

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DIEGO ANTONIO COSTA ARANTES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SALIVAR E TECIDUAL DAS CITOCINAS TGF- β E IL-10
EM PACIENTES COM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CAVIDADE ORAL**

Goiânia

2015

DIEGO ANTONIO COSTA ARANTES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SALIVAR E TECIDUAL DAS CITOCINAS TGF- β E IL-10
EM PACIENTES COM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CAVIDADE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica.

Linha de Pesquisa: Alterações do Sistema Estomatognático

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia do Lago Costa

Goiânia

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Antonio Costa Arantes, Diego
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SALIVAR E TECIDUAL DAS
CITOCINAS TGF-beta E IL-10 EM PACIENTES COM CARCINOMA
ESPINOCELULAR DE CAVIDADE ORAL [manuscrito] / Diego
Antonio Costa Arantes. - 2015.
109 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Aline Carvalho Batista; co-orientadora Dra.
Nádia Lago Costa.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
de Odontologia (FO) , Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Goiânia, 2015.
Bibliografia. Anexos.
Inclui tabelas, lista de figuras.

1. Neoplasia bucal. 2. IL-10. 3. TGF-?. 4. Saliva. 5. Evasão tumoral. I.
Carvalho Batista, Aline, orient. II. Lago Costa, Nádia, co-orient. III.
Título.



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Diego Antonio Costa Arantes		
E-mail:	diegoantonio_arantes@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás	Sigla:	CNPq e FAPEG
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ: 01699982155
Título:	Avaliação da expressão salivar e tecidual das citocinas TGF- β e IL-10 em pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral		
Palavras-chave:	Neoplasia bucal, IL-10, TGF- β , Metástase, Saliva, Evasão tumoral		
Título em outra língua:	Evaluation of saliva and tissue expression of TGF- β and IL-10 in patients with oral squamous cell carcinoma		
Palavras-chave em outra língua:	Oral neoplasm, IL-10, TGF- β , Metastasis, Saliva, Tumor evasion		
Área de concentração:	Clinica Odontológica	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	02/03/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Odontologia		
Orientador (a):	Profª Drª Aline Carvalho Batista		
E-mail:	ali.caba@uol.com.br		
Co-orientador (a):*	Profª Drª Nádia do Lago Costa		
E-mail:	nadialago@hotmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Diego Antonio Costa Arantes
Assinatura do (a) autor (a)

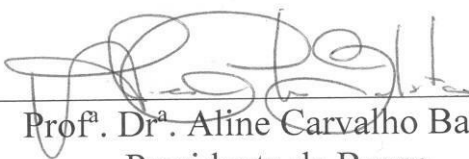
Data: 11/03/2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

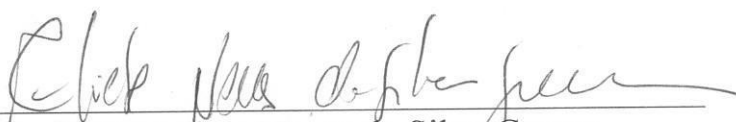
Diego Antonio Costa Arantes

Avaliação da expressão salivar e tecidual das citocinas TGF- β E IL-10 em pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral.

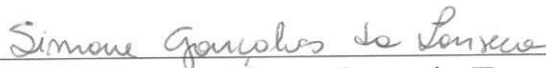
Dissertação defendida e aprovada em 02 / 03 / 2015, pela Banca Examinadora constituída por:



Prof.ª. Dr.ª. Aline Carvalho Batista
Presidente da Banca



Prof.ª. Dr.ª. Eliete Neves da Silva Guerra
Membro da Banca



Prof.ª. Dr.ª. Simone Gonçalves da Fonseca
Membro da Banca

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

Aluno: Diego Antonio Costa Arantes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia do Lago Costa

MEMBROS:

Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista

Prof^a. Dr^a. Eliete Neves da Silva Guerra

Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves da Fonseca

MEMBROS SUPLENTES:

Prof^a. Dr^a Rejane Faria Ribeiro-Rotta

Prof^a. Dr^a Mara Rúbia Marques

Data: 02/03/2015

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à **Deus**, por ter me proporcionado força, paciência, sabedoria, perseverança e responsabilidade para seguir o caminho que escolhi e que tanto me trás satisfação pessoal e profissional.

À minha família, em particular, **ao meu pai Lucio Antonio Arantes e minha mãe Luciana Aparecida Tinoco Arantes**, pelo apoio, segurança, estrutura e compreensão durante todo o mestrado. Mesmo diante de todos os problemas que passamos durante este período, estiveram sempre do meu lado. Sei que, mesmo com todo meu esforço, sem vocês não chegaria até aqui. Vocês me mostraram o caminho certo, aconselharam e tiveram paciência. Foram presentes, atuantes e, acima de tudo, foram pais. Obrigado por serem o maior exemplo de luta, amor, confiança e carinho. Minha gratidão e amor eterno!

Em especial, à minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista**, os meus sinceros agradecimentos pelas oportunidades, confiança, paciência e incentivo constante de acreditar no meu potencial. Ficam aqui meu respeito, carinho e admiração! Ser professor não é apenas lecionar e orientar, mas sim ser humano, amigo, exemplo de dedicação, doação, dignidade e amor. Pode ter certeza professora Aline que a senhora foi e sempre será assim! Poucas foram às oportunidades que tive para agradecer por tão grandioso trabalho. Meu eterno agradecimento por tudo que contribuiu durante minha formação como aluno de graduação e pós-graduação!

À **Prof^a. Dr^a. Nádia do Lago Costa**, agradeço imensamente os ensinamentos, paciência e generosidade. Ter sua co-orientação durante os dois anos em que estive na iniciação científica e durante o mestrado com certeza foram fundamentais para meu amadurecimento e crescimento profissional. Agradeço ainda a amizade e o carinho que se construiu para além do âmbito profissional. Muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. Elismauro Francisco Mendonça**, pela colaboração, ensinamentos, incentivo e pela amizade durante todos esses anos. Atribuo minha gratidão ao senhor a seguinte frase de Isacc Newton: “Se conseguimos ver mais longe hoje, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”. Muito obrigado por tudo!

Às professoras **Rejane Faria Ribeiro-Rotta, Maria Alves Garcia Santos Silva, Carla Aparecida B da Costa Meneses Nunes, Fernanda Paula Yamamoto, Eneida**

Franco Vêncio, Mara Rúbia Marques, Josiane Faganello e Rosângela Hatori Rocha, pela contribuição intelectual que me proporcionaram e pela tutoria durante as atividades de graduação e extensão.

