considerando o campo anatômico que a RdT de cabeça e pescoço abrange, bem como que a produção e a qualidade da saliva também são impactadas pela radiação ionizante, (24,25) a coleta desse fluido biológico para análise imunológica pode se tornar uma candidata promissora para o monitoramento dos biomarcadores inflamatórios e fatores de crescimento salivares de pacientes com CCP, devido à proximidade anatômica com o câncer e por se destacar como um meio de baixa complexidade de execução, baixa invasividade e boa adesão do paciente. (26–29)

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O câncer

O processo de divisão celular é dotado de mecanismos que certificam a integridade do material genético antes da reprodução de uma herdeira. Caso uma alteração irreparável seja identificada, os processos de morte celular serão coordenadamente iniciados de modo a prevenir a perpetuação da inconformidade. Quando esses mecanismos são ineficazes em impedir a proliferação das células geneticamente alteradas, surge o câncer: uma doença oriunda da instabilidade genômica, que é clinicamente heterogênea, histologicamente complexa, potencialmente letal, e marcada por um descontrole replicativo de células exibindo mutações genéticas e epigenéticas. (1,4,30)

Apesar da extensa heterogeneidade clínica e histológica, existem algumas capacidades funcionais que sustentam a fisiopatologia do câncer e são compartilhadas por todos os tipos de neoplasias. (2,3) No geral, esses mecanismos possibilitam a sobrevivência do tumor e são gerenciados a partir de seu microambiente. Nele, residem e são recrutadas outras células além das cancerígenas, tais como fibroblastos, macrófagos, linfócitos, células dendríticas, além de outros componentes celulares que em conjunto com a matriz extracelular imersa em proteínas sinalizadoras formam o estroma do neoplasma. (5,31)

A cooperação entre as células neoplásicas e as células fisiologicamente normais ocorre através das sinalizações intercelulares que regulam os eventos promotores de sobrevivência definidores da malignidade da doença, sendo eles: angiogênese aberrante, resistência à morte celular, sinalização proliferativa contínua e autossuficiente, imortalidade, evasão do sistema imunológico e de supressores de crescimento desordenado, invasão tecidual, e inflamação do microambiente. (2,3) A conjunção desses eventos caracteriza o câncer como uma comunidade celular disfuncional e parasitária, regida por componentes da inflamação e tangenciada por tentativas malsucedidas de reparo tecidual. (3,5,32)

1.1.1 O câncer de cabeça e pescoço

O câncer acomete diversas regiões anatômicas de um organismo, e a exposição de certas regiões a determinados agentes químicos e biológicos eleva a probabilidade de desenvolvimento da doença. No que diz respeito aos fatores de risco para o CCP, o tabagismo, etilismo, e a infecção pelo herpes vírus (HPV) são os agentes mais documentados, enquanto este último está mais relacionado ao surgimento de tumores em localidades como a base da língua e tonsilas. (33,34)

A atuação desses fatores de risco como carcinógenos desencadeia uma série de eventos genéticos e epigenéticos que culmina em alterações do funcionamento de proteínas fundamentais na manutenção da conformidade do ciclo celular, como a P53, indutora de apoptose e cujo gene pode sofrer inativação ou mutação dependendo do carcinógeno. (2,33,35,36) Além disso, a literatura também relata uma associação entre a frequência de mutação do gene da P53 com o tempo de sobrevida no CCP (36).

Histologicamente, cerca de 95% dos tumores de cabeça e pescoço são epiteliais, sendo o carcinoma de células escamosas (CEC) o diagnóstico mais comum. (7,12,37) Anatomicamente o CCP possui distribuição heterogênea, englobando desde as regiões faringianas aos seios paranasais, e podendo se manifestar clinicamente através de sinais e sintomas inespecíficos, como alterações na vocalização, odinofagia, disfagia, otalgia, úlceras, massas irregulares etc. (7,35)

Dentre as modalidades terapêuticas, a cirurgia ressectiva é descrita como o tratamento padrão, limitando-se à extensão do tumor e preservando estruturas como a base do crânio, musculatura pré-vertebral e artéria carótida. (7) A RdT atua no tratamento adjuvante ou primário dependendo da localidade, tumores em base de língua, glote e tonsilas respondem bem à RdT sozinha. (7) Quimioterápicos como a cisplatina em alta dose e a carboplatina geralmente são utilizados no tratamento adjuvante, podendo ser aplicadas em concomitância à radioterapia. (7,13,38)

1.1.2 O sistema de classificação

No planejamento terapêutico antineoplásico do CCP, alguns fatores relacionados ao estado da doença serão determinantes. A classificação e o estadiamento costumam ditar a seleção das modalidades, a necessidade de terapia adjuvante sistêmica e o fracionamento das doses. (6,13,34) O sistema de classificação padronizado para o CCP é o TNM da American

Joint Committee on Cancer (AJCC)/ International Union Against Cancer (UICC), que categoriza a doença de acordo com a dimensão da massa tumoral (T) e profundidade de invasão no tecido; avalia o comprometimento dos linfonodos adjacentes e distantes (N); e registra a presença de metástases a distância (M). (39,40)

A atualização mais recente desse sistema divide os tumores de cabeça e pescoço em algumas subcategorias: câncer de cavidade oral; câncer nasofaríngeo; câncer orofaríngeo; câncer cutâneo da cabeça e pescoço (que inclui o carcinoma de células escamosas); sarcoma de tecido mole de cabeça e pescoço; e câncer de tireoide. (40) Na subcategoria do câncer orofaríngeo há ainda uma subdivisão para os tumores associados ao HPV (39,40), cuja presença interfere no prognóstico, tratamento e sobrevida dos pacientes de CCP. (41–43)

Diagnosticando todos os aspectos do TNM é possível traçar um estadiamento com base no prognóstico da doença. Os estágios são graduais, variando do I ao IV, estando a severidade da doença associada ao comprometimento das estruturas adjacentes, linfadenopatia e metástase, esta última associada somente ao estágio IV, o mais avançado e com pior prognóstico. (39,40) Estágios I e II geralmente requerem abordagens monoterapêuticas como a cirurgia ou a radioterapia. (34) Relata-se que a melhor abordagem para tumores localmente avançados é a quimiorradiação para os casos em que a excisão do tumor é dificultada em virtude da proximidade com tecidos saudáveis, ou para terapia adjuvante pós-operatória. (44)

1.2 A radioterapia

A RdT é uma especialidade científica e terapia antineoplásica que se utiliza da radiação ionizante para entregar à célula neoplásica quantidades de energia capazes de interferir na homeostase do sistema celular, provocando a morte das células do tumor. Um dos métodos de transferência de energia se dá através da ação cinética de partículas atômicas como os elétrons e prótons, configurando a radioterapia particulada. Existe também a radioterapia via deposição de microcápsulas contendo isótopos radioativos no leito tumoral, a denominada braquiterapia. (15,45)

A morte celular radioinduzida normalmente ocorre devido aos danos diretos e indiretos ao DNA, sendo os danos à duas hélices os mais letais. Nessas ocasiões o material genético pode ser diretamente destruído pelas partículas irradiadas, ou indiretamente lesionado por meio da

produção de radicais livres de hidroxila, que podem quebrar a ponte fosfodiéster ou a ponte entre a base e o açúcar do material. (15)

Na RdT de cabeça e pescoço habitualmente são entregues de 66 até 74Gy de radiação ionizante na região que compreende o tumor primário e os linfonodos hiperplasiados, dividida pelo fracionamento convencional em 1,8 a 2Gy por dia, cinco vezes por semana, por sete semanas. (13,15,44) Células sadias também são afetadas no processo, provocando danos teciduais em consequência aos efeitos biológicos citados anteriormente; contudo, algumas técnicas mais recentes de RdT buscam contornar esses problemas ao otimizar a entrega da energia ao tumor, preservando as estruturas nobres da cabeça e pescoço, como as glândulas salivares. A técnica é a IMRT -Intensity Modulated Radiotherapy-, que possui com uma de suas indicações o câncer de cabeça e pescoço. (15,45)

1.2.1 Efeitos adversos da RdT

Em 29 de janeiro de 1896, menos de um ano depois da descoberta dos raios-X por Rontgen, Emil Grubbé, médico alemão residente de Chicago, irradiava terapeuticamente uma paciente recém-operada de um carcinoma das mamas utilizando equipamentos manufaturados por ele mesmo. (15,46,47)

Grubbé não somente foi o responsável por iniciar a utilização terapêutica da radiação ionizante, mas também foi o primeiro a ser afetado por seus efeitos adversos, e o primeiro a adotar medidas de proteção para os tecidos normais. Logo após iniciar seus experimentos com os raios-X, Grubbé desenvolveu dermatite na mão que era constantemente exposta à radiação. (46) Desde então algumas técnicas surgiram para minimizar os efeitos indesejáveis da RdT, como a já citada IMRT e as alterações no fracionamento de entrega da dose total, como ocorre no hiper fracionamento, onde a dose de energia é menor e aplicada mais de uma vez ao dia. (13,47)

1.2.1.1 A mucosite oral radioinduzida como efeito agudo da RdT

Apesar dos esforços de evasão aos efeitos mórbidos da RdT, eles ainda são muito comuns e podem se manifestar logo em seguida às primeiras doses. (25,47) Um dos efeitos citotóxicos agudos de grande relevância clínica que surge secundariamente ao tratamento do CCP é a mucosite oral, lesão inflamatória relacionada tanto à quimioterapia quanto à RdT, e geralmente identificada nos tecidos normais e de baixa queratinização da orofaringe. (16,25,48)

A Mucosite oral (MO) radioinduzida é uma complicação decorrente dos efeitos da radiação ionizante sobre a mucosa sadia compreendida na área da irradiação. Os eventos moleculares que levam ao surgimento das lesões, assim como na morte celular neoplásica, vão além dos danos diretos ao material genético e envolvem também a produção de espécies reativas de oxigênio capazes de ativar fatores de transcrição pró-inflamatórios. (49,50) Um deles é o NF- κ B, cujos efeitos celulares desencadeiam a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α , estabelecendo a inflamação característica das lesões. (49–51)

O curso natural da MO é didaticamente dividido em fases, dentre as quais a ulceração do epitélio ocorre após a amplificação molecular dos eventos inflamatórios e a superação do limite de mortes celulares antes da lesão tecidual. (50) Ao final da primeira semana de irradiação, com o acúmulo de 10Gy de energia, sinais e sintomas como eritema e ardência bucal são comuns. A ulceração pseudomembranosa está associada ao final da segunda semana de tratamento radioativo com o acúmulo de 20Gy, tornando-se difusas e mais severas ao final da terceira semana, sendo comuns às regiões como a mucosa jugal, lábios, ventre e bordas laterais da língua, soalho bucal e palato mole. (51) Caso não sejam tratadas, as lesões tornam-se mais dolorosas à medida que evoluem, sendo capazes restringir a alimentação via oral e inclusive provocar interrupções no tratamento antineoplásico. (25,52)

Desde 2020 a MASCC/ISOO (Multinational Association for Supportive Care in Cancer & International Society of Oral Cancer and Oncology) recomenda como conduta terapêutica para a prevenção da MO a fotobiomodulação (PBM) por laserterapia de baixa intensidade. (53) Apesar disso, ainda não há consenso acerca de um protocolo clínico para tratamento, por mais que diversos estudos clínicos mostrem as indubitáveis contribuições da PBM às lesões estabelecidas. (54–56) A terapia de PBM utiliza-se da luz no espectro vermelho e infravermelho para aprimorar o metabolismo celular em situações de estresse, como durante a irradiação. Ela aumenta a produção de ATP intracelular e óxido nítrico, bem como modula o ambiente inflamatório, reduzindo a inflamação. (57,58)

1.2.1.2 As repercussões tardias da RdT & Tratamento odontológico

Apesar da grande morbidade que a MO representa, ela é temporária, estando as lesões ulcerativas solucionadas até a quarta semana após a RdT. (51) Em contrapartida, os efeitos crônicos da RdT persistem mesmo após o fim do tratamento, e algumas alterações fisiológicas, como hipovascularização óssea, podem se tornar mais graves apesar da ausência da atividade radioativa sobre os tecidos.(59,60) As alterações vasculares prejudicam o metabolismo ósseo, diminuindo sua capacidade de remodelação pós-trauma e sendo capaz de induzir uma necrose óssea com exposição clínica do osso cortical, denominada nesses casos como Osteoradionecrose (ORN). (59,61) A literatura é inconsistente quando se trata de um protocolo para tratamento da ORN, e as terapias descritas geralmente envolvem a remoção do fragmento necrosado através de procedimentos cirúrgicos e o controle da infecção oportunista com o uso de antibióticos e antimicrobianos. Entretanto, quando se trata da prevenção, os estudos concordam que o tratamento odontológico prévio à RdT contribui para minimizar as necessidades de intervenção traumática após a irradiação, consequentemente prevenindo a ORN. (25,62,63)

O tratamento odontológico previamente ao tratamento antineoplásico também é recomendado pela MASCC/ISSO como parte do manejo de prevenção da MO(16)além de minimizar outros efeitos tardios da RdT, como as cáries de radiação que surgem pelas alterações ecológicas provocadas pela hipossalivação e em virtude às alterações no periodonto; e a doença periodontal, igualmente afetada pela produção reduzida de saliva.(25,64,65)

No que tange a doença periodontal, alguns estudos descrevem sua associação com o desenvolvimento de ORN(66) e com a MO através da amplificação dos processos inflamatórios que contribuem para um aumento na severidade das lesões, o que evidencia a indispensabilidade de seu controle terapêutico previamente e após o tratamento do câncer. (67,68)

Nesse sentido, Bruins e colaboradores em 1998 (69) estabeleceram um algoritmo que direciona a tomada de decisões para o tratamento odontológico antes da RdT com o intuito de mitigar as repercussões orais do tratamento. O objetivo primordial é a redução da carga microbiológica a partir da remoção de focos infecciosos, através do tratamento periodontal, tratamento endodôntico e exodontias de dentes extensivamente destruídos. (69,70)

No geral, a radioterapia de cabeça e pescoço traz consigo uma série de considerações acerca da saúde oral do paciente, sendo um fator determinante no planejamento e execução de intervenções orais antes da irradiação, e direcionando a preservação odontológica do paciente submetido à RdT.

1.3 Vigilância imunológica e Imunoedição

As respostas imunoinflamatórias promovidas pela imunidade inata e adaptativa exercem efeitos paradoxais sobre o câncer, promovendo a oncogênese (5) ou suprimindo o descontrole do crescimento de células anormais. (71–73) As funções do sistema imunológico na origem do câncer é tema de estudos há pelo menos um século. No final do século XIX Virchow publicava suas observações acerca da origem inflamatória de alguns tumores. (74) Tempos depois, Ehrlich teorizava sobre a proteção que o sistema imunológico promovia através do controle neoplásico. (75)

Desde então algumas funções da regulação imunológica da oncogênese foram estabelecidas: as respostas imunes modulam e resolvem estados inflamatórios que contribuem nas alterações genéticas que antecedem a neoplasia (5,75), ao passo que eliminam células tumorais através do reconhecimento de neoantígenos, processo descrito como vigilância imunológica e parte da imunoedição. (73,75,76)

A imunoedição é um fenômeno de seleção darwiniana pelo qual a imunogenicidade do tumor diminui devido à adaptação às respostas citotóxicas provenientes do sistema imunológico, concedendo ao tumor um fenótipo imunorresistente. (71,75) A vigilância integra a primeira fase da imunoedição: a eliminação de células neoplásicas. A proliferação das células sobreviventes dessa etapa é contida por linfócitos durante a fase do equilíbrio, marcada também pelo surgimento de novas mutações que direcionam para o surgimento de uma linhagem de células capazes de escapar das células vigilantes, marcando assim o início das manifestações clínicas do câncer. (3,71,75)

Os linfócitos T CD4 e T CD8, as células apresentadoras de antígenos (APCs), e as células NK (Natural Killers), são alguns dos efetores da reatividade imunológica contra o neoplasma, atuando no reconhecimento e eliminação dos neoantígenos tumorais, e a supressão dessas células no microambiente tumoral é um dos mecanismos que facilita a evasão à vigilância imunológica. (71,77)

A imunorreatividade que conduz à morte do tumor é iniciada tanto pelos antígenos gerados pelas células mutantes, quanto pelos DAMPS (Danger Associated Molecular Patterns), moléculas reconhecidas por células NK, macrófagos e células dendríticas residentes - as mais

eficientes APCs capazes de ativarem linfócitos T prematuros-. (20,78,79) Dentre os DAMPS destacam-se a ATP intracelular, a Calreticulina, a IL-1 α e a IL-6.(79)

A captação dos antígenos ou DAMPS implica na migração das células dendríticas (CD) para os linfonodos de drenagem do tumor, onde portando o neoantígeno processado e exibido em peptídeos do complexo de histocompatibilidade (MHC), ativam os linfócitos T CD8 através do MHC I e CD4 através do MCH II, promovendo a expansão dos linfócitos T citotóxicos e sua translocação para o leito tumoral, onde exercerão suas funções de citotoxicidade contra as células tumorais. (73,76)

O microambiente do tumor e os tecidos linfoides adjacentes abrigam células imunológicas como macrófagos, mastócitos, CDs, linfócitos NK, linfócitos B, linfócitos T e suas subpopulações (Th1, Th2, Th17) e linfócitos T citotóxicos.(80) A literatura relata uma associação entre a densidade populacional de linfócitos Th1 e T citotóxicos, e sua localização no centro e nas margens do tumor, com a recorrência e sobrevida no câncer. (80)

Devido à presença marcante dos efetores imunológicos na composição do estroma tumoral, é previsível que seus produtos serão igualmente presentes. Quimiocinas como o MIG induzem a infiltração de linfócitos T CD8, linfócitos Th1 e células NK para o microambiente tumoral, e assim como descrito na literatura (81), a infiltração desses linfócitos quimiotaticamente atraídos parece contribuir para um prolongamento da sobrevida em pacientes com câncer colorretal. (81,82).