Ao colega de mestrado e laboratório, **Alisson Filipe Lopes Martins**, meus verdadeiros agradecimentos pela amizade e ensinamentos. Muito obrigado por sempre ter me ouvido, aconselhado e ter contribuído positivamente nessa minha trajetória desde a graduação até o mestrado.

Aos alunos de iniciação científica, **Brenner Pereira Silva Rocha e Laís Bueno Dallarmi**, agradeço a imensa dedicação, auxílio e confiança depositada em nosso trabalho.

Aos colegas de mestrado e doutorado do laboratório de Patologia Bucal, **Andréia de Souza Gonçalves, Carlos Henrique, Marília Oliveira Moraes e Inara Carneiro Costa Rege** pela colaboração e convivência amigável durante esses anos.

Aos meus colegas de turma de pós-graduação, agradeço pela confiança, amizade, união e humildade durante esta jornada! Além de exemplos, foram e serão estímulo para que eu sempre tivesse força e determinação em todas as minhas atividades. Muito obrigado pelo exemplo de amizade de todos vocês e pelo carinho que sempre tiveram comigo! Podem ter certeza que fizemos a nossa história na Faculdade de Odontologia da UFG, que foi ao mesmo tempo árdua, feliz e inesquecível.

À **Dra. Rita de Cássia Alencar Gonçalves** e **Dr. José Carlos de Oliveira** por permitirem o acesso a Divisão de Anátomo-Patologia e Citopatologia e Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge (HAJ-ACCG), possibilitando dessa forma o desenvolvimento desta pesquisa.

Às funcionárias do Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB), **Claudinha e Celma**; ao funcionário do Laboratório de Patologia Bucal da FO/UFG, **Erildo**, e à funcionária **Rosália**, pelo apoio que nunca foi negado.

Aos **pacientes**, pois sem eles não seria possível à realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás –FO/UFG - na pessoa da diretora **Prof^a. Dr^a. Enilza Maria Mendonça de Paiva**.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo financiamento do estudo e pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao **Centro Goiano de Doenças da Boca da FO/UFG**, na pessoa da coordenadora **Prof^a. Dr^a. Rejane Faria Ribeiro-Rotta**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FO/UFG, na pessoa da coordenadora **Prof^a. Dr^a. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa** e secretária **Gláucia Terra e Silva**.

Ao Hospital Araújo Jorge,/Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG), em especial à Divisão de Anátomo-Patologia e Citopatologia do Serviço de Cabeça e Pescoço, por permitir a seleção das amostras deste estudo.

A Faculdade de Odontologia (Departamento de Patologia Bucal e Cirurgia) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na pessoa da **Prof^a. Dr^a. Tarcília Aparecida da Silva**, por contribuir com este estudo e permitir a utilização de toda a estrutura e equipamentos.

RESUMO

Fator de crescimento transformador β (TGF- β) e interleucina 10 (IL-10) são citocinas imunossupressoras que propiciam a falha da resposta imune anti-tumoral local e influenciam, assim, na progressão e prognóstico de neoplasias malignas. O objetivo deste estudo foi investigar a expressão tecidual e salivar de TGF- β e IL-10 em pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral (CECO) e comparar essa expressão com aquela dos indivíduos saudáveis (Controle). A associação dessas citocinas com parâmetros clínicos de prognóstico (estadiamento, metástase e sobrevida) e grau histológico de malignidade (segundo a OMS) também foi investigado. A identificação das citocinas no tecido (CECO - n= 65 e Controle - n=30) foi feita pela técnica de imunohistoquímica (IHC) e na saliva (CECO - n=22 e Controle - n=23) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). A expressão tecidual de TGF- β e IL-10 em linfonodos metastáticos (n= 23) de pacientes com CECO foi investigada. No tecido, a expressão de TGF- β e IL-10 foi mensurada por método semi-quantitativo associada à intensidade de marcação. Nossos achados demonstraram uma alta expressão tecidual de IL-10 e TGF- β 2 e, baixa ou ausente expressão de TGF- β 1, na maioria das amostras de CECO se comparada ao grupo de mucosa oral clinicamente saudável (Controle) (P<0,05 para IL-10 e TGF- β 2). A concentração salivar de IL-10 também foi elevada e distinguiu o paciente com CECO dos indivíduos saudáveis (P= 0,04). Já a concentração salivar de TGF- β 1 foi similar entre o grupo de paciente com CECO e o controle (P= 0,97). A relação da expressão das citocinas com fatores clínicos e microscópicos de prognóstico revelou que a expressão de IL-10 e TGF- β 2 nas células neoplásicas do tumor primário foi mantida pelas células neoplásicas metastáticas nos linfonodos cervicais. A expressão de TGF- β 1 se manteve baixa ou ausente em linfonodos metastáticos. Associação entre alta expressão de IL-10 pelas células neoplásicas e o estadiamento clínico avançado (T3-T4) dos pacientes foi evidenciada (P=0,02). Embora sem diferença estatística, a expressão de TGF- β 2 foi maior nos tumores em estágios mais avançados (P>0,05). Esses achados demonstram que o CECO possui um ambiente imunossupressor propício para progressão tumoral, com elevada expressão de IL-10 e TGF- β 2, o qual contribui para um pior prognóstico clínico dos pacientes. Além disso, das citocinas imunossupressoras investigadas, a IL-10 apresenta maior potencial para se tornar um biomarcador salivar associado ao prognóstico clínico desfavorável do paciente com CECO.

Palavras-chave: Neoplasia bucal, IL-10, TGF- β , Metástase, Saliva, Evasão Tumoral

ABSTRACT

The transforming growth factor β (TGF- β) and interleukin 10 (IL-10) are immunosuppressive cytokines which promote failure of the local anti-tumor immune response and, therefore, influence the proliferation and prognosis of malignant neoplasms. The aim of this study was to investigate the tissue and salivary expression of TGF- β and IL-10 in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and compare it with that of healthy subjects (Control). The association of these cytokines with clinical parameters of prognosis (staging, metastasis and survival) and histological grade of malignancy (WHO grading) was also investigated. Cytokines in the tissue (OSCC, $n = 65$; Control, $n = 30$) were identified using the immunohistochemistry technique (IHC) and in the saliva (OSCC, $n = 22$; Control, $n = 23$) the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used. The tissue expression of TGF- β and IL-10 in metastatic lymph nodes ($n = 23$) of OSCC patients was investigated. The expression of TGF- β and IL-10 in the tissue was measured using a semi-quantitative method in conjunction with staining intensity. Our findings demonstrated a high tissue expression of IL-10 and TGF- β 2, and a low or absent expression of TGF- β 1, in the majority of OSCC samples when compared to the group with clinically healthy oral mucosa (Control) ($p < 0.05$ for IL-10 and TGF- β 2). The salivary concentration of IL-10 was also high, and distinguished the OSCC patients from their healthy counterparts ($p = 0.04$), while the salivary concentration of TGF- β 1 was similar for both the OSCC and control groups ($p = 0.97$). The relationship between the cytokine expression and clinical and microscopic prognostic factors showed that the expression of IL-10 and TGF- β 2 in neoplastic cells of the primary tumor was maintained by the metastatic neoplastic cells in the cervical lymph nodes. The expression of TGF- β 1 remained low or absent in the metastatic lymph nodes. It was shown that there was an association between the high expression of IL-10 by tumor cells and the advanced clinical stages (T3-T4) of patients ($p = 0.02$). Although not statistically significant, the expression of TGF- β 2 was higher in tumors at more advanced stages ($p > 0.05$). These findings demonstrate that OSCC provides an immunosuppressive environment conducive to tumor proliferation, with high expression of IL-10 and TGF- β 2, which contributes to a worse clinical prognosis. In addition, of the immunosuppressive cytokines investigated, IL-10 has greater potential for becoming salivary biomarker when associated with an unfavorable clinical prognosis of OSCC patients.

Keywords: Oral neoplasm, IL-10, TGF- β , Metastasis, Saliva, Tumor Evasion.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CECO	Carcinoma Espinocelular de Cavidade Oral
CEC	Carcinoma Espinocelular
CEP/UFG	Comitê de Ética em Pesquisa/Universidade Federal de Goiás
DP	Desvio- padrão
DS	Standard deviation
ELISA	Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
FO/UFG	Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Goiás
FO/UFMG	Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Minas Gerais
HAJ/ACCG	Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer de Goiás
HE	Hematoxilina e Eosina
IL-10/-6/-12	Interleucina -10/-6/-12
INF-γ	Interferon gama
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRS	Immunoreactive score (Escore de imunomarcção)
IC	Intensidade de coloração
LTCs	Linfócitos T citotóxicos
NK	Natural Killer (Células assassinas)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma (Carcinoma espinocelular de boca)
SI	Staining intensity (Intensidade de coloração)
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGF-β 1/2/3	Fator de crescimento transformador beta -1, -2, -3
TNM	Tamanho do tumor/Metástase regional/Metástase à distância

TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	T regulatórias (Células T regulatórias)
TGFβRII	Receptor para TGF beta tipo II
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
UICC	International Union Against Cancer (União Internacional Contra Câncer)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	<i>Carcinoma espinocelular de cavidade oral (CECO)</i>	20
2.2	<i>Fator de crescimento transformador beta (TGF-β) e interleucina 10 (IL- 10)</i>	25
2.3	<i>Biomarcadores salivares.....</i>	33
3	JUSTIFICATIVA.....	35
4	OBJETIVOS.....	36
4.1	<i>Objetivo geral.....</i>	36
4.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	36
5	METODOLOGIA.....	37
5.1	ETAPA I.....	37
5.1.1	<i>Seleção dos pacientes e controle.....</i>	37
5.1.2	<i>Coleta da saliva.....</i>	37
5.1.3	<i>Técnicas empregadas.....</i>	38
5.1.3.1	<i>Ensaio imunoenzimático (ELISA).....</i>	38
5.1.3.2	<i>Técnica de rotina (hematoxilina e eosina).....</i>	38
5.1.3.3	<i>Técnica imuno-histoquímica.....</i>	39
5.1.4	<i>Análise qualitativa e quantitativa dos dados.....</i>	37
5.1.4.1	<i>Concentração salivar de TGF-β1 e IL-10.....</i>	40
5.1.4.2	<i>Expressão tecidual de TGF-β1 e IL-10.....</i>	40
5.1.5	<i>Análise estatística dos dados.....</i>	40
5.2	ETAPA II.....	41
5.2.1	<i>Obtenção, seleção e caracterização da amostra.....</i>	41
5.2.2	<i>Técnicas empregadas.....</i>	42
5.2.2.1	<i>Técnica de rotina (hematoxilina e eosina).....</i>	42
5.2.2.2	<i>Técnica imuno-histoquímica.....</i>	42
5.2.3	<i>Análise qualitativa e quantitativa dos dados.....</i>	43
5.2.4	<i>Análise estatística dos dados.....</i>	44
6	RESULTADOS.....	45
6.1	ETAPA I.....	45
6.1.2	<i>Publicação I.....</i>	50

6.2	ETAPA II.....	51
6.2.1	<i>Publicação II</i>	58
7	CONCLUSÃO	79
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
	ANEXOS	91

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença emergencial mundial e está entre as causas de óbito mais frequentes no Brasil (INCA, 2014). Estimativas realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelaram, para o ano de 2014, uma expectativa de 11.280 novos casos de câncer de cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres (INCA, 2014).

Embora parâmetros clínicos (BARNES et al., 2005) e microscópicos (ANNEROTH et al., 1987; PINDBORG & WAHI, 1997; VAN DIEST et al., 1998) sejam importantes para avaliação da agressividade tumoral, hoje se sabe que as imunidades inata e adaptativa desempenham papel fundamental na vigilância imunológica e destruição tumoral (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; LIOTTA & KOHN, 2001; ABBAS & LICHTMAN & PILLAI, 2008) contribuindo assim para o estabelecimento do prognóstico da doença (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; LIOTTA & KOHN, 2001; VAN-KEMPEN et al., 2003; VISSER & COUSSENS, 2005; VISSER et al., 2006). Entretanto, a maioria das neoplasias malignas tem desenvolvido inúmeras estratégias imunossupressivas que lhes permitem a progressão tumoral (AKHURST & DERYNCK, 2001; ROBERTS & WAKEFIELD, 2003; MASSAGUÉ, 2008; ABBAS & LICHTMAN & PILLAI, 2008).