1.3.1 Efeitos da Radioterapia na imunogenicidade dos tumores

Ainda que o controle imune da oncogênese seja eficaz, diversos tumores são capazes de escapar da vigilância imunológica ao ponto de se tornarem clinicamente evidentes, exigindo um controle terapêutico específico nessas ocasiões.(3,71,75,83,84) Nesse contexto, a RdT enquadra-se como modalidade terapêutica amplamente utilizada para tratamento de diversos tipos de tumores, incluindo o CCP. (85)

Além de sua capacidade de provocar a morte celular direta e indireta, a radiação ionizante pode evocar respostas imunes que de forma semelhante ao controle imunológico do crescimento tumoral, pode levar à erradicação das células tumorais remanescentes do tratamento antineoplásico, atribuindo à radiação um efeito adicional possivelmente determinante no sucesso da RdT. (1,83,86,87)

A influência da irradiação terapêutica sobre o sistema imunológico é descrita como um efeito abscópico, que se refere aos eventos biológicos ocorridos longe do sítio irradiado, mas dentro do mesmo organismo.(86)O processo de morte celular pós-irradiação é capaz de exteriorizar proteínas compartimentalizadas, que assumem funções de DAMPS e são responsáveis por engatilhar respostas imunológicas mediadas pelas CDs. (19,83,86,88,89) Os novos antígenos aumentam a imunogenicidade do tumor, tornando-o mais evidente e vulnerável às células efetoras e suas respostas destrutivas. (83,90)

Cada DAMP emite um sinal distinto, a ATP uma vez exteriorizada emitirá um sinal de atração para monócitos e CDs e ativação do inflamassoma, estimulando a produção de IL-1 β e IL-18. (87,91) A calreticulina é uma DAMP que ao ser exteriorizada emitirá um sinal estimulando fagocitose e a produção de IL-6 e TNF- α em APCs. (19,91). Outras proteínas que atuam como DAMPS são a HMGB1 e as proteínas de choque térmico (HSPs). (19)

Os antígenos são reconhecidos pelas CDs e então apresentados no linfonodo de drenagem do tumor, onde ocorre a ativação dos linfócitos T residentes, capazes de translocarem-se até o sítio do tumor atraídos pelo gradiente quimiotático. A infiltração no tumor pelos linfócitos T CD4 e CD8 é favorecida pelas moléculas de adesão superreguladas pela radiação ionizante, como o VCAM-1 e a quimiocina MIG. (19,90,92) Linfócitos T e NK ativados produzem IFN do tipo II, aumentando a expressão de MHC-I na superfície das células tumorais e otimizando as interações celulares e efeitos citotóxicos contra essas células, resultando na morte imunogênica do tumor. (19,87,93,94)

Portanto, é possível assumir que o sistema imunológico por meio de seus efetores celulares e moleculares é parte fundamental da origem, desenvolvimento, e erradicação dos tumores através da coordenação de mecanismos que promovem o controle do crescimento neoplásico. No geral, presume-se que a irradiação sobre os tumores seja capaz de criar um ambiente rico em gatilhos para respostas imunológicas que ajudarão as células tumorais a tornarem-se mais uma vez detectáveis pelas células imunológicas efetoras. Assim, é possível inferir que, possivelmente, o sucesso da RdT pode também estar associado à sua capacidade de produzir antígenos contra as células neoplásicas quando existem remanescentes tumorais significativos.

1.4 Biomarcadores inflamatórios relacionados ao câncer

A inflamação é a via pela qual o sistema imunológico responde à lesão celular e aos danos teciduais, sendo ela uma alteração fisiológica característica do câncer. (3,5) As respostas não-resolutivas no controle do estímulo inflamatório perpetuam os danos teciduais e podem culminar em alterações do material genético através da amplificação de sinalizações que contribuem para o surgimento de disrupções oncogênicas. (5,74)

Entretanto, a inflamação também é um fenômeno associado à terapia antineoplásica. A irradiação terapêutica provoca o rompimento da homeostase da célula e a leva à morte. Durante esse processo diversos gatilhos para respostas inflamatórias agudas são exteriorizados e iniciam eventos imunoinflamatórios antitumorais capazes de provocar a morte imunogênica do câncer. (19,95)

Sob a inflamação atuam proteínas que coordenam e modulam os eventos histológicos e bioquímicos característicos do processo. Esses biomarcadores inflamatórios são as citocinas, interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento produzidos pelos mediadores celulares da inflamação, dos quais os linfócitos T CD4, T CD8 e as APCs são alguns dos principais atores. (96)

O tumor em seu microambiente presencia a prevalência de respostas inflamatórias do tipo II, onde ocorrem as tentativas de reparo tecidual e a produção de fatores de crescimento, e no geral, muitos componentes imunológicos da inflamação associada ao câncer apresentam funções dualistas, ora contribuindo para a oncogênese, ora contribuindo para a morte neoplásica. (5,74,97)

1.4.1 Interleucinas

1.4.1.1 Família da IL-1

A interleucina 1 α e a 1 β são agonistas de uma família que também inclui a IL-18. (98) Ambas são pró-inflamatórias, mas apesar de exercerem funções biológicas similares, a IL-1 α e a IL-1 β possuem apenas 25% de semelhança estrutural. (99) A IL-1 α possui um precursor expresso constitutivamente por todo epitélio gastrointestinal, pulmão, rins, fígado, células endoteliais e astrócitos, o qual é liberado mediante necrose tumoral, além disso ela atua como alarmina antecedendo uma resposta inflamatória estéril. (100) A IL-1 β por sua vez é produzida

por monócitos, macrófagos e células dendríticas em resposta a estímulos como componentes do sistema complemento e $\text{TNF}\alpha$, necessitando que seu precursor seja clivado pela caspase-1 ativada por DAMPS, atuando como mediadora da imunidade adaptativa e humoral. (98–101)

Assim como outros membros na família da IL-1, a IL-18 possui uma forma precursora (pro-IL-18) produzida constitutivamente por monócitos, macrófagos residentes e células dendríticas. Para que a ativação ocorra é necessário que a pro-IL-18 seja clivada por um complexo formado pela caspase-1 no inflamassoma NLRP3. (102,103) Dentre suas funções pró-inflamatórias destaca-se a indução da produção de $\text{IFN}\gamma$ em linfócitos Th1, células NK, linfócitos NK, linfócitos B, células dendríticas e macrófagos, nestas últimas mediante a presença de IL-12. (102) Linfócitos T CD4 indiferenciados expressam receptores para a IL-18, e ao contato com ela, têm sua produção de IL-4 amplificada. (104) No geral, a IL-18 orchestra respostas imunológicas inatas e adaptativas, e a inflamação mediada por esta interleucina em conjunto com a IL-1 β é um indicativo da presença de DAMPS no citosol. (102,105)

No que tange o câncer, também existe uma dualidade da atuação da IL-18, exercendo efeitos antitumorais ao incitar respostas citotóxicas das células NK produtoras de $\text{IFN}\gamma$, e em contrapartida facilitando a proliferação neoplásica através da angiogênese. (102,104)

Outro componente dessa família é a antagonista do receptor da IL-1, a IL-1Ra, cuja estrutura é homóloga a IL-1 e liga-se ao mesmo receptor, agindo como inibidora competitiva da IL-1. (106) A IL-1Ra não possui atividades biológicas, porém, através do bloqueio da sinalização da IL-1, pode contribuir para a redução do crescimento tumoral e metástase. (107)

1.4.1.2 IL-4

Assim como a IL-5 e a IL-13, a IL-4 é uma citocina de assinatura dos linfócitos Th2, produzida também por mastócitos ativos, linfócitos NK, basófilos e eosinófilos. Ao mesmo tempo em que ela é pró-inflamatória, atuando nas fases finais da inflamação, ela é determinante para a diferenciação de células efectoras anti-inflamatórias, agindo sobre a polarização de linfócitos T CD4 prematuros em Th2 e na diferenciação de macrófagos para a linhagem alternativa. Os efeitos celulares da IL-4 são mediados principalmente pelo fator de transcrição STAT6, que atua sobre a proliferação, adesão e quimiotaxia de mastócitos e eosinófilos, bem como no aumento da expressão de moléculas de adesão como o VCAM-1. Ela também atua

sobre a diferenciação de linfócitos T CD8, importante efector celular da erradicação imunogênica tumoral. (108–111)

No câncer, as células tumorais são capazes de produzir IL-4, e apesar da mesma estar relacionada com a polarização do microambiente tumoral em direção a um fenótipo favorável à sobrevivência do tumor (5,112), a literatura já a descreveu como indutora de apoptose no carcinoma de células renais. (113) Além disso, outros efeitos antitumorais da IL-4 reportados incluem o aprimoramento das respostas antitumorais de macrófagos e indução de respostas antitumorais após administração local em linfonodo de drenagem do tumor. (108)

Um estudo com modelo animal elucidou algumas funções antitumorais promovidas pela IL-4 (114), nele descreve-se a capacidade desta interleucina em provocar uma infiltração de eosinófilos e assim induzir respostas citotóxicas contra as células neoplásicas, levando à morte tumoral sem que haja participação de outras células imunes.

1.4.1.3 IL-6

A IL-6 é produzida por células imunológicas como os linfócitos T, macrófagos, monócitos, células dendríticas, linfócitos B e em parte pelos linfócitos Th. O estresse celular e as lesões teciduais causadas pela irradiação são capazes de estimular a produção dessa interleucina, produzida através do reconhecimento de moléculas como os DAMPS. (115–117)

A IL-6 atua como elo entre as imunidades inata e adaptativa, e um de seus efeitos pleiotrópicos é o aprimoramento da expressão de IL-4 por linfócitos T CD4. (5,115,117) Outra propriedade da IL-6 que enriquece sua atuação sobre a polarização dos linfócitos Th é sua contribuição na polarização dos Th17 ao reprimir a produção de IFN γ pelos linfócitos T CD4. (115) Sobre os linfócitos B ativados, ela contribui para sua diferenciação em células produtoras de anticorpos. (116)

No microambiente tumoral, a IL-6 é descrita como residente mais expressiva, e através da via de sinalização JAK/STAT, aprimora as capacidades de proliferação celular, metástase, e angiogênese por meio da super-regulação de bFGF em células mieloides e endoteliais do tumor. (118) Além disso, a produção de IL-1 β , IL-8, GM-CSF e VEGF também é induzida pela IL-6. (119)

1.4.1.4 IL-17

É a interleucina de assinatura dos linfócitos Th17, mas também é produzida por outras células do sistema imune como os linfócitos T CD8 e linfócitos NK. (120) Seu principal efeito imunológico é a indução da produção do estimulador de colônias de granulócitos, o G-CSF, e a partir disso promover uma resposta inflamatória mediada por neutrófilos. (110)

Assim como a IL-1, a IL-17 atua na ativação do fator de transcrição NF- κ B, mediador crucial da inflamação associada ao câncer. (5,121). O NF- κ B regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como a IL-1, IL-6, TNF- α e IL-8, e contribui para o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação através da expressão de moléculas de adesão. (121) Também existe uma dualidade na atuação do NF- κ B no câncer, uma vez que sua ativação induz uma super-regulação de genes antiapoptose, ao passo que por ser regulador de respostas imunes inatas e adaptativas, ele pode orquestrar repostas imunes inatas e por consequência levar à morte tumoral. (121,122)

1.4.2 Citocinas

1.4.2.1 TNF- α

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina primordial na inflamação das respostas imunes inatas e adaptativas e no câncer, tendo recebido seu nome em virtude de sua capacidade de causar morte tumoral ao provocar trombose dos vasos sanguíneos tumorais. (106,123)

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos e CDs sob estímulo de moléculas como as DAMPS, e liga-se a dois tipos de receptores, o TNF-RI e o TNF-RII, ambos envolvidos em respostas imunoinflamatórias e vias capazes de engatilhar a apoptose. A conexão do TNF- α ao seu receptor culmina na ativação de fatores de transcrição como o já mencionado NF- κ B. A apoptose induzida pelo TNF- α ocorre quando a ativação do NF- κ B é dificultada, como nos casos de estresse metabólico. (123) Quando ocorre, a ativação do NF- κ B pelo TNF- α parece

aprimorar as capacidades de sobrevivência do tumor, dificultando a apoptose da célula neoplásica e coordenando a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias(97)

Apesar do TNF- α ter a capacidade de causar necrose hemorrágica de tumores quando é localmente administrado, e de mediar respostas antitumorais de linfócitos T (124), quando o TNF- α é produzido pelas células tumorais acaba por contribuir na proliferação do neoplasma ao induzir angiogênese e remodelação tecidual, processos histológicos fundamentais para o crescimento tumoral (74).

Ainda na família do TNF, o TRAIL - TNF Related Apoptosis Inducing Ligand – é uma citocina capaz de induzir a apoptose via mecanismos que culminam na fragmentação do DNA, vesiculação da membrana plasmática, disrupção do citoesqueleto e catástrofe metabólica. (125) O TRAIL e seus receptores são expressos por células efectoras da imunidade inata e adaptativa, como macrófagos, células dendríticas e células NK. (126) A ativação do NF- κ B também ocorre através da sinalização do TRAIL, e contribui para a invasividade e proliferação celular tumoral, função que ilustra a dualidade da citocina no câncer. Apesar disso, a administração do TRAIL na terapia antineoplásica parece ser eficiente e de menor citotoxicidade em comparação com o TNF- α . (127)

1.4.2.2 IFN γ

O interferon gama (IFN γ) é a citocina de assinatura dos linfócitos Th1, cuja produção também ocorre por células NK e linfócitos T CD8, sendo o IFN γ responsável por coordenar a ativação de efetores da imunidade inata e adaptativa. (110)

A interação do IFN γ ocorre com o tipo II de receptores de interferons, enquanto o interferon alfa (IFN α) liga-se ao tipo I, ambos podendo ativar a via de sinalização JAK/STAT1 que controla a expressão de genes associados à supressão tumoral e leva à expressão de caspases e indução da expressão da quimiocina IP-10, culminando na redução da angiogênese tumoral. (128–130) O IFN α também pode atuar estimulando a expressão do TRAIL em neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B. (131)

Todavia, e assim como diversas outras citocinas, a literatura descreve uma contradição na atuação desses interferons e ativação do STAT1 no câncer, estando a expressão desregulada desse fator de transcrição associada à resistência radioterápica. (128,132) Um estudo com modelo animal utilizando uma linhagem de células de câncer de cabeça e pescoço avaliou que

após a exposição a 40Gy, a sinalização promovida pelo conjunto IFN/STAT1 concedia proteção à morte celular através da irradiação. (132)

Um estudo *ex vivo* também encontrou resultados semelhantes em neoplasias renais, onde o bloqueio da sinalização do STAT1 aumentou a radiosensibilidade do tumor. (133) Outro estudo também sobre carcinoma renal descobriu que a expressão do STAT1 aumenta também a resistência do tumor à cisplatina, quimioterápico associado à radioterapia. (134)

O eixo de sinalização IFN/STAT1 tem sua expressão super-regulada em tumores em resposta à irradiação e isso leva a uma adaptação evolutiva contra os mecanismos antitumorais dessa sinalização, concedendo ao tumor resistência aos interferons e a quimiorradioterapia. Ainda assim, os mecanismos que norteiam a subversão da sinalização dos interferons no câncer permanece obscuro. (128,134,135)

1.4.3 Quimiocinas

O termo quimiocina deriva de citocina quimiotática, proteínas de baixo peso molecular estruturalmente caracterizadas e classificadas pela presença de resíduos de cisteína. Elas atuam basicamente no recrutamento de células hematopoiéticas para os tecidos, ligando-se aos receptores associados à proteína G. (105,136)