Dentre os mecanismos imunossupressores que podem favorecer a evasão das células tumorais à vigilância imunológica, pode-se citar a expressão das citocinas fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e a interleucina 10 (IL-10) (MATSUDA et al., 1994; PARDALI & MOUTSTAKAS, 2007). Estas citocinas podem contribuir no microambiente tumoral com a atividade e manutenção de células imunossupressoras T regulatórias (Tregs) (ZAMARRON & CHEN, 2011), reduzir ou impedir a produção de citocinas pró-inflamatórias (LIN & KARIN, 2007; ZAMARRON & CHEN, 2011), inibir a ativação e proliferação de células imunes efetoras como as natural killer (NK) (LEE et al., 2014) e linfócitos T citotóxicos (LTCs) (BENJARANO et al., 1992; MATSUDA et al., 1994; ZAMARRON & CHEN, 2011), sendo esses últimos fundamentais no desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral efetiva (ABBAS & LICHTMAN & PILLAI, 2008; COSTA et al., 2010; COSTA et al., 2011).

Considerando que as citocinas TGF- β e IL-10 podem favorecer a progressão tumoral e ainda que haja poucos estudos sobre essas proteínas em tumores de

boca, o presente trabalho propõe investigar a expressão do TGF- β e IL-10 tanto na saliva quanto no microambiente tumoral de pacientes acometidos pelo carcinoma espinocelular de cavidade oral (CECO) e investigar a presença de correlação com parâmetros clínicos e microscópicos de prognóstico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CAVIDADE ORAL (CECO)

O termo câncer de boca é uma denominação genérica que inclui tumores de variados perfis histológicos, embora predominantemente se refira ao carcinoma espinocelular (CEC) (BARNES et al., 2005; BRENER et al., 2007). O CEC, também denominado carcinoma epidermóide, carcinoma de células escamosas ou carcinoma de células espinhosas, é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento e que pode acometer o lábio e a cavidade oral (língua, assoalho da boca, gengiva, mucosa jugal e palato duro) (BARNES et al., 2005; INCA, 2014). Na etiopatogenia do CECO o tabagismo e o etilismo (carcinógeno e co-carcinógeno, respectivamente) compreendem os fatores mais comumente associados ao aumento do risco para o desenvolvimento da doença (PINDBORG & WAHI, 1997; SANDERSON et al., 1997; BARNES et al., 2005; MASSANO et al., 2006).

Geralmente, os carcinógenos e co-carcinógenos propiciam o surgimento de lesões brancas (leucoplasias) ou vermelhas (eritroplasias), as quais apresentam um risco maior de transformação neoplásica comparativamente a uma mucosa oral normal e, microscopicamente podem apresentar alterações celulares e estruturais, denominadas de displasia (PINDBORG & WAHI, 1997; NEVILLE & DAY, 2002; VAN DER WAAL, 2009). Assim, essas lesões são denominadas desordens potencialmente malignas e podem representar o estágio inicial ou as primeiras alterações morfológicas de um CECO (PINDBORG & WAHI, 1997; NEVILLE & DAY, 2002; VAN DER WAAL, 2009).

Considerando os fatores clínicos de prognóstico do CECO, entre os anos de 1943 e 1952, Pierre Denoix desenvolveu o sistema TNM para a classificação de neoplasias malignas, tendo sido incorporado pela “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) e pela “International Union Against Cancer” (UICC) a partir de 1982 (EDGE et al., 2010; INCA, 2014). Dessa forma, o estabelecimento do prognóstico e o plano de tratamento dos CEC de boca baseiam-se principalmente nesse sistema, que trabalha prioritariamente com a extensão anatômica da doença determinada clinicamente (INCA, 2014). O estadiamento TNM satisfaz a uma série de objetivos, os quais: ajudar o médico no planejamento do tratamento; dar alguma indicação do prognóstico; ajudar na avaliação dos resultados do tratamento; facilitar a troca de

informações entre os centros de tratamento; contribuir para a pesquisa contínua sobre o câncer humano (PINDBORG & WAHI, 1997; INCA, 2014). Posto isso, tal sistema baseia-se na avaliação de três componentes: T, o qual corresponde à extensão do tumor primário; N, que se refere à ausência ou à presença e à extensão de metástase em linfonodos regionais; M, que corresponde à ausência ou à presença de metástase à distância (PINDBORG & WAHI, 1997; INCA, 2014).

Segundo o sistema TNM, tumores de pequenas dimensões e não disseminados apresentam um melhor prognóstico em relação àqueles com maiores proporções e metástase clinicamente detectável (HIRATSUKA et al., 1997; BRIGATI et al., 2002). Porém, alguns tumores com o mesmo estadiamento clínico demonstram padrões de crescimento e evolução diferentes, sugerindo a necessidade da análise de outros fatores complementares capazes de nortear com maior precisão o prognóstico desta doença (GOLDSMITH et al., 1992).

O CECO é caracterizado por um elevado grau de invasão local e por um alto índice de metástase em linfonodos cervicais. Além disso, esse tumor, frequentemente, apresenta recorrência local após tratamento inicial, provavelmente devido à capacidade de microinvasão e/ou micrometástase das células neoplásicas (ALMOFTI et al., 2004) que em geral, afeta diretamente o prognóstico desses pacientes (OKURA, 2002; ALMOFTI et al., 2004). Os linfonodos cervicais são os sítios primários de disseminação de células tumorais metastáticas do CECO. A presença e extensão de metástase nesses linfonodos representa um dos fatores de prognóstico mais relevante e interfere de forma significativa no comportamento tumoral e sobrevida dos pacientes (FAN et al., 2011).

De acordo com Okura (2002), aproximadamente 50% dos pacientes com CEC de língua avançado (estágios III ou IV, UICC) morrem em 5 anos e o fator de prognóstico mais importante é a presença de metástase em linfonodos (OKURA, 2002). Esse processo de metástase pode ser influenciado pela resposta imunológica antitumoral local e sistêmica do paciente, sendo que a imunossupressão pode favorecer a progressão tumoral (KUMAGAI et al., 2010). Recentemente, demonstrou-se que uma resposta imunológica antitumoral local mais efetiva ocorre em linfonodos cervicais de pacientes com CECO de boca que não desenvolveram metástase se comparado àqueles linfonodos metastáticos (GONÇALVES et al.,

2013). Além disso, a sobrevida do paciente após o tratamento cirúrgico de um CECO é, também, considerada um importante fator de prognóstico clínico (DORTA et al., 2002).

Também é fundamental avaliar parâmetros microscópicos de prognóstico, visto que enfatizam as características histopatológicas e a relação imunológica entre tumor e hospedeiro. Dentre esses sistemas, destaca-se o sistema de gradação histológica de malignidade desenvolvido por Wahi, em 1971, e publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o qual é bastante utilizado para classificação microscópica do CEC de boca. O CEC é classificado, segundo a OMS, com base no grau de diferenciação celular, que considera o grau de queratinização, o pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica (PINDBORG & WAHI, 1997). Dessa forma, os graus são: grau I - bem diferenciado, onde as células tumorais se assemelham às da camada espinhosa da mucosa bucal tanto morfológica quanto funcionalmente; grau II - moderadamente diferenciado, no qual são observados menos queratinização, mais polimorfismo nuclear, maior quantidade de células hipercromáticas e maior número de mitoses atípicas; grau III - pobremente diferenciado, com ausência de queratinização, grande quantidade de mitoses atípicas e intenso polimorfismo nuclear (PINDBORG & WAHI, 1997). Em adição aos fatores microscópicos descritos pela OMS, outros autores utilizam ainda para a classificação microscópica, a relação tumor-hospedeiro, avaliando o estágio e padrão de invasão tumoral, e a intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral (ANNERTH et al., 1987; SPIRO et al., 1999).

Atualmente, outro relevante critério microscópico a ser considerado no prognóstico do CECO é a avaliação da densidade de células em proliferação e em apoptose, que podem ser facilmente verificadas por meio de imunomarcadores contra alvos específicos expressos durante o ciclo celular, como a proteína ciclina B1, pela análise da expressão de moléculas de adesão celular como a proteína β -catenina e integrina e pela análise da expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas, como a proteína Bax e Bcl-2, respectivamente (VAN-DIEST et al., 1998; XIE et al., 1999; TUMULURI et al., 2004; ZHANG et al., 2009; CAMISASCA et al., 2009; WATANABE et al., 2010).

Embora parâmetros clínicos (BARNES et al., 2005) e microscópicos (ANNEROTH et al., 1987; PINDBORG & WAHI, 1997; VAN-DIEST et al., 1998; SPIRO et al., 1999) sejam de suma importância para avaliação da agressividade tumoral, atualmente se sabe que a imunidade antitumoral local e sistêmica desempenham papel preponderante na vigilância imunológica (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; LIOTTA & KOHN, 2001; VAN-KEMPEN et al., 2002; VAN-KEMPEN et al., 2003; VISSER & COUSSENS, 2005; VISSER et al., 2006; ABBAS & LICHTMAN & PILLAI, 2008), contribuindo para o estabelecimento do prognóstico da doença (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; LIOTTA & KOHN, 2001; VAN-KEMPEN et al., 2002; VISSER & COUSSENS, 2005; VISSER et al., 2006). Entretanto, a maioria dos cânceres tem desenvolvido inúmeras estratégias imunossupressivas que lhes permitem a fuga ou evasão frente à resposta imune antitumoral (AKHURST & DERYNCK, 2001; ROBERTS & WAKEFIELD, 2003; MASSAGUÉ, 2008; ABBAS & LICHTMAN & PILLAI, 2008).

Dados sobre a influência ou participação das células imune-inflamatórias e seus mediadores químicos na patogênese e prognóstico do CECO ainda são escassos. Assim, considerando a importância desse microambiente na modulação de eventos envolvidos tanto na progressão e invasão do tumor (angiogênese, degradação da matriz extracelular e imunossupressão local) como para impedir ou reduzir a infiltração local e metástases (imunidade antitumoral) (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; LIOTTA & KOHN, 2001; BRIGATI et al., 2002; COUSSENS & WERB et al., 2002; VAN-KEMPEN et al., 2002; VAN-KEMPEN et al., 2003; VISSER & COUSSENS, 2005; VISSER et al., 2006), nosso grupo de pesquisa tem investido em caracterizar as populações celulares bem como seus mediadores químicos presentes nesse microambiente e avaliar a relação desses com o prognóstico dos pacientes (OLIVEIRA-NETO et al., 2007; FERREIRA et al., 2008; OLIVEIRA-NETO et al., 2008; COSTA et al., 2010; ZANCOPE et al., 2010; COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2013). Neste contexto, demonstrou-se previamente uma diminuição de células NK e de linfócitos T citotóxicos, e suas enzimas citotóxicas perforina e granzima B, em CEC de cavidade oral que apresentava pior prognóstico clínico (COSTA et al., 2010; ZANCOPE et al., 2010; COSTA et al., 2011). Mais recentemente, Costa et al. (2013) demonstrou que a expressão gênica das citocinas imunossupressoras TGF- β e IL-10 encontrava-se elevada no CECO em relação a

mucosa oral clinicamente saudável (COSTA et al., 2013). Desta forma, hipotetizamos que uma imunossupressão local pode ocorrer no CEC de boca e associar-se a um prognóstico clínico desfavorável.

2.2 FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA (TGF- β) E INTERLEUCINA 10 (IL-10)

O TGF- β é uma citocina multifuncional produzida principalmente por macrófagos, células Treg (CD4⁺CD25⁺), plaquetas, fibroblastos, queratinócitos, células dendríticas e por células tumorais (KATO et al., 1999; ZAMARRON & CHEN, 2001; FERREIRA, 2010; MA et al., 2013). A sua descoberta em 1980, rapidamente levou a identificação de uma grande família de polipeptídeos cuja ação está envolvida em todos os aspectos do desenvolvimento, homeostase celular e câncer (MOSES & ROBERTS, 2008); sendo identificado em mamíferos, as isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (VAGENAS et al., 2007). Essa citocina possui funções biológicas dicotômicas ou pleiotrópicas na carcinogênese. Alguns estudos têm referido ao TGF- β uma propriedade supressora, com manutenção da homeostasia tecidual e inibição da progressão tumoral em estágios iniciais. Outros ainda têm demonstrado uma propriedade anti-inflamatória e imunossupressora do TGF- β , contribuindo com a promoção tumoral em estágios mais avançados do câncer (AKHURST & DERYNCH, 2001; ROBERTS & WAKEFIELD, 2003; PARDALI & MOUSTAKAS, 2007).