As duas principais subfamílias de quimiocinas diferenciam-se pelo posicionamento dos resíduos de cisteína e dos demais aminoácidos: a CXC – que possui aminoácidos entre os dois primeiros resíduos-; e a CC – que possui aminoácidos ao lado dos dois primeiros resíduos. (137) A classe CXC possui uma subclassificação baseada na apresentação de três aminoácidos, o glutamato, a leucina e a arginina (denominado ELR- motif), e a localização desse agrupamento interfere na função biológica da quimiocina. (136,138)

Além da modulação da movimentação de leucócitos, as quimiocinas exercem outras funções biológicas como a angiogênese, fenômeno crucial para o desenvolvimento tumoral. (136,139) As quimiocinas parecem atuar sobre os padrões de metástase apresentados por alguns tipos de neoplasias, em que dependendo do receptor de quimiocina expresso pela célula tumoral e da quimiocina expressa por determinado tecido, pode-se nortear a disseminação neoplásica em um organismo. (136)

Contudo, algumas quimiocinas também exercem funções angioestáticas dependendo do receptor que se conecta, como o MIG (Monocina Induzida por Interferon), capaz de controlar

a proliferação tumoral. Citocinas como o TNF- α e a IL-1 são capazes de estimular a produção de quimiocinas CXC com o agrupamento ELR (angiogênicas) e de quimiocinas CXC sem o agrupamento (angioestáticas). (136)

O GRO α é uma quimiocina da subclasse CXC cujo agrupamento ELR é presente, assim como a IL-8, e ambas são descritas como quimiotáticas de neutrófilos e angiogênicas por meio da interação com o receptor CXCR22, que induz a quimiotaxia de células endoteliais. Os macrófagos associados ao tumor têm a capacidade de produzir o GRO α , e relata-se que sua expressão e da IL-8 é super-regulada em alguns tipos de neoplasias, contribuindo para metástases de alguns casos. (140–142)

Em contrapartida ao GRO α , quimiocinas que carecem do agrupamento ELR, assim como o MIG, por serem angioestáticas, podem ter efeitos antitumorais. (140,143) O MIG atrai linfócitos para o sítio da inflamação e atua na angioestaticidade ao competir com fatores de crescimento angiogênicos pela interação com os linfócitos. (140)

Na família das quimiocinas CC há o MIP-1 α , expresso por células como macrófagos, monócitos, linfócitos, células NK e neutrófilos. Ele interage com três receptores: o CCR1 em monócitos; o CCR4 em linfócitos Th2 e linfócitos Treg; e o CCR5 em linfócitos Th1, células NK e células dendríticas; culminando no recrutamento de monócitos, macrófagos e neutrófilos para o microambiente da lesão. (82,144) Apesar de exercer efeitos antitumorais significantes, o MIP-1 α pode favorecer o desenvolvimento do neoplasma ao promover uma infiltração de macrófagos e outras células imunossupressoras, facilitando a evasão do tumor à vigilância imunológica. (144)

1.4.4 Fatores de crescimento

Fatores de crescimento são peptídeos capazes de induzir mitose e promover proliferação celular, além de atuarem em processos de diferenciação celular, migração e adesão. São produzidos por células envolvidas no reparo tecidual e inflamação, como fibroblastos, plaquetas, células endoteliais vasculares etc. (145,146)

O PDGF-BB integra uma subfamília de fatores de crescimento derivados de plaquetas. São expressos por células endoteliais e ligam-se a receptores de tirosina quinase, atuando como mitógenos de fibroblastos e células musculares lisas, e no processo de maturação de vasos sanguíneos através do desenvolvimento de pericitos. (147) Ademais, a literatura descreve que

a expressão de receptores para o PDGF é comum em fibroblastos associados ao tumor e que a sinalização autócrina e parácrina induzida pelo PDGF-BB é uma das vias pela qual o tumor sobrevive e se desenvolve. (148)

Outro fator de crescimento também capaz de atuar nos processos angiogênicos é o bFGF, um fator de crescimento de fibroblastos que estimula o desenvolvimento de células endoteliais. (149,150) Ele interage com a heparina e o proteoglicano de heparan sulfato, que modula sua ligação com seu receptor de tirosina quinase e suas atividades celulares. (150) No câncer, o bFGF está envolvido na vascularização dos tumores, sendo um preditor de prognóstico ruim para câncer pulmonar. (151,152)

Os fatores estimuladores de colônias (CSFs) são glicoproteínas produzidas por uma vasta diversidade de células, e que constituem uma classe de fatores de crescimento atuantes sobre determinadas células hematopoiéticas, estimulando a proliferação celular e formação de colônias. Enquanto o G-CSF controla e regula a formação de colônias de granulócitos, o M-CSF atua sobre macrófagos. A sinalização induzida por esses fatores geralmente é parácrina, e progenitores de granulócitos e macrófagos exibem receptores para seus respectivos CSFs nos estágios de maturação celular. Outros efeitos dos CSFs incluem a inibição de apoptose, a regulação das atividades de fagocitose de neutrófilos, e a produção de citocinas por macrófagos. Em suma, o G-CSF e o M-CSF são essenciais para que a demanda por granulócitos e macrófagos em situações de estresse biológico seja contemplada. (153,154)

Para o câncer, a literatura descreve a atuação de fatores como o G-CSF na progressão tumoral através do recrutamento de neutrófilos para as proximidades do tumor. (155,156) Esse fator é produzido principalmente por macrófagos, células mesenquimais da medula óssea, células endoteliais e fibroblastos, e seu respectivo receptor é expresso intensamente por células mieloides e endoteliais. (156) Observações in vitro demonstraram que outra capacidade do G-CSF sobre a progressão tumoral ocorre regulando a expressão de collagenase do tipo IV por células tumorais, fato que aprimora as capacidades de invasividade neoplásica. (157)

Em suma, os biomarcadores inflamatórios podem ser descritos como os efetores moleculares das respostas imunológicas, sendo capazes de operacionalizar os mecanismos de progressão e supressão do câncer, bem como indicar a presença dos efetores celulares das reações imunoinflamatórias que tangenciam o curso da doença.

2 OBJETIVO

Avaliar as concentrações de biomarcadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes com CCP submetidos à RdT correlacionando com o desfecho clínico pós-tratamento.

Os objetivos secundários incluem descrever e comparar os dados demográficos e clínicos, incluindo os parâmetros odontológicos gerais, parâmetros periodontais e histórico de manifestação de mucosite oral radioinduzida, de modo a controlar potenciais variáveis que possam interferir nos resultados das comparações dos analitos.

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Análise descritiva longitudinal retrospectiva.

3.2 Seleção de pacientes e obtenção das amostras

O presente estudo foi conduzido em pacientes diagnosticados com câncer na região de cabeça e pescoço encaminhados pelas equipes de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Radioterapia do Hospital Universitário Pedro Ernesto para atendimento na Clínica de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), entre o primeiro trimestre de 2018 e o último trimestre de 2019.

Os critérios de seleção foram: idade superior a 18 anos; tumores situados na região de cabeça e pescoço cujo tratamento necessariamente envolveria radioterapia de cabeça e pescoço (com ou sem quimioterapia adjuvante); e com no mínimo seis dentes naturais (excluindo os terceiros molares). Os critérios de exclusão foram: pacientes em nutrição parenteral, edentados, em uso de drogas inibidoras de reabsorção óssea, submetidos a tratamento odontológico em até seis meses antes do recrutamento, e submetidos a radioterapia ou quimioterapia prévias. Um total de 48 pacientes foram convidados para o estudo, 32 homens e 16 mulheres.

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto sob o número CAAE: 30641020.7.0000.5259. No ato do recrutamento cada paciente foi orientado a respeito do teor do estudo e dos exames clínicos a serem conduzidos, e então obtinha-se a anuência após leitura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) junto ao paciente.

A dose média de radiação ionizante recebida por paciente ao final da RdT foi de 67,6 Gy, distribuída em regime fracionado por sessões diárias em cinco vezes na semana até a soma da energia total.

3.3 Exames clínicos

Na consulta inicial todos os pacientes foram submetidos aos exames clínicos extra e intraorais para identificação de necessidades de tratamento odontológico e obtenção de parâmetros periodontais. A presença e ausência de elementos dentários, bem como suas condições no momento do exame, foram registradas de acordo com o índice de dentes Cariados Perdidos e Obturados (CPOD) da OMS.

A avaliação periodontal foi executada empregando um exame periodontal de boca completa. Uma sonda periodontal milimetrada manual (Carolina do Norte 15mm – Hu-Friedy®, Chicago, IL, Estados Unidos) foi utilizada para sondagem de seis sítios por cada elemento exceto os terceiros molares (Mésio-vestibular; Vestibular; Disto-vestibular; Médio-lingual; Lingual; Disto-lingual).

Os parâmetros periodontais registrados foram: Índice de Biofilme Visível (IBV), avaliado dicotomicamente entre presente ou ausente; Profundidade de Bolsa à Sondagem (PBS); Índice de Sangramento à Sondagem (ISS), avaliado dicotomicamente entre presente ou ausente; e Nível de Inserção Clínica (NIC).

Os exames também compreenderam as avaliações da severidade de mucosite oral durante todo o período de observação. Os graus apresentados foram categorizados de acordo com a classificação da OMS(52,158), sendo divididos em: ausência de mucosite; mucosite leve ou moderada; e mucosite severa.

3.4 Obtenção das amostras de saliva

Três amostras de saliva não estimulada foram coletadas de todos os indivíduos em três períodos distintos: na primeira consulta com a equipe odontológica (T0); no 25º dia de radioterapia de cabeça e pescoço (T3); e 35 dias após o término do tratamento (T5). Antes de cada coleta os pacientes eram instruídos a absterem-se de alimentos ou água durante os 30 minutos que antecediam as consultas, ocorridas geralmente no período matutino. Os indivíduos também eram orientados que se sentassem com os pés apoiados no chão, tronco inclinado para frente e os cotovelos sobre os joelhos, para que salivassem passivamente dentro de um

recipiente estéril durante cinco minutos cronometrados. Ao final do procedimento o fluxo de saliva produzido era mensurado com o auxílio de uma seringa estéril de 10ml para fins de registro da sialometria.

O fluido coletado era imediatamente transferido para um tubo de micro centrífuga com capacidade de armazenamento de 1,5ml contendo 0,10µl de solução de inibidores de proteases contendo: 0,1 mmol/L de fluoreto de fenilmetilsulfonilo; 0,1 mmol/L de cloreto de benzetônio; 10 mmol/L de EDTA; 0,01 mg/ml de aprotinina A; e 0,05 % de Tween 20. Os tubos eram imediatamente centrifugados por oito minutos sob 8.000 rpm. Ao final da centrifugação, os sobrenadantes eram separados dos detritos sedimentados e transferidos para um microtubo rosqueável para subsequente armazenamento em frigorífico -70°C no Laboratório Multiusuário de Pesquisas em Imunologia Oral, na Faculdade de Odontologia da UERJ para posterior análise imunológica.

3.5 Intervenções odontológicas em função da RdT

3.5.1 Fotobiomodulação via Laserterapia de Baixa Intensidade

Assim como preconizado pela MASCC/ISSO (16), todos os pacientes foram submetidos a um regime de laserterapia para prevenção da mucosite oral radioinduzida. As lesões que se manifestavam clinicamente foram tratadas também via fotobiomodulação.

A laserterapia de baixa intensidade foi administrada por um único profissional e em regime diário antes e durante a RdT, logo após as sessões de irradiação. Para a prevenção, em média 53 pontos foram perpendicularmente incididos através do contato direto com o tecido, distribuídos pelas áreas de menor queratinização da boca. Para tratamento, cada lesão manifestada foi incidida em cinco pontos, distribuídos em quatro marginais e um central. O leito tumoral não recebeu laserterapia em nenhuma ocasião.

Duas intensidades foram aplicadas com o aparelho de laser de InGaIP (TF Premmier, Mmoptics LTDA, São Carlos, Brasil): a) dose de fluência de 25,0J/cm², 1J por ponto de incidência, com comprimento de onda de 660nm e 100mW de potência; b) dose de fluência de

6,2J/cm², 0,24J por ponto de incidência, com comprimento de onda de 660nm e 25mW de potência.

3.5.2 Tratamento odontológico e periodontal

Após exame odontológico e periodontal, os tratamentos necessários foram executados antes da RdT com objetivo de controlar sítios de inflamação crônica e eliminar focos infecciosos, de modo a minimizar a incidência de complicações agudas e crônicas da irradiação.

Parte dos participantes foram encaminhados já portando o laudo de conclusão do tratamento odontológico por profissionais externos. Para o restante dos pacientes foi necessário planejar e sanar as necessidades de saúde bucal seguindo o protocolo de: (1) Instrução de higiene oral; (2) restaurações de lesões cariosas e cervicais não-cariosas utilizando cimento resinoso de ionômero de vidro (Ionômero de Vidro Vitremer); (3) exodontia de dentes com lesões periapicais, com lesões cariosas extensas, inclusos e/ou semi-inclusos, periodontalmente comprometido com PBS > 7mm, mobilidade grau III, e cuja proporção de raiz inserida não permitisse uma reabilitação protética; (4) tratamento endodôntico; (5) adequação de bordas e cúspides cortantes, remoção de aparelhos ortodônticos fixos e próteses mal adaptadas. Todos os pacientes receberam as orientações de higienização bucal durante a RdT.

O tratamento periodontal abrangeu a remoção de fatores retentivos de biofilme através da raspagem subgengival e alisamento radicular, raspagem supragengival, profilaxia com polimento coronário, e fluoterapia tópica. Para execução dos procedimentos, foram utilizados instrumentos manuais (Curetas Gracey, Mini-Gracey, e McCall Hufriedy®) e aparelho de ultrassom piezoelétrico (Schuster Sonic Laxis Bp).

3.6 **Linha do tempo do estudo**

No tempo zero (T0) foram realizados os exames clínicos, avaliações gerais, orientações e coletas iniciais. Os 15 dias de intervalo entre o T0 e o T1 corresponderam o período para resolução das necessidades de tratamento odontológico dos pacientes necessitantes.

O tempo um (T1) corresponde ao início da radioterapia de cabeça e pescoço e laserterapia para todos os pacientes. As avaliações clínicas das manifestações da mucosite oral radioinduzida foram realizadas nos tempos: dois (T2); três (T3); quatro (T4) e cinco (T5). O detalhamento dos procedimentos executados em cada período encontra-se na Figura 1.

Figura 1 - Linha do tempo do período de observação e detalhamento dos procedimentos realizados durante o estudo



Fonte: O autor, 2022.

3.7 Análise imunológica das amostras de saliva

As amostras foram analisadas com o objetivo de quantificar as concentrações de biomarcadores inflamatórios e fatores de crescimento nos três períodos em que houve coletas de saliva.

Para a análise, foi realizado um ensaio Multiplex no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), BioManguinhos da FIOCRUZ. O experimento mensurou os níveis dos seguintes analitos nas amostras: IL-1 α ; IL-1 β ; IL-4; IL-6; IL-17; IL-18; IL-1R α ; IL-8; GRO α ; MIG; MIP1 α ; IFN α 2; IFN γ ; TNF α ; TRAIL; bFGF; GCSF; MCSF; e PDGFBB. O kit utilizado para o experimento foi o Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Screening Panel, 48-Plex (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Estados Unidos) (Figura 2).

Cerca 50µl de cada amostra foram analisados utilizando o kit em um analisador multiplex (Bio-plex 200®, Luminex® xMAP™ technology, MiraiBio, Alameda, CA, Estados Unidos), com o software Xponent 3.1 (Luminex Corporation, Austin, Texas, Estados Unidos) de acordo com as instruções da fabricante.

Figura 2 - Kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Screening Panel, 48-Plex.



Fonte: O autor, 2022.

3.7.1 Preparação inicial

O mapeamento dos poços ocupados por cada amostra foi realizado durante os preparativos para o experimento.

As amostras de saliva foram descongeladas e recentrifugadas a 3.800 rpm, por 10 minutos a -4°C (Fanem® - 280R, Guarulhos, São Paulo, Brasil), para remoção de possíveis partículas. Em seguida, os sobrenadantes sem diluição foram colocados em microplacas de 96 poços (Costar, Corning Inc., NY, Estados Unidos) que não pertenciam aos kits, para facilitar a pipetagem no momento da montagem das placas de ensaio. Os reagentes dos kits foram previamente deixados em temperatura ambiente.

3.7.2 O experimento

O fluxograma do ensaio seguiu de modo idêntico ao descrito no manual de análise.