Além da importância no processo de reparo (estimulando fibroblastos a produzirem matriz extracelular) e na angiogênese, (atuando na proliferação das células endoteliais e pericitos) (PLATTEN & WICK & WELLER, 2001; CARMELIET, 2005; PARDALI & MOUSTAKAS, 2007), o TGF- β pode também inibir o crescimento tumoral (AKHURST & DERYNCH, 2001; FUKAI et al., 2003). A sua função supressora na carcinogênese está relacionada com a regulação da proliferação, crescimento, diferenciação e adesão celular, mantendo assim a homeostase tecidual, em especial do tecido epitelial (PLATTEN & WICK & WELLER, 2001; MASSAGUÉ, 2008). Isto ocorre devido à capacidade desta citocina de controlar a transcrição de genes que influenciam no ciclo celular e regulam a apoptose, podendo controlar a proliferação de células alteradas em lesões potencialmente malignas (JAKOWLEW, 2006).

Com a evolução da carcinogênese, as células tumorais frequentemente podem se tornar resistentes a este controle do crescimento celular (JAKOWLEW, 2006). Este processo ocorre devido a mutações que pode ocorrer nos reguladores do ciclo celular, tais como as proteínas p15 ou p16, perda ou alterações nos

componentes da via de sinalização TGF- β , como o Smad4, ou ainda pela ativação oncogênica do Ras (JAKOWLEW, 2006). Desta forma o TGF- β pode atuar como um promotor tumoral levando estas células alteradas/resistentes a invadirem e metastatizarem (JAKOWLEW, 2006; AKHURST & DERYNCH, 2001) (**Figura 1**).

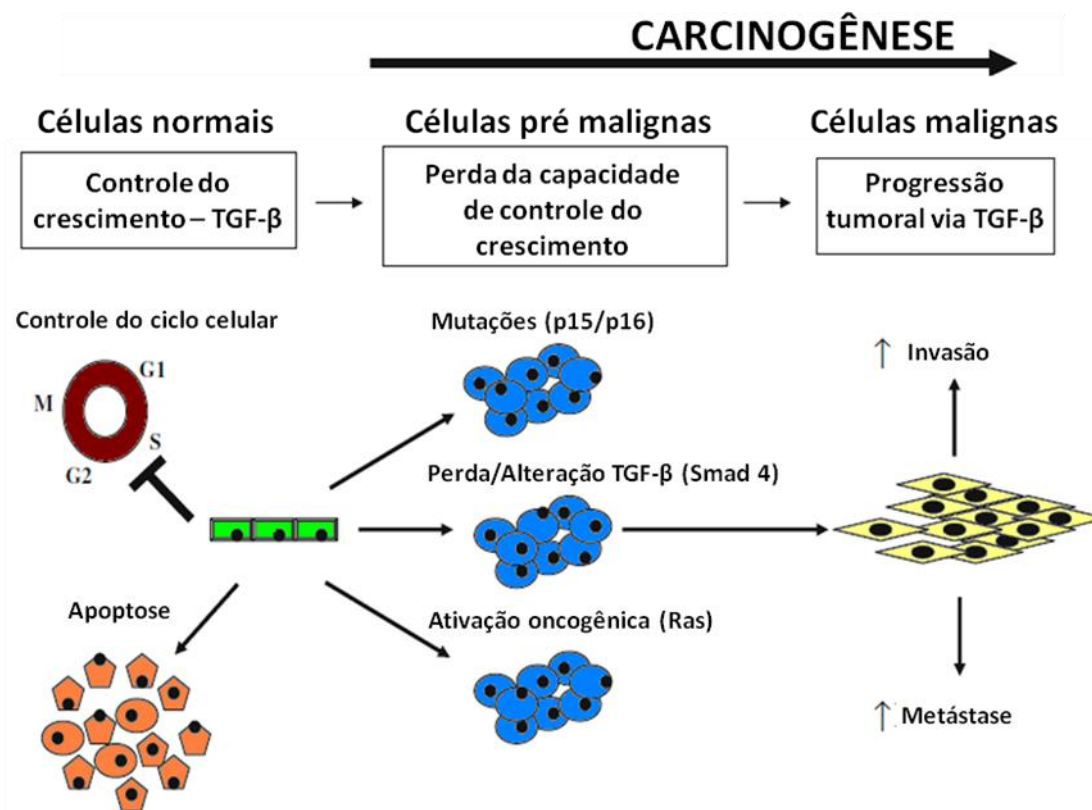


Figura 1. TGF- β como um regulador da proliferação celular (supressor: controlando o ciclo celular e induzindo células alteradas à apoptose) e indutor da progressão tumoral (promotor: mediante alterações nas vias de sinalização Smad, contribuindo com a invasão e metástase). Figura adaptada de JAKOWLEW, 2006.

A ação promotora do TGF- β no microambiente tumoral contribui para um pior prognóstico dos pacientes com câncer (AKHURST & DERYNCH, 2001; ZAMARRON & CHEN, 2001; FUKAI et al., 2003; JAKOWLEW, 2006; LIN & KARIN, 2007; MASSAGUÉ, 2008; YANG & PANG & MOSES, 2010) promovendo um efeito direto sobre as células neoplásicas e favorecendo a proliferação das mesmas (LIN & KARIN, 2007). Esta citocina estimula mecanismos biológicos que permitem essas células resistirem à resposta imune, em estágios mais avançados do câncer, por meio do aumento da síntese de enzimas proteolíticas (KIM et al., 2004), da imunossupressão local, angiogênese (AKHURST & DERYNCH, 2001; MASSAGUÉ, 2008) e pode, também, colaborar com o crescimento, invasão e metástase do tumor

através de um processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM) (ZAMARRON & CHEN, 2001; ELLIOTT & BLODE, 2005; JAKOWLEW, 2006; LIN & KARIN, 2007).

O efeito supressivo do TGF- β na resposta imune antitumoral local está relacionado com sua capacidade de regular a atividade e manutenção de células imunossupressoras Treg (CD4⁺FoxP3⁺), comprometer a apresentação de antígenos tumorais, estimular a formação de macrófagos tipo 2 e inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, IL-12, INF- γ e TNF- α (ZAMARRON & CHEN, 2001; LIN & KARIN, 2007; LUWOR & KAYE & ZHU, 2008; YANG & PANG & MOSES, 2010; MONJAZEB et al., 2013). Em especial, com relação às células T, o TGF- β parece bloquear a ação e secreção das proteínas granzima e perforina, comprometendo assim uma resposta citotóxica efetiva (THOMAS & MASSAGUE, 2005) (**Figura 2**).

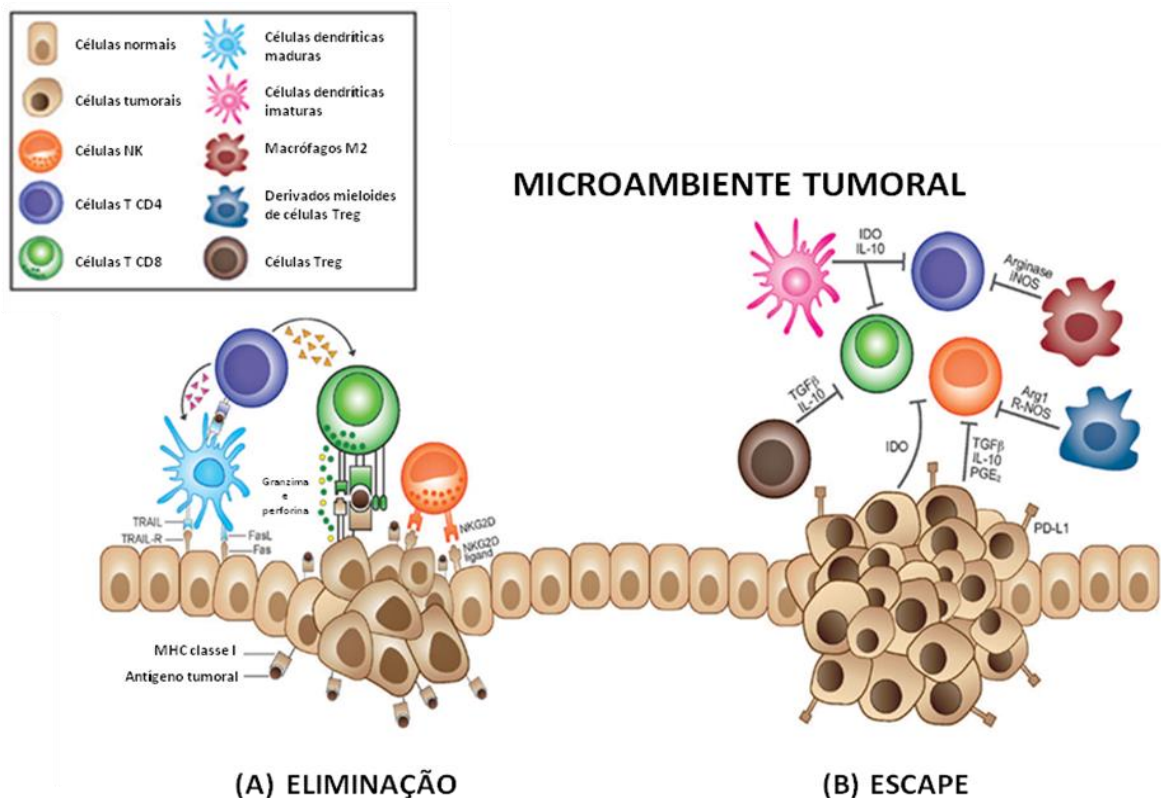


Figura 2. Representação esquemática do processo de resposta imune antitumoral (A), mediada por células T, Nk e dendríticas, e de escape tumoral frente à ação imunossupressora do TGF- β (B), secretado pelas células Treg e neoplásicas. Figura adaptada de MONJAZEB et al., 2013.

A capacidade de estimular a angiogênese faz também do TGF- β um importante promotor tumoral, contribuindo assim para o processo de metástase e pior prognóstico dos pacientes (PERTOVAARA et al., 1994; PEPPER, 1997; AKHURST & DERYNCH, 2001; GOUMANS et al., 2002; FUKAI et al., 2003; ELLIOTT & BLODE, 2005; JAKOWLEW, 2006). Juntamente com outros mediadores químicos, essa citocina pode induzir a proliferação e diferenciação de pericitos e das células endoteliais, ao interagirem com os receptores de superfície tipo I e II do TGF- β (TGF β RI e II), presentes na superfície destas células (GOUMANS et al., 2002; JAKOBSSON & MEETEREN et al., 2013) (**Figura 3**). Além disso, o TGF- β pode potencializar a produção e função do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e contribuir para a formação de novos vasos no microambiente tumoral (PERTOVAARA et al., 1994; PEPPER, 1997).

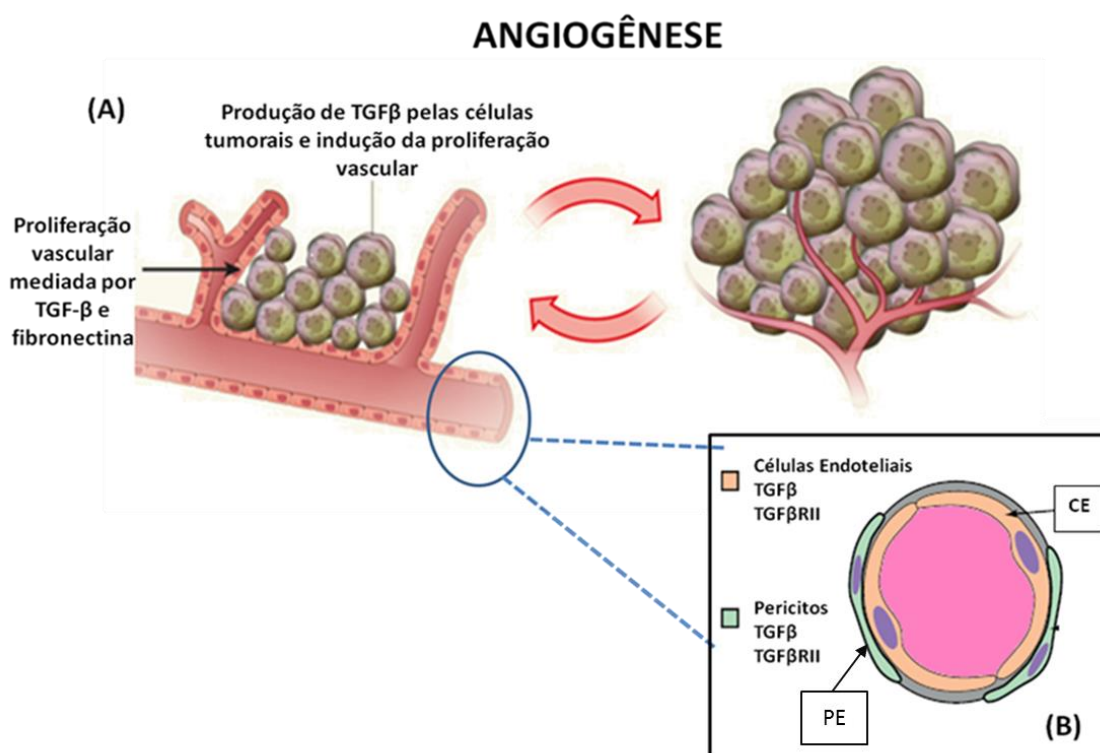


Figura 3. (A) Representação esquemática do processo de angiogênese mediado pelo TGF- β com a proliferação tumoral. (B) Estrutura de um vaso indicando os sítios de atuação do TGF- β no processo de angiogênese (CE: células endoteliais, PE: pericitos). Figuras adaptadas de JAKOBSSON & MEETEREN et al., 2013 e GHAJAR et al., 2013.