Os 96 poços de cada placa foram pré-umedecidos individualmente com 100µl/poço de tampão de ensaio (Assay Buffer). Após 10 minutos, o tampão foi removido cuidadosamente, sob certificação de que nenhum resíduo permaneceu (invertendo as placas e as secando com leves batidas em papel absorvente). A reconstituição do controle e do padrão (Standard) foi realizada adicionando 250 µl do diluente padrão HB (Standard Diluente HB) nos respectivos frascos. Ambos foram agitados no vórtex e incubados no gelo por 30 minutos. Após esse tempo, foi realizada uma diluição em série do padrão, de modo a obter uma curva padrão (Standard Curve) de oito pontos. Para isso, foram adicionados 0 µl do diluente padrão HB ao tubo S1, e 150µl aos tubos S2-S8 e branco (Blank); foram então transferidos 250 µl do padrão reconstituído para o tubo S1 e depois foi diluído serialmente do S1 ao S8, através da transferência de 50 µl entre os tubos.

As microesferas (Coupled Beads) foram diluídas para a concentração de 1x, adicionando 570µl de microesferas concentradas (10x Beads) a 5.130µl do tampão de ensaio e agitadas no vórtex. Após esse preparo, foram adicionados 50 µl/poço de microesferas em todos os poços. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes, com 100 µl/poço de tampão de lavagem (Wash Buffer) utilizando uma placa magnética de lavagem manual (Bio-Plex Handheld Magnetic Washer, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, Estados Unidos).

Seguindo o mapa da placa definido anteriormente, foram adicionados aos poços correspondentes: Placa 1 e 2 - 50 µl/poço de padrões pré-diluídos do S1-S8, branco, controles 1 e 2 e amostras de soro não diluídas. As placas foram cobertas com folhas adesivas e incubadas, protegidas da luz, em temperatura ambiente por 30 minutos em um agitador orbital digital para microplaca MTS 2/4 (IKA, Wilmington, NC, Estados Unidos), a 800 rpm.

Figura 3 - Agitador orbital digital para microplaca MTS
2/4. IKA, Wilmington, NC, EUA.



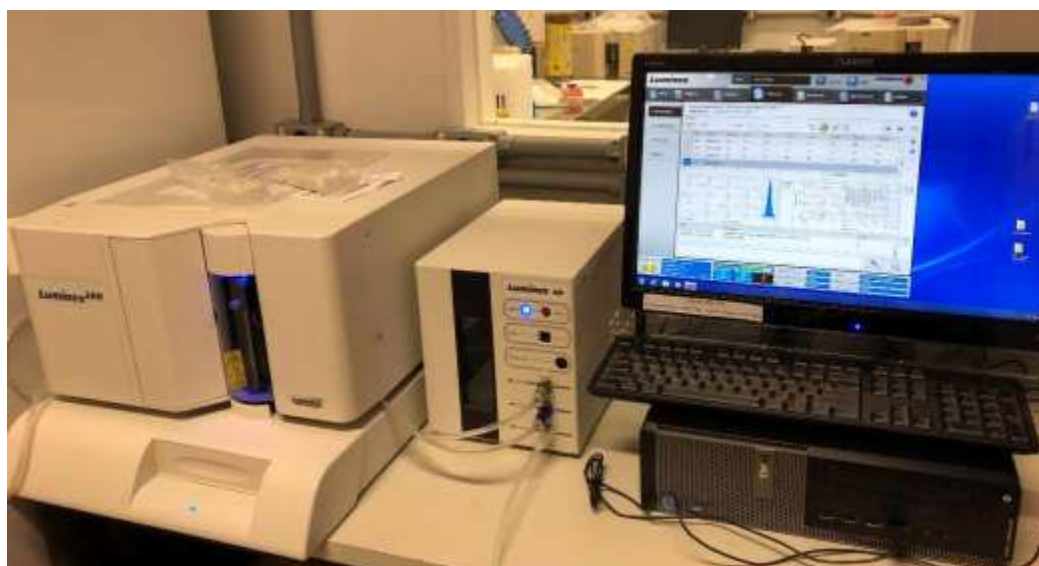
Fonte: O autor, 2022.

Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com 100 µl/poço de tampão de lavagem, utilizando uma placa magnética de lavagem manual. O anticorpo de detecção (10x) (Detection Antibodies) foi ajustado para a concentração de 1x, utilizando o diluente de anticorpo de detecção HB (Detection Antibody Diluente HB). Para isso, foram adicionados 300µl de anticorpo a 2.700µl de diluente. Após essa diluição, 20 µl/poço de anticorpos de detecção foram adicionados em todos os poços e as placas foram cobertas com folhas adesivas e incubadas, protegidas da luz, em temperatura ambiente com agitação de 800 rpm por 30 minutos.

Após esse tempo, os poços foram lavados três vezes com 100 µl/poço de tampão de lavagem, utilizando uma placa magnética de lavagem manual. A estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente ficoeritrina (SA-PE) (100x) foi ajustada para a concentração de 1x, utilizando o tampão de ensaio. Foram adicionados 60µl de SA-PE a 5.940µl de tampão de ensaio. Após essa diluição, foram adicionados 50µl/poço de SA-PE em todos os poços e as microplacas foram cobertas com folhas adesivas e incubadas, protegidas da luz, em temperatura ambiente, com agitação de 800 rpm por 10 minutos. Em seguida, três lavagens foram realizadas com 100µl/poço de tampão de lavagem para remoção dos reagentes não aderidos.

Após as lavagens, 100µl/poço de tampão de ensaio foram adicionadas as placas e essas foram incubadas durante a noite (16-18 horas) a 4°C, protegidas da luz. No dia seguinte, as placas foram colocadas em um agitador orbital digital para microplaca MTS 2/4, com agitação de 800 rpm, por 10 minutos, para ressuspender o conteúdo dos poços. Por fim, as placas foram lidas em um analisador multiplex (Bio-plex 200®, Luminex® xMAP™ technology, MiraiBio, Alameda, CA, Estados Unidos) (Figura 4 e 5). As concentrações das amostras desconhecidas foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o software Xponent 3.1 (Luminex Corporation, Austin, Texas, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis dos biomarcadores foram apresentados em quantidade total de picograma por ml (pg/ml).

Figura 4 - Analisador Multiplex Bio-plex 200®, Luminex® conjugado ao software



Fonte: O autor, 2022.

Figura 5 - Analisador Multiplex Bio-plex 200®, Luminex®.



Fonte: O autor, 2022.

3.8 Avaliação do desfecho clínico dos pacientes

A análise imunológica supracitada foi realizada ao final do T5, no último trimestre de 2019, e após esse período os pacientes foram incluídos em um programa de assistência odontológica para preservação da saúde bucal e orientados para que contactassem a equipe no surgimento de quaisquer dúvidas.

Durante todo o ano de 2020 as medidas de contingência do SARS-CoV-2 foram implementadas, e, portanto, somente houve atendimentos clínicos nos casos de urgência. Após a amenização das medidas de restrição, os acompanhamentos clínicos periódicos foram retomados e foram normalizados integralmente no primeiro trimestre de 2021. Todos os pacientes foram contactados e convidados a uma consulta de acompanhamento. Devido às medidas de biossegurança, os atendimentos precisaram ser diluídos ao longo de 2021. Alguns participantes optaram por não retornar às consultas por causa da pandemia vigente.

De todos os contactados, 24 foram constatados vivos, e desses, apenas 18 foram clinicamente assistidos. Os outros seis confirmaram seu estado de saúde e foram orientados que entrassem em contato caso precisassem ou quisessem atendimento. Para esses pacientes, a média de tempo que compreendeu o intervalo entre o T0 até a consulta de retorno foi de 26,5 meses ($\pm 5,7$), sendo que o tempo mínimo que um paciente aguardou foram 17 meses e o máximo foram 36 meses.

De todos os contactados, para 24 pacientes foi obtida a informação de que haviam evoluído à óbito. As informações foram confirmadas consultando os prontuários eletrônicos do hospital de origem. Aos que não possuíam registro, a família foi contactada novamente e questionada a respeito da causa da morte. Todas os falecimentos ocorreram em virtude do câncer uma vez diagnosticado. O levantamento da mortalidade foi atualizado em junho de 2022, confirmando o total de óbitos.

A partir disso, foram formados dois grupos em função da sobrevida: vivos ($n=24$), e falecidos ($n=24$).

No início de julho de 2022 as informações dos biomarcadores salivares analisados foram exploradas de modo a identificar o comportamento dos mesmos e traçar um possível perfil imunológico considerando a sobrevida. Todas as informações de todos os pacientes compuseram um banco de dados que foi importado para um software de análise estatística.

3.9 Análise estatística

Os dados foram importados para o programa IBM SPSS Statistics 26.0 (SPSS, IBM Corp. New York, USA) e convertidos em variáveis nominais, ordinais e escalares. Os registros clínicos e as concentrações dos biomarcadores foram analisados como variáveis escalares. Os dados demográficos e informações adicionais foram analisados como variáveis nominais e ordinais.

Para aferição da normalidade dos dados, o teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors foi executado, atestando a distribuição não normal para as informações de todos os biomarcadores nos três momentos analisados. Os dados de distribuição não normal foram representados pelas medianas e intervalos interquartis. Alguns dados demográficos e clínicos gerais apresentaram distribuição normal e foram representados pelas médias aritméticas e desvios padrões. O teste Qui-quadrado de Pearson foi executado para aferição de diferenças

para as variáveis categóricas entre os grupos, incluindo os graus de MO apresentados. Para todos os testes o nível de significância estatística considerada foi de 5% ($p \leq 0,05$), e intervalo de confiança de 95%.

Os dados periodontais apresentaram distribuição não normal e foram analisados através do teste de Mann-Whitney para avaliação das diferenças intergrupo nos períodos T0 e T5. O teste de Wilcoxon foi utilizado para a análise das diferenças intragrupo nos mesmos períodos.

Especialmente para as concentrações dos biomarcadores inflamatórios e fatores de crescimento, o teste não-paramétrico de Friedman para amostras relacionadas foi executado para testar as diferenças intragrupo ao longo dos três períodos analisados. Uma análise post-hoc por pairwise foi executada para as variâncias que mostraram significância estatística visando identificar o momento em que houve significância na variação, e para ajustar os valores de p através das correções de Bonferroni. O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes testou diferenças intergrupo.

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos

Para controle de possíveis interferências que o estado de saúde bucal e as alterações orais ocorridas durante a radioterapia pudessem exercer sobre as concentrações dos biomarcadores observadas, os indivíduos foram categorizados de acordo com histórico de tratamento odontológico prévio à RdT, estado de saúde bucal e periodontal, regime de laserterapia para prevenção e tratamento de MO, severidade de MO apresentada, e sialometria. Outras variáveis pertinentes ao estado de saúde do paciente também foram testadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de pacientes do sexo masculino; pacientes com histórico de tabagismo e etilismo; portadores de Diabetes Mellitus e Hipertensão arterial; diagnosticados com CEC; pacientes submetidos à quimioterapia adjuvante; e regimes de intervenção odontológica e laserterápica durante a RdT em pacientes vivos e falecidos.

Variável		Vivos (n=24)	Falecidos (n=24)	Valor p
Sexo masculino		16	16	1,0
Histórico de tabagismo		16	19	0,3
Histórico de etilismo		5	7	0,5
Diabetes Mellitus		4	3	0,7
Hipertensão Arterial		13	8	0,15
Diagnóstico CEC		21	24	0,07
Quimioterapia adjuvante		12	20	0,01♦
Tratamento odontológico prévio à radioterapia		18	14	0,2
Laserterapia de Baixa Intensidade	1J	16	15	0,7
	0,24J	8	9	

Legenda: CEC – Carcinoma de células escamosas

♦ Diferença estatisticamente significativa

Fonte: o autor, 2022.

Foi observada uma frequência maior de pacientes submetidos à quimioterapia adjuvante naqueles falecidos ($p=0,01$).

Para a sialometria, foi observada uma redução estatisticamente significativa para ambos os grupos em relação ao T0 ($p=0,000$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Média (+DP) da idade, dose de radiação, sialometria no T0 e T5, e CPOD em pacientes vivos e falecidos.

Variável	Vivos (n=24)	Falecidos (n=24)	Valor p
Idade média	54,7 ± 11,8	57,8 ± 9,0	0,3
Dose de Radiação (Gy)	68,2 ± 3,8	67,0 ± 3,9	0,8
Sialometria T0 (ml/min)	0,42 ± 0,26	0,40 ± 0,31	0,6
Sialometria T5 (ml/min)	0,14 ± 0,22‡	0,16 ± 0,20‡	0,9
CPOD	18,6 ± 5,9	21,2 ± 7,5	0,6

Legenda: CPOD – Dentes cariados perdidos ou obturados

‡ redução estatisticamente significativa em relação ao T0

Fonte: O autor, 2022.

4.2 Dados periodontais

Para os dois grupos, houve um aumento estatisticamente significativo da porcentagem de sítios com profundidade de bolsa (PBS) ≤ 3 mm, bem como uma redução estatisticamente significativa dos sítios com PBS ≥ 6 mm. Para os sítios com nível de inserção clínica (NIC) ≤ 3 mm também se observou um aumento estatisticamente significativo, ao passo que houve uma redução estatisticamente significativa dos sítios com nível de inserção clínica ≥ 6 mm. Não foram observadas diferenças intergrupo quanto aos parâmetros periodontais e evolução clínica (Tabela 3).

Tabela 3 - Mediana e intervalo interquartil dos parâmetros periodontais no T0 e T5.

Variável	Período	Vivos (n=24)	Falecidos (n=24)	Valor p
IBV (%)	T0	72,5 (32,4)	75 (22,7)	0,4
	T5	41 (27)*	46 (43)*	0,9
		<i>p= 0,000</i>	<i>p=0,000</i>	
ISS (%)	T0	51 (33,7)	42,8 (43,8)	0,3
	T5	35,4 (25)*	28,5 (20)*	0,5
		<i>p=0,000</i>	<i>p=0,002</i>	
PBS ≤3 mm (%)	T0	85,5 (24)	84,5 (27)	0,6
	T5	86,5 (23)*	88 (12)*	0,3
		<i>p= 0,001</i>	<i>p= 0,001</i>	
PBS 4-5 mm (%)	T0	14,5 (14)	13 (11)	0,3
	T5	13 (18)	12 (10)	0,2
		<i>p=0,7</i>	<i>p=0,06</i>	
PBS ≥ 6 mm (%)	T0	2 (6)	1,50 (10)	0,5
	T5	0 (0)*	0 (1)*	0,7
		<i>p=0,003</i>	<i>p=0,001</i>	
NIC ≤3 mm (%)	T0	49 (44)	51 (37)	0,7
	T5	61 (44)*	58 (39)*	0,7
		<i>p=0,003</i>	<i>p=0,002</i>	
NIC 4-5 mm (%)	T0	27 (22)	31 (23)	0,8
	T5	28 (30)	33 (23)	0,6
		<i>p=0,1</i>	<i>p=0,1</i>	
NIC ≥ 6 mm (%)	T0	15 (26)	19 (16)	0,3
	T5	5 (24)*	13 (17)*	0,2
		<i>p=0,008</i>	<i>p=0,01</i>	

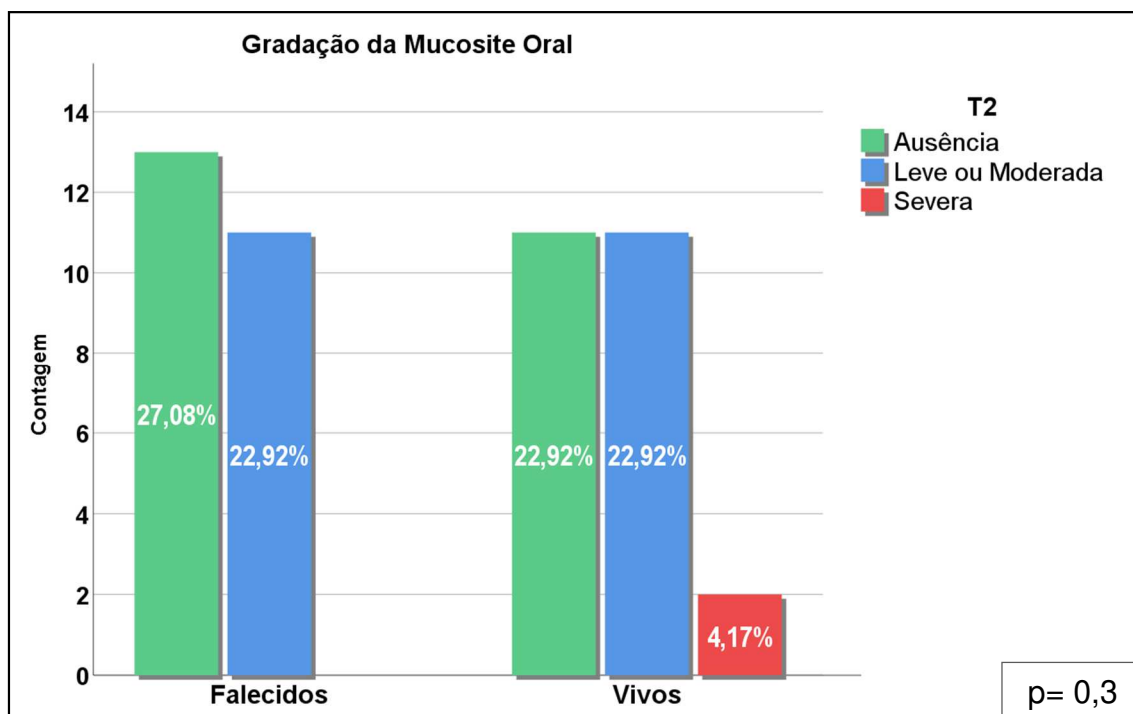
Legenda: *Alteração estatisticamente significativa em relação ao T0.

Fonte: O autor, 2022.

4.3 Avaliação da severidade de mucosite oral radioinduzida

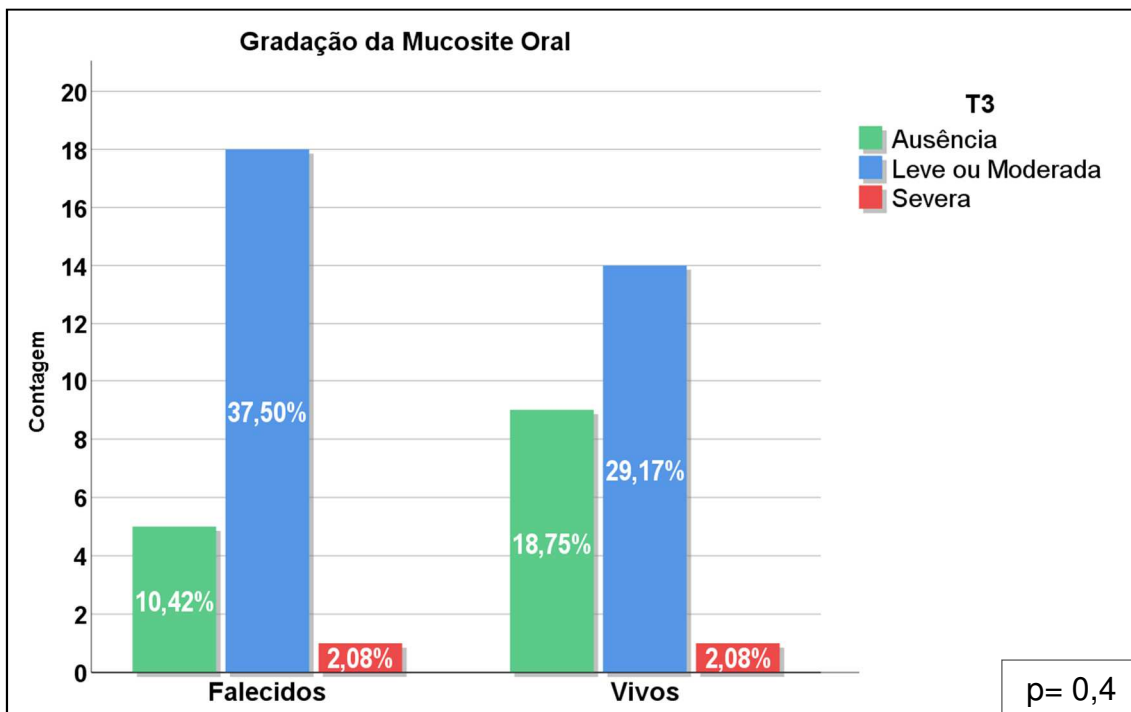
Em nenhum dos três períodos constatou-se diferenças entre as severidades das lesões; portanto, a manifestação de MO foi igual para ambos os grupos e não interferiu estatisticamente nas comparações dos níveis dos biomarcadores inflamatórios e fatores de crescimento.

Gráfico 1 - Gradação da Mucosite oral no período T2 para ambos os grupos (n=48): porcentagem de pacientes apresentando Ausência de mucosite; Mucosite leve ou moderada; ou Mucosite Severa



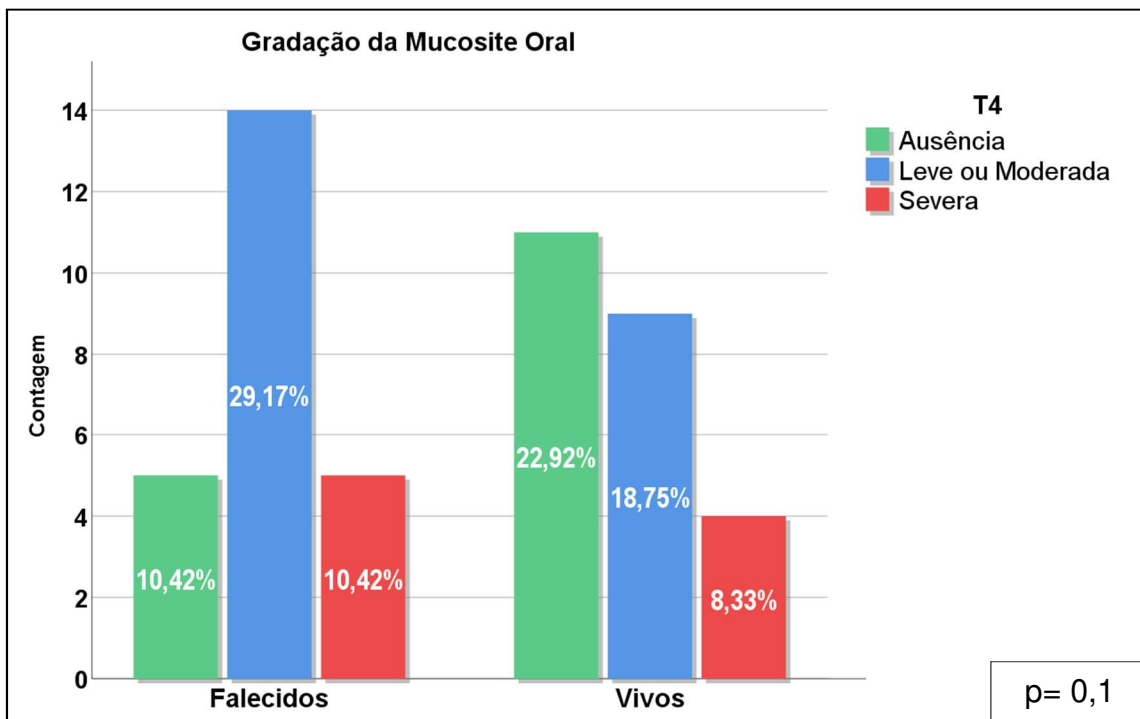
Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 2 - Gradação da Mucosite oral no período T3 para ambos os grupos (n=48): porcentagem de pacientes apresentando Ausência de mucosite; Mucosite leve ou moderada; ou Mucosite Severa.



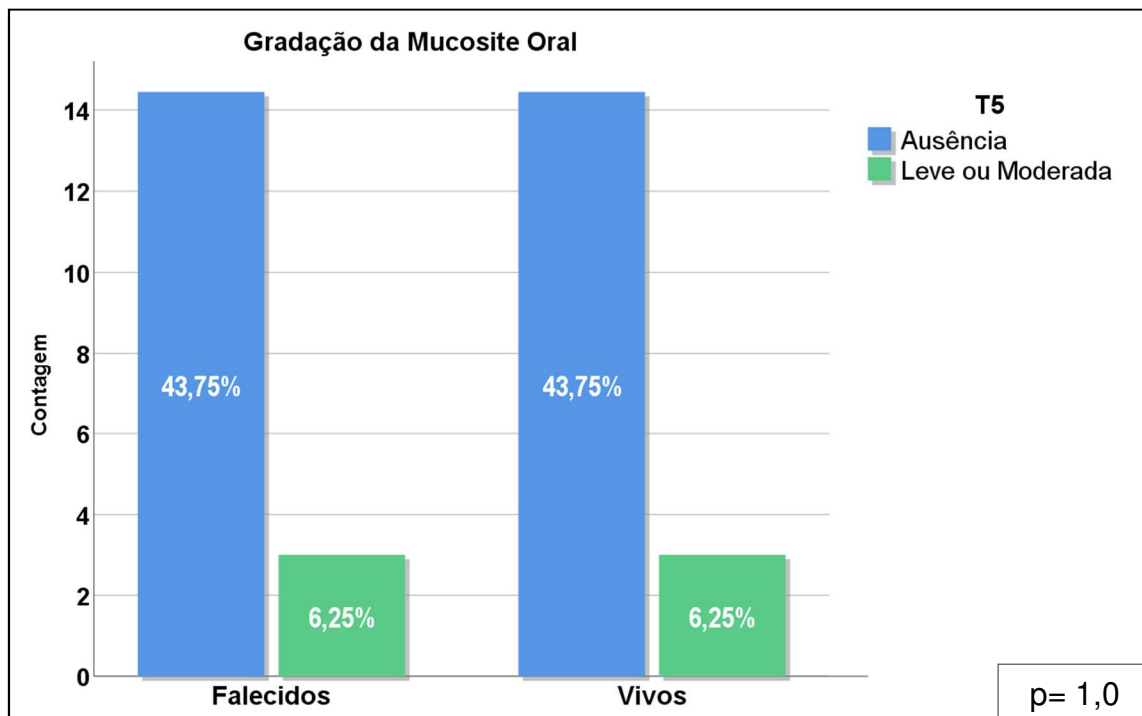
Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 3 - Gradação da Mucosite oral no período T4 para ambos os grupos (n=48): porcentagem de pacientes apresentando Ausência de mucosite; Mucosite leve ou moderada; ou Mucosite Severa.



Fonte: O autor, 2022

Gráfico 4 - Gradação da Mucosite oral no período T5 para ambos os grupos (n=48): porcentagem de pacientes apresentando Ausência de mucosite; Mucosite leve ou moderada; ou Mucosite Severa.



Fonte: O autor, 2022.

4.4 Média de tempo de sobrevida após o T5

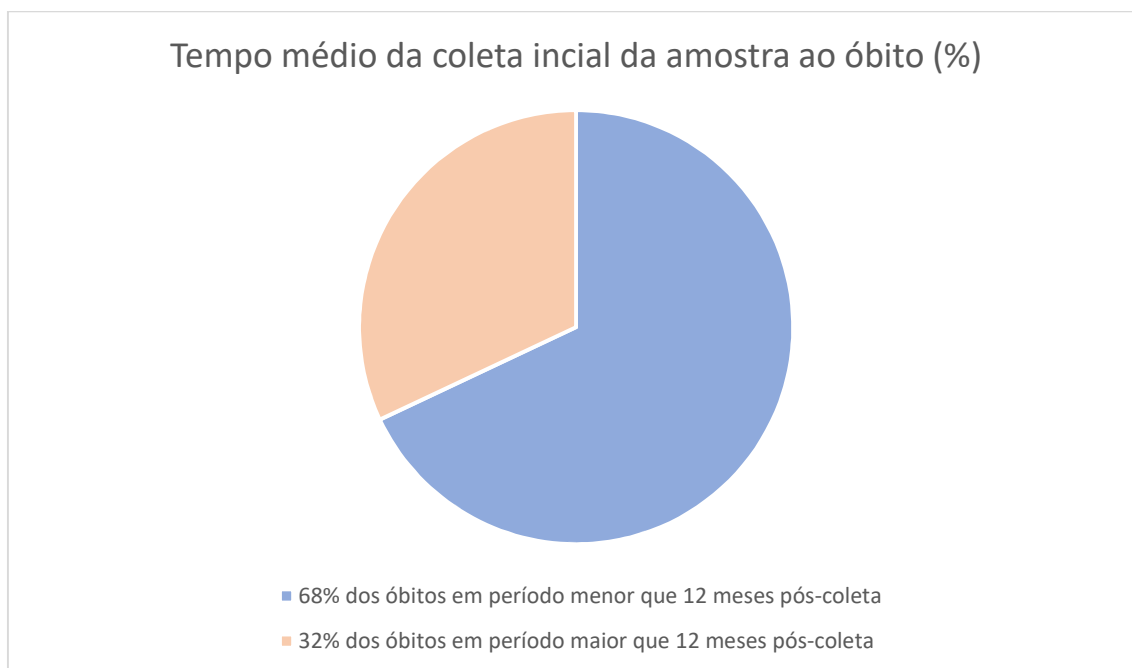
As informações de sobrevida dos pacientes foram coletadas de março de 2021 até junho de 2022, e as análises retrospectivas em função da mortalidade foram executadas em julho de 2022. A maioria dos óbitos ocorreu durante o primeiro ano após a primeira coleta de saliva (Gráfico 5).

Tabela 4 - Média de tempo de sobrevivência em relação ao T0 (+DP) para os pacientes falecidos.

Tempo do T0 ao óbito	Tempo mínimo	Média de tempo	Tempo máximo
	3 meses	11, 5 meses ($\pm$ 8,1)	32 meses

Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 5 - Frequência de óbitos em função do T0

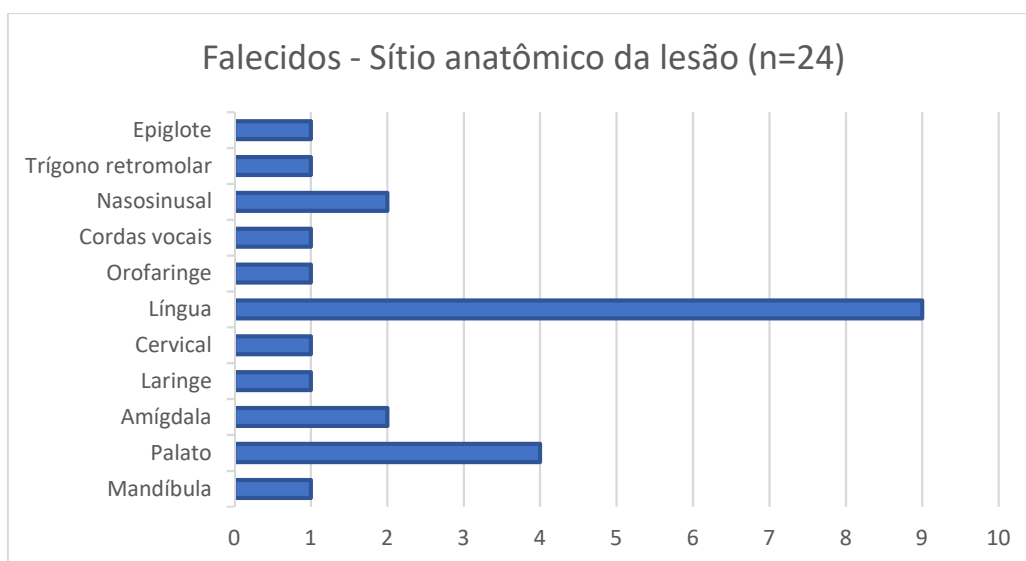


Fonte: O autor, 2022.

4.5 Sítio do tumor primário

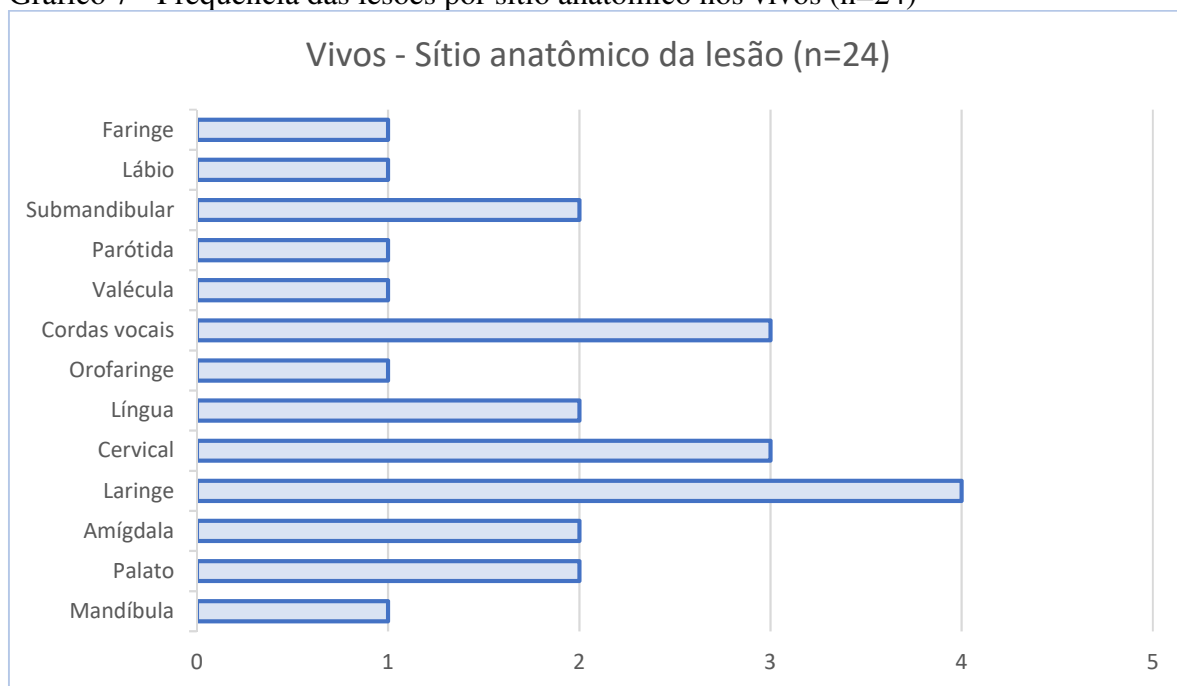
Enquanto para os falecidos o sítio anatômico mais frequente foi a língua (37,5%), para os vivos foi a laringe (16,7%) (Gráficos 6 e 7).

Gráfico 6 - Frequência das lesões por sítio anatômico nos falecidos (n=24)



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 7 - Frequência das lesões por sítio anatômico nos vivos (n=24)



Fonte: O autor, 2022.

4.6 Análise dos biomarcadores salivares

4.6.1 Interleucinas pró-inflamatórias

A análise retrospectiva da variação da concentração das interleucinas pró-inflamatórias nos três períodos mostrou que no grupo dos pacientes vivos houve variâncias estatisticamente significantes para todas as interleucinas analisadas (Tabela 5). Os biomarcadores que apresentaram um padrão de alteração dos níveis formado pelo aumento estatisticamente significativo seguido pela redução estatisticamente significativa foram a IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17 e IL-18. Nenhuma interleucina apresentou significância em sua variação para o grupo dos pacientes que faleceram. Para a IL-4 constatou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos no T5.

Tabela 5 - Interleucinas pró-inflamatórias salivares nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos.

Biomarcador (pg/ml)	Período	Vivos (n=24)	Falecidos (n=24)	Valor p
IL-1 α	T0	18,9 (236,3)	61,7 (336,7)	p=0,8
	T3	170,8 (162,8) *	205,9 (258,2)	p=0,6
	T5	28,1 (135,4)	43,6 (167,8)	p=0,5
	Variância (p=valor)	p=0,008	p=0,7	
IL-1 β	T0	7,3 (81,8)	2,8 (82,8)	p=0,7
	T3	82,5 (241,2) *	21,4 (89,9)	p=0,2
	T5	5,5 (19,2) Δ	7,3 (31,2)	p=0,1
	Variância (p=valor)	p=0,008	p=0,3	
IL-4	T0	0,7 (0,1)	0,7 (0,4)	p=0,2
	T3	0,9 (0,4) *	1,0 (0,8)	p=0,9
	T5	0,5 (0,3) Δ	0,7 (0,6)	p=0,05$^\diamond$
	Variância (p=valor)	p=0,001	p=0,3	
IL-6	T0	11,4 (72,3)	1,8 (350,7)	p=0,7
	T3	106,4 (547,6) *	16,0 (137,1)	p=0,07
	T5	1,7 (12,1) Δ	3,6 (41,3)	p=0,2
	Variância (p=valor)	p=0,001	p=0,1	
IL-17	T0	1,5 (2,1)	1,5 (2,9)	p=0,5
	T3	3,2 (1,4) *	3,2 (2,9)	p=0,8
	T5	1,0 (1,3) Δ	1,6 (3,3)	p=0,3
	Variância (p=valor)	p=0,002	p=0,1	
IL-18	T0	9,2 (47,2)	3,1 (62,8)	p=0,9
	T3	43,5 (42,6)	25,9 (42,3)	p=0,3
	T5	8,6 (14,9) Δ	10,0 (28,4)	p=0,5
	Variância (p=valor)	p=0,03	p=0,5	

Legenda: *aumento estatisticamente significativo Δ redução estatisticamente significativo

$^\diamond$ diferença estatisticamente significativa intergrupo.

Fonte: O autor, 2022

4.6.2 Interleucina anti-inflamatória & Quimiocinas

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e na variação intragrupo da concentração da única interleucina com propriedades anti-inflamatórias avaliada. (Tabela 6).

Tabela 6 - Interleucina anti-inflamatória salivar nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos.

Biomarcador (pg/ml)	Período	Vivos (n=24)	Falecidos (n=24)	Valor p
IL-1R α	T0	3291,6 (8509,2)	2306,2 (8744,5)	p=0,6
	T3	7454,4 (7550,0)	4513,9 (7388,8)	p=0,1
	T5	3437,8 (3000,7)	2757,3 (7413,6)	p=0,9
	Variância (p=valor)	p=0,06	p=0,5	

Fonte: O autor, 2022

Dentre as quimiocinas pode ser observada uma redução estatisticamente significativa para o GRO α em relação ao T3 e ao T0, e para o MIG em relação somente ao T0 (Tabela 7).

Tabela 7 - Quimiocinas salivares nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos.

Biomarcador (pg/ml)	Período	Vivos (n=24)	Falecidos (n=24)	p=valor
IL-8	T0	176,8 (767,7)	84,4 (1499,0)	p=0,8
	T3	900,7 (1761,23)	461,8 (826,4)	p=0,2
	T5	130,5 (211,6)	174,9 (473,8)	p=0,3
	Variância (p=valor)	p=0,06	p=0,06	
GRO α	T0	736,9 (650,5)	649,2 (194,9)	p=0,9
	T3	1063,5 (1683,0)	393,6 (1009,3)	p=0,3
	T5	279,7 (420,0) $\Delta\ddagger$	357,9 (730,4)	p=0,6
	Variância (p=valor)	p=0,01	p=0,6	
MIG	T0	1156,9 (1976,3)	1325,3 (8770,3)	p=0,06
	T3	1438,6 (2678,8)	572,6 (2873,5)	p=0,4
	T5	350,6 (566,8) $\Delta\ddagger$	616,2 (1565,2) $\ddagger$	p=0,1
	Variância (p=valor)	p=0,000	p=0,6	
MIP1 α	T0	1,1 (1,2)	0,65 (0,5)	p=0,5
	T3	4,0 (9,3)	4,5 (7,7)	p=0,9
	T5	0,65 (0,7)	0,7 (0,6)	p=0,5
	Variância (p=valor)	p=0,06	p=0,07	

Legenda: Δ redução estatisticamente em relação ao T3

$\ddagger$ redução estatisticamente significativa em relação ao T0.

Fonte: O autor, 2022

4.6.3 Citocinas pró-inflamatórias

Sobre as citocinas pró-inflamatórias, a análise mostrou que no grupo dos pacientes vivos houve variâncias estatisticamente significantes para as citocinas IFN α 2, TNF α e TRAIL, esta última apresentando somente uma redução significativa em relação ao T0. O grupo dos pacientes

falecidos mostrou significância na variação do IFN α 2 e IFN γ , ambas somente com aumento significativo em relação ao T0. O TNF α também apresentou concentração estatisticamente menor no grupo dos vivos no T5 (Tabela 8).

Tabela 8 - Citocinas pró-inflamatórias salivares nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos

Biomarcador (pg/ml)	Período	Vivos (n=24)	Falecidos (n=24)	Valor p
IFN α 2	T0	3,7 (3,7)	3,7 (5,2)	p=0,8
	T3	8,2 (3,3) *	7,7 (5,6) *	p=0,8
	T5	3,7 (2,5) Δ	4,3 (4,3)	p=0,1
	Variância (p=valor)	p=0,004	p=0,03	
IFN γ	T0	29,4 (27,3)	27,1 (32,6)	p=0,65
	T3	43,1 (35,8)	49,9 (37,0) *	p=0,62
	T5	31,9 (16,7)	32,5 (22,2)	p=0,65
	Variância (p=valor)	p=0,1	p=0,02	
TNF α	T0	3,7 (11,3)	3,5 (12,3)	p=0,9
	T3	14,7 (53,9) *	11,6 (21,0)	p=0,3
	T5	2,6 (2,7) Δ	6,8 (10,7)	p=0,02[♦]
	Variância (p=valor)	p=0,000	p=0,09	
TRAIL	T0	160,0 (200,9)	153,7 (373,4)	p=0,6
	T3	144,5 (247,1)	136,9 (98,9)	p=0,9
	T5	103,9 (41,6) $\ddagger$	126,7 (139,7)	p=0,06
	Variância (p=valor)	p=0,01	p=0,09	

Legenda: * aumento estatisticamente significativo

Δ redução estatisticamente em relação ao T3

$\ddagger$ redução estatisticamente significativa em relação ao T0

[♦] diferença estatisticamente significativa intergrupo

Fonte: O autor, 2022.

4.6.4 Fatores de crescimento

O fator de crescimento bFGF apresentou variação com aumento estatisticamente significativo em relação ao T0 somente para os vivos. O GCSF apresentou variação com redução significativa em relação ao T3, também somente nos vivos, além de mostrar diferença estatisticamente significativa entre os grupos no T5 (Tabela 9).

Tabela 9 - Fatores de crescimento salivares nos períodos T0, T3 e T5 em pacientes vivos e falecidos.

Biomarcador (pg/ml)	Período	Vivos (n=24)	Falecidos (n=24)	Valor p
bFGF	T0	8,4 (5,8)	9,3 (3,4)	p=0,3
	T3	13,2 (8,1) *	12,8 (9,2)	p=0,5
	T5	7,9 (5,1)	8,9 (7,0)	p=0,1
	Variância (p=valor)	p=0,02	p=0,2	
GCSF	T0	56,9 (74,3)	49,9 (356,22)	p=0,2
	T3	92,5 (412,6)	81,1 (252,5)	p=0,1
	T5	37,8 (29,6) Δ	60,4 (82,8)	p=0,04♦
	Variância (p=valor)	p=0,01	p=0,4	
MCSF	T0	6,9 (98,0)	1,5 (100,7)	p=0,6
	T3	16,1 (37,6)	13,2 (35,2)	p=0,4
	T5	3,0 (11,8)	4,7 (38,9)	p=0,1
	Variância (p=valor)	p=0,06	p=0,2	
PDGFBB	T0	17,3 (16,0)	17,3 (17,4)	p=0,3
	T3	30,1 (26,0)	26,0 (38,7)	p=0,9
	T5	17,3 (21,7)	23,1 (68,6)	p=0,2
	Variância (p=valor)	p=0,07	p=0,4	

* aumento estatisticamente significativo

Δ redução estatisticamente em relação ao T3

♦ diferença estatisticamente significativa intergrupo

Fonte: O autor, 2022

5 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar as variações de biomarcadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes com CCP submetidos à RdT, correlacionando com a sobrevida registrada. Os resultados nos pacientes vivos indicaram que para a maioria dos marcadores ocorreu um aumento significativo no T3, seguido de uma redução significativa no T5.

A mortalidade dos pacientes foi o fator de agrupamento dos indivíduos desta pesquisa. Os dados referentes à data de falecimento bem como a confirmação de que o óbito ocorreu em virtude do câncer foram precisamente recuperados pelos registros hospitalares ou através de contato com familiares. Assim, na conclusão da atualização dos estados de saúde formaram-se dois grupos distintos contendo 24 pacientes constatados vivos, e 24 pacientes falecidos confirmados. A partir disso, todos os dados demográficos, clínicos e das concentrações dos biomarcadores foram divididos entre os grupos e analisados estatisticamente, objetivando traçar um perfil imunológico de resposta imunoinflamatória e correlacioná-la com o desfecho do paciente após o período de acompanhamento.

As respostas imunológicas por meio de seus efetores celulares e moleculares são importantes regentes dos processos envolvidos na oncogênese e na terapia radioativa. (19,71) Clinicamente a observação desses fenômenos ocorre através de métodos laboratoriais consolidados, como a análise imunológica da saliva não estimulada, que carrega a função de ilustrar o estado de um organismo sob determinado contexto fisiológico, patológico ou terapêutico. (159,160)

Em comparação com a saliva, o plasma sanguíneo pode não ser o melhor método para leitura do perfil imunoinflamatório do microambiente tumoral, considerando que a concentração de seus biomarcadores circulantes sofre interferência da saúde sistêmica do paciente, o que dificulta que o perfil de proteínas plasmáticas represente as características celulares do tumor. (26,161) Além disso, a saliva possivelmente é mais sensível na detecção de citocinas em análises bioquímicas do tipo Luminex. (162) Assim, considerando o potencial desse fluido em descrever a imunologia do microambiente tumoral (26,28,29,163), é provável que as concentrações dos analitos observadas neste estudo tenham espelhado os processos celulares ocorridos nele.

A literatura se mostra escassa quando se trata de estudos que monitoram os níveis salivares de citocinas, quimiocinas e outros produtos celulares durante o tratamento radioterápico de cabeça e pescoço, e os estudos existentes, em sua maioria, não associam esses níveis com as características da doença ou do tratamento. Ainda assim, é nítido que existe um esforço científico em encontrar biomarcadores com especificidade para o CCP visando o diagnóstico da doença.

Nesse sentido, uma revisão sistemática visando determinar a capacidade diagnóstica de biomarcadores salivares para o CCP, compilou estudos que abordaram o potencial de uma variedade de citocinas, proteínas, ácidos nucleicos e metabólitos para tal. (164) Dos 37 produtos celulares estudados nos estudos revisados, a IL-8 foi a única citocina que demonstrou um excelente DTA (Diagnostic Test Accuracy), e foi o biomarcador com maior frequência de avaliação dentre as publicações.

Um estudo observacional com um escopo semelhante ao presente estudo monitorou a variação de concentração de oito citocinas salivares no curso da RdT. (26) A pesquisa incluiu apenas 11 pacientes cujos tumores estavam localizados na cavidade oral, orofaringe, laringe e hipofaringe sob IMRT. As amostras foram coletadas com o auxílio de uma esponja oftálmica e em quatro momentos da RdT, ao acúmulo de 10Gy, de 20Gy, e de 30Gy. Um critério interessante utilizado no estudo foi a seleção de áreas cuja incidência de radiação foi maior - área próxima do tumor-, e áreas de menor incidência de radiação, parâmetros possíveis por conta da tecnologia de entrega da energia utilizada no estudo. Como resultado, houve uma tendência para o aumento de IL-8, IL-6, MCP-1 e TNF- α consonante ao acúmulo de energia, apontando para a existência uma possível reação inflamatória aguda induzida pela RdT.

Uma revisão integrativa (165) compilou pesquisas cujos objetivos foram quantificar os níveis de citocinas salivares de pacientes com CCP sob radioterapia. Os resultados da revisão descrevem o aumento de concentração de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-8, IL-6 e o TNF- α , durante e após a RdT, e a esse aumento de concentração alguns autores atribuem os efeitos estomatotóxicos do tratamento. (166,167)

Conhecendo as alterações orais inerentes à RdT de cabeça e pescoço e o manejo terapêutico que elas exigem nas fases pré e pós-tratamento, para fins de controle das variáveis que pudessem influenciar a leitura e interpretação dos níveis dos analitos no presente estudo, os pacientes foram categorizados de acordo com o regime de tratamento odontológico recebido antes da RdT, bem como pela dose de fluência recebida na terapia de fotobiomodulação.

No grupo dos pacientes sobreviventes (n=24), 18 foram submetidos ao tratamento odontológico sob protocolo da instituição de origem, enquanto 14 do grupo dos falecidos (n=24) receberam o mesmo protocolo. Os outros pacientes receberam tratamento odontológico via instituição externa. Efetuando o teste qui-quadrado, não houve diferença estatística para a variável tratamento odontológico ($p=0,2$). Esse fato pode ser complementado pela evolução dos parâmetros periodontais registrados, onde não houve diferenças estatísticas em nenhum dos momentos de aferição, para nenhum dos grupos.

Tendo em vista a alta prevalência de mucosite oral atrelada à RdT, os testes estatísticos categóricos mostraram que os grupos apresentaram graus de mucosite iguais em todos os períodos. Na mesma linha, para a prevenção e controle da MO, 16 pacientes do grupo dos sobreviventes receberam 1J de dose na terapia de fotobiomodulação e 8 receberam 0,24J, enquanto 15 dos falecidos receberam 1J e 9 receberam 0,24J. Apesar de dois protocolos terem sido aplicados, não se verificou diferenças estatísticas para a variável terapia de fotobiomodulação ($p=0,7$).

A análise exploratória dos níveis dos biomarcadores permitiu traçar um perfil primitivo de resposta imunoinflamatória durante o tratamento radioterápico. No T0 e T3, os grupos eram estatisticamente idênticos no que tange as concentrações observadas. Apenas no T5 observou-se uma diferença estatística para a IL-4, TNF- α e GCSF, estando respectivamente a interleucina, a citocina e o fator de crescimento com níveis mais elevados no grupo dos pacientes falecidos, indicando uma possível dificuldade desse grupo em resolver processos inflamatórios que persistiram após a RdT, o que enaltece uma provável incompetência imunológica prevalente nesses pacientes.

Para as interleucinas pró-inflamatórias, a análise de concentração dos três períodos mostrou uma variância significativa unicamente para o grupo dos sobreviventes. Enfatizando dentre elas a IL-1 β ; IL-4; IL-6 e IL-17; cuja variação mostrou um padrão de aumento de concentração estatisticamente significativa no intervalo T0 a T3; seguido de uma redução igualmente significativa do T3 ao T5. Todas essas interleucinas mantiveram o aumento e redução estatisticamente significativa mesmo após as correções de Bonferroni para o teste de Friedman.

Esse aumento dos níveis visto no T3, levando em conta os efeitos imunológicos da irradiação mencionados pela literatura (19) pode ser uma assinatura da intensa atividade de células imunes efectoras, como as células dendríticas, linfócitos T CD8 e linfócitos NK, no microambiente tumoral, considerando que a IL-1 α , IL-1 β e IL-6 são produzidas também pelas células dendríticas, e a IL-17 e IL-4 podem ser produzidas por linfócitos T CD8 e NK. (100,101,108,109,115,117,120). Para o grupo dos pacientes falecidos, a estase na variação dos biomarcadores pode ser reflexo da menor reatividade imunológica neles, o que enaltece uma possível função primordial da imunocompetência na erradicação dos tumores, uma vez que, através da análise retrospectiva, a variação da concentração dos biomarcadores foi a principal diferença constatada entre os grupos.

Em relação ao padrão de resposta dos linfócitos Th, os resultados mostraram significância na variação da citocina de assinatura dos Th2, a IL-4 (108), e dos Th17, a IL-17 (168), nos pacientes que sobreviveram; enquanto o IFN γ , citocina de assinatura dos Th1, conhecidos por dotarem capacidades antitumorais, não apresentou significância na variação. (5) Com base nisso, pode-se supor que não houve prevalência de resposta de um subtipo de Th, e que apesar da IL-4 estar associada ao subtipo com capacidades pró-tumorais, evidências com modelo animal mostram sua capacidade em mediar a morte celular neoplásica através de eosinófilos. (114)

Diversos eventos micro inflamatórios que ocorrem durante a terapia radioativa podem elucidar a interferência do sistema imunológico no controle do câncer. O presente estudo fornece evidências que apontam para a existência de uma atividade imunoinflamatória atrelada às respostas ao tratamento antineoplásico. A atuação individual de cada biomarcador pode representar uma variedade de processos distintos. Por exemplo, Khodarev et al. (128) observaram que uma superexpressão da via ativada pelo conjunto IFN/STAT1 concede radiorresistência às células tumorais, bem como resistência aos efeitos citotóxicos dos INFs. O autor propõe que a superexpressão da via IFN/STAT1 contribui para a resistência à terapia antineoplásica e aumenta a probabilidade de metastização da doença. No presente estudo o IFN γ foi a única citocina que apresentou variação estatisticamente significativa para o grupo dos pacientes falecidos ($p=0,02$). Isso pode indicar a presença do mesmo fenômeno observado por Khodarev et al. (128)

Dentre todas as citocinas, o comportamento do $\text{TNF}\alpha$ é o que melhor representa o perfil imunológico associado à sobrevida. Uma de suas funções no processo de imunedição é aprimorar a apresentação de antígenos tumorais às células imunológicas efectoras (20). No grupo dos sobreviventes seus níveis aumentaram significativamente, e após a RdT estavam em concentração menor que a observada antes da RdT, indicando que a concentração do T0 pode ter tido contribuição do microambiente tumoral, e a concentração do T5 pode estar associada tanto à resolução da inflamação ao se comparar com o T3, quanto à erradicação tumoral ao se comparar ao T0. Além disso, em conjunto com a IL-4, o $\text{TNF-}\alpha$ foi a única citocina que mostrou diferença entre os grupos no T5 ($p=0,02$), estando seus níveis estatisticamente menores no grupo dos sobreviventes. Isso ratifica e exemplifica como o monitoramento do perfil imunológico através da saliva pode ser fornecer informações cruciais a respeito da resposta à terapia antineoplásica.

Neste estudo, a variação da concentração dos biomarcadores sob influência da RdT foi capaz de formar uma curva limitada por um limiar de reação à irradiação e um limiar de resolução de inflamação, e os indivíduos que ultrapassaram, sobreviveram. Os biomarcadores que apresentaram variação que superou os limiares, ou seja, aumentaram e reduziram seus níveis de modo significativo, e mantiveram-se significativos mesmo após os ajustes post-hoc, foram: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IFN α 2 e $\text{TNF-}\alpha$. Em contrapartida a esse padrão, interessante os níveis da quimiocina MIG reduziram do T0 ao T3 no grupo dos falecidos ($p=0,06$). A literatura descreve essa quimiocina como dotada de efeitos antitumorais devido à sua capacidade em promover angioestaticidade, além disso, ela é capaz de atrair linfócitos para sítios inflamatórios, e isso corrobora para a hipótese de que existe uma provável associação entre uma resposta imune eficiente e uma melhor resposta à RdT. (136,140,143) Para os biomarcadores que apresentaram significância em algum momento da variação, mas não necessariamente o padrão supracitado, a explicação pode estar sobre o número de participantes relativamente pequeno.

O presente estudo foi conduzido com base em um banco de informações coletadas dos pacientes e oriundas das análises imunológicas das amostras de saliva, logo, o planejamento para a pesquisa foi retrospectivo, sem que houvesse cálculo amostral prévio. Assim, o número de participantes pode não ter sido suficiente para acusar diferenças estatisticamente significantes em algumas comparações. Avaliando o poder da amostra através do software G-Power, fornecendo o número de participantes pesquisa e o valor de erro α , o cálculo resulta em um poder de 70% e consequentemente valor de erro β em 30%. Isso indica que aumentando a amostra para 65 participantes, poderemos observar diferenças estatisticamente significantes que

aqui não ficaram evidentes. Ademais, o fato de que biomarcadores como o TNF- α e a IL-4 terem sido sensíveis o suficiente para acusar diferenças entre grupos apesar do poder da amostra, evidencia suas capacidades de representar o perfil imunológico esperado durante o tratamento radioterápico. Estudos futuros para validar os resultados desta pesquisa deverão realizar o cálculo amostral também com base na mortalidade da doença investigada.

Outra limitação deste estudo foi a dificuldade em se recuperar algumas informações sobre o estadiamento e extensão do tratamento cirúrgico do CCP. Sabe-se que inicialmente 22 pacientes estavam em estágio clínico III, e nenhum dos participantes encontrava-se no estágio IV, ou seja, sem metástase detectada. A mortalidade do CCP observada neste estudo (50%) pode estar associada ao estágio avançado em 46% dos pacientes. Além disso, a proporção estatisticamente maior de pacientes que foram submetidos à quimioterapia adjuvante no grupo dos falecidos endossa a presença de pacientes com estágios mais avançados nele. Uma informação precisa do estadiamento poderia complementar as interpretações acerca das variações não significativas no grupo dos falecidos e ajudar a elaborar um padrão de variação com base no estadiamento clínico.

A testagem para detecção do HPV nos tumores dos pacientes no presente estudo não foi realizada em virtude dos protocolos de diagnóstico preconizados pelo centro de onde os pacientes foram recrutados. Um estudo conduzido por Chung et al (41) estabeleceram que a detecção do HPV-16 pode representar um prognóstico mais favorável para carcinomas de células escamosas, principalmente quando localizados na orofaringe. Na mesma linha, Argiris et al (42) acrescentam que o diagnóstico de um CCP HPV-16 positivo também está associado com uma menor recorrência de metástases e uma mediana de sobrevida estatisticamente mais longa em comparação com os HPV negativos ($p=0.014$). Nesse sentido, diferenciar os diagnósticos de CCP com base da detecção da cepa viral pode contribuir também para o direcionamento de modalidade terapêutica antineoplásica de menor intensidade e toxicidade. (43).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo evidenciaram a existência de uma variação estatisticamente significativa dos níveis dos biomarcadores inflamatórios em função da radioterapia nos pacientes de câncer de cabeça e pescoço sobreviventes após o tratamento. Especialmente para os analitos: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IFN α 2 e TNF- α , cuja alteração de suas concentrações formaram uma curva significativamente ascendente entre o T0 e T3 e significativamente descendente entre o T3 e T5. Nenhum dos pacientes falecidos apresentou esse mesmo padrão de significância no aumento e redução da concentração dos biomarcadores durante a RdT.

Ainda que o presente estudo apresente limitações metodológicas, as observações aqui descritas fornecem indícios de uma possível imunorreatividade associada à eficácia da RdT e que pode contribuir para o melhor desfecho do paciente após o tratamento antineoplásico. Sobretudo, os resultados precisam de validação em estudos futuros, com amostragem maior, mais homogeneidade na seleção dos pacientes e melhor controle dos fatores de confundimento. Assim, evidências mais sólidas dos eventos imunoinflamatórios em resposta à RdT corroborarão para as observações do presente estudo, podendo endossar o monitoramento de biomarcadores inflamatórios como um possível método que auxilie na predição de prognóstico e resposta terapêutica.

REFERÊNCIAS

1. Diori Karidio I, Sanlier SH. Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. Vol. 33, Journal of the Egyptian National Cancer Institute. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Vol. 100, Cell. 2000.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, Cell. 2011. p. 646–74.
4. Katz Artur, Chammas Roger, Filho VOdone, Novis YSarkis. Tratado de Oncologia. Hoff PMGehm, editor. Vol. 1. São Paulo: Atheneu; 2013. 3–7 p.
5. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Vol. 454, Nature. 2008. p. 436–44.
6. Chow LQM. Head and Neck Cancer. Longo DL, editor. New England Journal of Medicine [Internet]. 2020 Jan 2;382(1):60–72. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1715715>
7. Argiris A, Karamouzis M V., Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. Vol. 371, The Lancet. Elsevier B.V.; 2008. p. 1695–709.
8. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Global Cancer Burden - Cancer Today [Internet]. 2020 [cited 2023 Jan 25]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>.
9. Inca. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. 2020. p. 1 Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>
10. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde, Governo Federal. Brasil - estimativa dos casos novos [Internet]. 2022 [cited 2023 Jan 25]. Available from: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/estado-capital/brasil>
11. Braakhuis BJM, Brakenhoff RH, René leemans C. Treatment choice for locally advanced head and neck cancers on the basis of risk factors: Biological risk factors. Annals of Oncology. 2012 Sep;23(SUPPL. 10).
12. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. Vol. 11, Nature Reviews Cancer. 2011. p. 9–22.
13. Ang KK, Cancer Center A, Brizel DM, Burtneess BA, Cmelak AJ, Gillison ML, et al. Head and Neck Cancers [Internet]. Vol. 9, Journal of the National Comprehensive Cancer Network Text continues. 2011. Available from: www.NCCN.org

14. Baujat B, Bourhis J, Blanchard P, Overgaard J, Ang KK, Saunders M, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy for head and neck cancer. Vol. 2010, Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2010.
15. Katz Artur, Chammas Roger, Filho VOdone, Novis YSarkis. Tratado de Oncologia. Hoff PMGehm, editor. Vol. 1. São Paulo: Atheneu; 2013. 558–572 p.
16. Elad S, Cheng KKF, Lalla R V., Yarom N, Hong C, Logan RM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2020 Oct 1;126(19):4423–31.
17. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, et al. Head and neck cancers, version 2.2020. JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network. 2020 Jul 1;18(7):873–98.
18. Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla R V., Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. Vol. 6, *Cancer Medicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 2918–31.
19. Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Kułach N. Tumor microenvironment as a “game changer” in cancer radiotherapy. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
20. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. Vol. 39, *Immunity*. 2013. p. 1–10.
21. Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self [Internet]. Available from: www.sciencemag.org
22. Ma Y, Pitt JM, Li Q, Yang H. The renaissance of anti-neoplastic immunity from tumor cell demise. Vol. 280, *Immunological Reviews*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 194–206.
23. Braakhuis BJM, Tabor MP, Leemans CR, Van Der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: Molecular techniques provide new insights and definitions. Vol. 24, *Head and Neck*. 2002. p. 198–206.
24. Jensen SB, Vissink A, Limesand KH, Reyland ME. Salivary Gland Hypofunction and Xerostomia in Head and Neck Radiation Patients. Vol. 2019, *Journal of the National Cancer Institute - Monographs*. Oxford University Press; 2019.
25. Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla R V., Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. Vol. 6, *Cancer Medicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 2918–31.
26. Citrin DE, Hitchcock YJ, Chung EJ, Frandsen J, Urick ME, Shield W, et al. Determination of cytokine protein levels in oral secretions in patients undergoing radiotherapy for head and neck malignancies [Internet]. 2012. Available from: <http://www.ro-journal.com/content/7/1/64>

27. Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN, et al. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. Vol. 26, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2011. p. 326–34.
28. Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY, et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. Vol. 46, *Oral Oncology*. 2010. p. 226–31.
29. Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. *Adv Clin Chem*. 2018 Jan 1;86:23–70.
30. Shlush LI, HersHKovitz D. Clonal Evolution Models of Tumor Heterogeneity. 2015.
31. Arneth B. Tumor microenvironment. Vol. 56, *Medicina (Lithuania)*. MDPI AG; 2020.
32. Dvorak HF. Tumors: Wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res*. 2015 Jan 1;3(1):1–11.
33. S. M, A.A. F. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016;
34. Adelstein D, Gillison ML, Pfister DG, Spencer S, Adkins D, Brizel DM, et al. NCCN guidelines® insights head and neck cancers, version 2.2017 featured updates to the NCCN guidelines. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2017 Jun 1;15(6):761–70.
35. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, et al. Head and neck cancers, version 2.2020. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2020 Jul 1;18(7):873–98.
36. Luana Poeta M, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, et al. TP53 Mutations and Survival in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck A bs t r a c t [Internet]. Available from: www.nejm.org
37. Argiris A, Eng C. Chapter 2 EPIDEMIOLOGY, STAGING, AND SCREENING OF HEAD AND NECK CANCER.
38. Chow LQM. Head and Neck Cancer. Longo DL, editor. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2020 Jan 2;382(1):60–72. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMr1715715>
39. Huang SH, O’Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. Vol. 18, *Current Treatment Options in Oncology*. Springer New York LLC; 2017.
40. Zanoni DK, Patel SG, Shah JP. Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications. Vol. 21, *Current Oncology Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2019.

41. Chung CH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, et al. p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Dec 10;32(35):3930–8.
42. Argiris A, Li S, Ghebremichael M, Egloff AM, Wang L, Forastiere AA, et al. Prognostic significance of human papillomavirus in recurrent or metastatic head and neck cancer: An analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *Annals of Oncology*. 2014;25(7):1410–6.
43. O’Sullivan B, Huang SH, Siu LL, Waldron J, Zhao H, Perez-Ordonez B, et al. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 Feb 10;31(5):543–50.
44. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: Changing epidemiology, diagnosis, and treatment. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd; 2008. p. 489–501.
45. Thompson MK, Poortmans P, Chalmers AJ, Faivre-Finn C, Hall E, Huddart RA, et al. Practice-changing radiation therapy trials for the treatment of cancer: where are we 150 years after the birth of Marie Curie? Vol. 119, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group; 2018. p. 389–407.
46. Lederman M. *Radiation Oncology*. Vol. 7. 1981.
47. Alfouzan AF. Radiation therapy in head and neck cancer. Vol. 42, *Saudi Medical Journal*. Saudi Arabian Armed Forces Hospital; 2021. p. 247–54.
48. Villa A, Sonis ST. Pharmacotherapy for the management of cancer regimen-related oral mucositis. Vol. 17, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 1801–7.
49. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2004. p. 277–84.
50. Sonis ST. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. Vol. 45, *Oral Oncology*. 2009. p. 1015–20.
51. Sonis ST. Oral mucositis. Vol. 22, *Anti-Cancer Drugs*. 2011. p. 607–12.
51. Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T. Radiation-Induced Oral Mucositis. Vol. 7, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
52. Elad S, Cheng KKF, Lalla R V., Yarom N, Hong C, Logan RM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2020 Oct 1;126(19):4423–31.
54. Bensadoun RJ, Nair RG. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. Vol. 24, *Current Opinion in Oncology*. 2012. p. 363–70.

55. de Carvalho PAG, Lessa RC, Carraro DM, Assis Pellizzon AC, Jaguar GC, Alves FA. Three photobiomodulation protocols in the prevention/treatment of radiotherapy-induced oral mucositis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Sep 1;31.
56. Oton-Leite AF, Silva GBL, Morais MO, Silva TA, Leles CR, Valadares MC, et al. Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. *Lasers Surg Med*. 2015 Apr 1;47(4):296–305.
57. Basso FG, Pansani TN, Soares DG, Scheffel DL, Bagnato VS, De Souza Costa CA, et al. Biomodulation of Inflammatory Cytokines Related to Oral Mucositis by Low-Level Laser Therapy. *Photochem Photobiol*. 2015 Jul 1;91(4):952–6.
58. Cronshaw M, Parker S, Anagnostaki E, Mylona V, Lynch E, Grootveld M. Photobiomodulation and oral mucositis: A systematic review. Vol. 8, *Dentistry Journal*. MDPI AG; 2020.
59. Marx RE, Johnson RP. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1987;64(4):379–90.
60. Curi MM, Cardoso CL, De Lima HG, Kowalski LP, Martins MD. Histopathologic and histomorphometric analysis of irradiation injury in bone and the surrounding soft tissues of the jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2016 Jan 1;74(1):190–9.
61. Chronopoulos A, Zarra T, Ehrenfeld M, Otto S. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. Vol. 68, *International Dental Journal*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 22–30.
62. Rice N, Polyzois I, Ekanayake K, Omer O, Stassen LFA. The management of osteoradionecrosis of the jaws - A review. Vol. 13, *Surgeon*. Elsevier Ltd; 2015. p. 101–9.
63. Kubota H, Miyawaki D, Mukumoto N, Ishihara T, Matsumura M, Hasegawa T, et al. Risk factors for osteoradionecrosis of the jaw in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Radiation Oncology*. 2021 Dec 1;16(1).
64. Escoda-Francolí J, Rodríguez-Rodríguez A, Pérez-García S, Gargallo-Albiol J, Gay-Escoda C. Dental implications in oral cancer patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Jul;16(4).
65. Lalla R V., Treister NS, Sollecito TP, Schmidt BL, Patton LL, Helgeson ES, et al. Radiation therapy for head and neck cancer leads to gingival recession associated with dental caries. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2022 May 1;133(5):539–46.
66. Katsura K, Sasai K, Sato K, Saito M, Hoshina H, Hayashi T. Relationship between oral health status and development of osteoradionecrosis of the mandible: A retrospective longitudinal study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2008 Jun;105(6):731–8.

67. Khaw A, Liberali S, Logan R, Keefe D, Bartold PM. Influence of periodontitis on the experience of oral mucositis in cancer patients undergoing head and neck radiotherapy: A pilot study. *Supportive Care in Cancer*. 2014;22(8):2119–25.
68. Khaw A, Logan R, Keefe D, Bartold M. Radiation-induced oral mucositis and periodontitis - proposal for an inter-relationship. *Oral Dis*. 2014;20(3).
69. Peterson LJ, Bruins HH, Koole R, Jolly DE. ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY Pretherapy dental decisions in patients with head and neck cancer A proposed model for dental decision support. Vol. 86. 1998.
70. Levi LE, Lalla R V. Dental Treatment Planning for the Patient with Oral Cancer. Vol. 62, *Dental Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2018. p. 121–30.
71. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor escape [Internet]. 2002. Available from: <http://www.nature.com/natureimmunology>
72. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. Vol. 90, *Advances in Immunology*. 2006. p. 1–50.
73. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Vol. 121, *Immunology*. 2007. p. 1–14.
74. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* [Internet]. 2001 Feb;357(9255):539–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600040460>
75. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion [Internet]. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
76. Tang S, Ning Q, Yang L, Mo Z, Tang S. Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. Vol. 86, *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V.; 2020.
77. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Vol. 1. 2018. 397–414 p.
78. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Ryan Cook, editor. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2018. 117–143 p.
79. Garg AD, Dudek AM, Agostinis P. Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: What, when, and how? Vol. 39, *BioFactors*. 2013. p. 355–67.
80. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer*. 2012. p. 298–306.
81. Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, Kirilovsky A, Bindea G, Berger A, et al. Biomolecular Network Reconstruction Identifies T-Cell Homing Factors Associated With Survival in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1429–40.

82. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 559–72.
83. Good JS, Harrington KJ. The hallmarks of cancer and the radiation oncologist: Updating the 5Rs of radiobiology. *Clin Oncol*. 2013 Oct;25(10):569–77.
84. Rubner Y, Wunderlich R, Rühle PF, Kulzer L, Werthmüller N, Frey B, et al. How does ionizing irradiation contribute to the induction of anti-tumor immunity? Vol. 2 JUL, *Frontiers in Oncology*. 2012.
85. Elad S, Cheng KKF, Lalla R V., Yarom N, Hong C, Logan RM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2020 Oct 1;126(19):4423–31.
86. Frey # B, Rubner # Y, Wunderlich R, Weiss EM, Pockley AG, Fietkau R, et al. Induction of Abscopal Anti-Tumor Immunity and Immunogenic Tumor Cell Death by Ionizing Irradiation- Implications for Cancer Therapies. Vol. 19, *Current Medicinal Chemistry*. 2012.
87. Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, Barcellos-Hoff MH, Formenti SC. The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. Vol. 2 AUG, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Research Foundation; 2012.
88. Rubner Y, Wunderlich R, Rühle PF, Kulzer L, Werthmüller N, Frey B, et al. How does ionizing irradiation contribute to the induction of anti-tumor immunity? Vol. 2 JUL, *Frontiers in Oncology*. 2012.
89. Hatscher L, Amon L, Heger L, Dudziak D. Inflammasomes in dendritic cells: Friend or foe? Vol. 234, *Immunology Letters*. Elsevier B.V.; 2021. p. 16–32.
90. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(3):862–70.
91. Herrera FG, Bourhis J, Coukos G. Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jan;67(1):65–85.
92. Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Nter G, Hämmerling J. Combination of T-Cell Therapy and Trigger of Inflammation Induces Remodeling of the Vasculature and Tumor Eradication 1 [Internet]. Vol. 62, *CANCER RESEARCH*. 2002. Available from: <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/62/5/1462/2501340/ch0502001462.pdf>
93. Lugade AA, Moran JP, Gerber SA, Rose RC, Frelinger JG, Lord EM. Local Radiation Therapy of B16 Melanoma Tumors Increases the Generation of Tumor Antigen-Specific Effector Cells That Traffic to the Tumor. *The Journal of Immunology*. 2005 Jun 15;174(12):7516–23.
94. Demaria S, Formenti SC. Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. Running Title: T-cell dependent radiation response.

95. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007 Sep;13(9):1050–9.
96. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Ryan Cook, editor. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2018. 217–217 p.
97. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. Vol. 7, *Cancer Cell*. Cell Press; 2005. p. 211–7.
98. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Vol. 27, *Annual Review of Immunology*. 2009. p. 519–50.
99. Fields JK, Günther S, Sundberg EJ. Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
100. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. Vol. 39, *Immunity*. 2013. p. 1003–18.
101. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. Vol. 157, *Cell*. Elsevier B.V.; 2014. p. 1013–22.
102. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in health and disease. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
103. Ihim SA, Abubakar SD, Zian Z, Sasaki T, Saffarioun M, Maleknia S, et al. Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
104. Esmailbeig M, Ghaderi A. Interleukin-18: a regulator of cancer and autoimmune diseases. Vol. 28, *European Cytokine Network*. John Libbey Eurotext; 2017. p. 127–40.
105. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Ryan Cook, editor. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2018. 43–69 p.
106. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Ryan Cook, editor. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2018. 83–93 p.
107. Guo B, Fu S, Zhang J, Liu B, Li Z. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Sci Rep*. 2016 Oct 27;6.
108. Brown MA, Miller J, Hural J. Functions of IL-4 and Control of Its Expression [Internet]. Vol. 37, *Critical Reviews TM in Immunology*. 2017. Available from: www.begellhouse.com
109. Ho IC, Miaw SC. Regulation of IL-4 expression in immunity and diseases. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2016. p. 31–77.
110. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Ryan Cook, editor. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2018. 232–239 p.

111. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. Cellular and Molecular Immunology. 9th ed. Ryan Cook, editor. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2018. 243–250 p.
112. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, et al. Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell*. 2007 Oct 11;1(4):389–402.
113. Falkensammer C, Jöhrer K, Gander H, Ramoner R, Putz T, Rahm A, et al. IL-4 inhibits the TNF- α induced proliferation of renal cell carcinoma (RCC) and cooperates with TNF- α to induce apoptotic and cytokine responses by RCC: Implications for antitumor immune responses. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2006 Oct;55(10):1228–37.
114. Tepper R 1, Coffman RL, Leder P, Coffman RL, Leder P. An Eosinophil-Dependent Mechanism for the Antitumor Effect of Interleukin-4 [Internet]. Vol. 140, *Cancer Immunol. Immunother*. 1988. Available from: www.sciencemag.org
115. Rincon M. Interleukin-6: From an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. Vol. 33, *Trends in Immunology*. 2012. p. 571–7.
116. Kang S, Tanaka T, Kishimoto T. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody. *Int Immunol*. 2015 Jan 1;27(1):21–9.
117. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Oct 1;6(10).
118. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. Vol. 28, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd; 2020.
119. Johnson DE, O’Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 234–48.
120. Amatya N, Garg A V., Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. Vol. 38, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 310–22.
121. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. Vol. 12, *Molecular Cancer*. 2013.
122. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. Cellular and Molecular Immunology. 9th ed. Ryan Cook, editor. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2018. 175–175 p.
123. Balkwill F. TNF- α in promotion and progression of cancer. Vol. 25, *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006. p. 409–16.
124. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? Vol. 13, *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002.

125. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and Characterization of a New Member of the TNF Family that Induces Apoptosis. Vol. 3, Immunity. 1995.
126. Von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. Vol. 17, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2017. p. 352–66.
127. Walczak H, Miller R, Ariail K, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor–related apoptosis–inducing ligand in vivo. [cited 2023 Jan 26]; Available from: https://www.nature.com/articles/nm0299_157
128. Khodarev NN, Roach P, Pitroda SP, Golden DW, Bhayani M, Shao MY, et al. STAT1 pathway mediates amplification of metastatic potential and resistance to therapy. PLoS One. 2009 Jun 8;4(6).
129. Khodarev NN, Minn AJ, Efimova E V., Darga TE, Labay E, Beckett M, et al. Signal transducer and activator of transcription 1 regulates both cytotoxic and prosurvival functions in tumor cells. Cancer Res. 2007 Oct 1;67(19):9214–20.
130. Zhou F. Molecular mechanisms of IFN- γ to up-regulate MHC class i antigen processing and presentation. Vol. 28, International Reviews of Immunology. 2009. p. 239–60.
131. Cardoso Alves L, Corazza N, Micheau O, Krebs P. The multifaceted role of TRAIL signaling in cancer and immunity. Vol. 288, FEBS Journal. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 5530–54.
132. Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B, Weichselbaum RR. STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells [Internet]. 2004. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0308102100
133. Hui Z, Tretiakova M, Zhang Z, Li Y, Wang X, Zhu JX, et al. Radiosensitization by Inhibiting STAT1 in Renal Cell Carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009 Jan 1;73(1):288–95.
134. Zhu H, Wang Z, Xu Q. Inhibition of STAT1 sensitizes renal cell carcinoma cells to radiotherapy and chemotherapy.
135. Khodarev NN, Minn AJ, Efimova E V., Darga TE, Labay E, Beckett M, et al. Signal transducer and activator of transcription 1 regulates both cytotoxic and prosurvival functions in tumor cells. Cancer Res. 2007 Oct 1;67(19):9214–20.
136. Rossi D, Zlotnik A. THE BIOLOGY OF CHEMOKINES AND THEIR RECEPTORS [Internet]. Vol. 18, Annu. Rev. Immunol. 2000. Available from: www.annualreviews.org
137. Chemokines: A New Classification Review System and Their Role in Immunity.
138. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis* [Internet]. 1995. Available from: <http://www.jbc.org/>

139. Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL, Shanafelt A, Hesselgesser J, Horuk R, et al. The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Leukoc Biol.* 1997 Nov;62(5):554–62.
140. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. Vol. 26, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd; 2015. p. 311–27.
141. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, et al. The CXC Chemokine Receptor 2, CXCR2, Is the Putative Receptor for ELR + CXC Chemokine-Induced Angiogenic Activity . *The Journal of Immunology.* 2000 Nov 1;165(9):5269–77.
142. Wang N, Liu W, Zheng Y, Wang S, Yang B, Li M, et al. CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. *Cell Death Dis.* 2018 Sep 1;9(9).
143. Sgadari C, Farber JM, Angiolillo AL, Liao F, Teruya-Feldstein J, Burd PR, et al. RAPID COMMUNICATION Mig, the Monokine Induced By Interferon-g, Promotes Tumor Necrosis In Vivo [Internet]. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/89/8/2635/1410461/2635.pdf>
144. Birbrair A. Tumor Microenvironment. Birbrair A, editor. Vol. 1231. Cham: Springer International Publishing; 2020.
145. Dinh T, Braunagel S, Rosenblum BI. Growth Factors in Wound Healing: The Present and the Future? Vol. 32, *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*. W.B. Saunders; 2015. p. 109–19.
146. Bennett NT, Schultz GS, Florida G. Growth Factors and Wound Healing: Biochemical Properties of Growth Factors and Their Receptors.
147. Heldin CH, Hellberg C, Östman A. PDGF and vessel maturation. Vol. 180, *Recent Results in Cancer Research*. 2010. p. 103–14.
148. Östman A, Heldin CH. PDGF Receptors as Targets in Tumor Treatment. Vol. 97, *Advances in Cancer Research*. 2007. p. 247–74.
149. Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis. *J Wound Care* [Internet]. 2009 Dec;18(12):516–9. Available from: <http://www.magonlinelibrary.com/doi/10.12968/jowc.2009.18.12.45609>
150. Rusnati M, Presta M. Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycans Biological implications in neovascularization. Vol. 26, *Int J Clin Lab Res*. Springer; 1996.
151. Basilica C, Moscatellit D. THE FGF FAMILY OF GROWTH FACTORS AND ONCOGENES. 1992.

152. Iwasaki A, Kuwahara M, Yoshinaga Y, Shirakusa T. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, as prognostic indicators in NSCLC. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2004 Mar;25(3):443–8.
153. Metcalf D. The colony-stimulating factors and cancer. Vol. 1, *Cancer immunology research*. 2013. p. 351–6.
154. Metcalf D. The colony-stimulating factors and cancer. Vol. 10, *Nature Reviews Cancer*. 2010. p. 425–34.
155. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. 2004. p. 839–49.
156. Akbarzadeh S, Layton JE. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor: Structure and Function. Vol. 63, *VITAMINS AND HORMONES*. 2001.
157. Sugimoto C, Fujieda S, Sunaga H, Noda I, Tanaka N, Kimura Y, et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF)-Mediated Signaling Regulates Type IV Collagenase Activity In Head And Neck Cancer Cells. 2001.
158. World Health Organization. WHO Handbook For Reporting Results of Cancer Treatment (WHO Offset Publication No.48). Geneva; 1979. 42 p.
159. Kaczor-Urbanowicz KE, Wei F, Rao SL, Kim J, Shin H, Cheng J, et al. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. Vol. 1872, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V.; 2019. p. 49–59.
160. Wong DT. Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer. “Oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance.” Vol. 6, *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2006. p. 267–72.
161. Argiris A, Lee SC, Feinstein T, Thomas S, Branstetter IV BF, Seethala R, et al. Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2011;47(10):961–6.
162. Lee SY, Jeong EK, Ju MK, Jeon HM, Kim MY, Kim CH, et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. Vol. 16, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2017.
163. Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN, et al. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. Vol. 26, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2011. p. 326–34.
164. Guerra ENS, Acevedo AC, Leite AF, Gozal D, Chardin H, De Luca Canto G. Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. Vol. 51, *Oral Oncology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 805–18.
165. Principe S, Dikova V, Bagán J. Salivary cytokines in patients with head and neck cancer (HNC) treated with Radiotherapy. *J Clin Exp Dent*. 2019;11(12):1072–7.

166. Bossi P, Bergamini C, Miceli R, Cova A, Orlandi E, Resteghini C, et al. Salivary Cytokine Levels and Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients Treated With Chemotherapy and Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016 Dec 1;96(5):959–66.
167. Russo N, Bellile E, Murdoch-Kinch CA, Liu M, Eisbruch A, Wolf GT, et al. Cytokines in saliva increase in head and neck cancer patients after treatment. In: *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. Mosby Inc.; 2016. p. 483-490.e1.
168. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4+ T cell populations. Vol. 28, *Annual Review of Immunology*. 2010. p. 445–89.