Além da angiogênese, o TGF- β pode induzir um mecanismo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM) que também corrobora com a invasão

e progressão tumoral (ZAMARRON & CHEN, 2001; TIAN & PHILLIPS, 2002; THIERY, 2003; HUBER & KRAUT & BEUG, 2005; JAKOWLEW, 2006; SMITH & TEKNOS & PAN, 2012; KATSUNO & LAMOUILLE & DERYNCK, 2013; PARDALI & MOUSTAKAS, 2007). Este processo consiste em um processo de diferenciação que permite às células epiteliais migrarem, invadirem e metastatizarem (THIERY, 2003; HUBER & KRAUT & BEUG, 2005). Inicialmente ocorre uma desorganização da adesão celular epitelial, com diminuição da expressão de E-caderina e β -catenina, associada a uma degradação e rearranjo de fibras colágenas no estroma tumoral (TIAN & PHILLIPS, 2002; THIERY, 2003; HUBER & KRAUT & BEUG, 2005). Em seguida, fibroblastos associados ao câncer são capazes de modificar o genótipo e fenótipo das células epiteliais tumorais, por contato direto, através de fatores solúveis ou modificação de componentes proteicos da matriz extracelular (JAKOWLEW, 2006). Diante desta modificação, ocorre um aumento da plasticidade celular, ou seja, as células tumorais de origem epitelial passam a expressar um conjunto de genes tipicamente expressos em células do tecido conjuntivo (ZAMARRON & CHEN, 2001; KATSUNO & LAMOUILLE & DERYNCK, 2013). Todas essas alterações conferem uma morfologia celular mesenquimal às células epiteliais, que facilita o processo de migração e metástase (SMITH & TEKNOS & PAN, 2012) **(Figura 4)**. Além disso, o TGF- β aumenta a motilidade de queratinócitos malignos, corroborando com a disseminação destes pela corrente sanguínea e linfática (ZICHA et al., 1999).

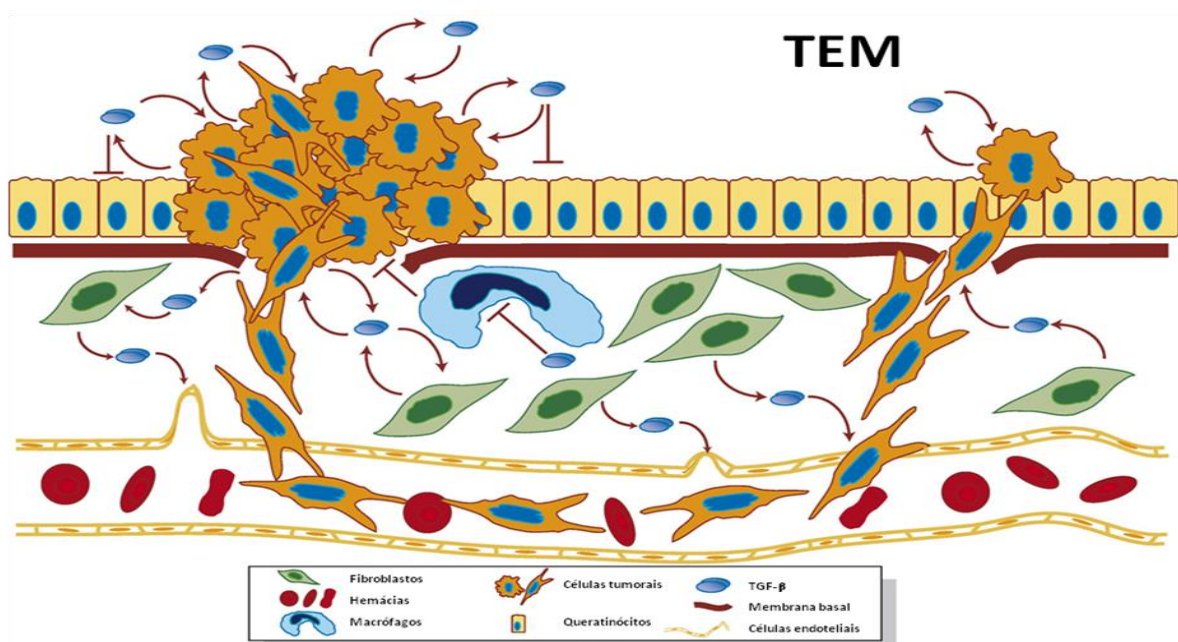


Figura 4. Representação esquemática da ação do TGF- β na progressão de um carcinoma, contribuindo com a de transição epitélio-mesenquimal (TEM) e metástase. Figura adaptada de PARDALI & MOUSTAKAS, 2007.

Diversos estudos demonstraram que a alta expressão do TGF- β está relacionada a um pior prognóstico em uma série de lesões malignas (ZAMARRON & CHEN, 2001; LIN & KARIN, 2007; MASSAGUÉ, 2008; YANG & PANG & MOSES, 2010), no entanto a complexidade do papel biológico desta citocina na carcinogênese em muitas neoplasias ainda é controverso (AKHURST & DERYNCH, 2001; FUKAI et al., 2003). Quando se avalia os subtipos específicos de TGF- β , é possível observar funções comuns e distintas entre TGF- β 1 e TGF- β 2. Em um estudo *in vitro* realizado com células neoplásicas gástricas, foi observado que quando expresso essas duas isoformas de TGF, suas funções não se sobrepõem no microambiente tumoral (VAGENAS et al., 2007).

A superexpressão de TGF- β 1 está relacionado a um pior prognóstico nos casos de carcinoma de esôfago (GHOLAMIN et al., 2009), gástrico (MA et al., 2013), mama (WALKER & DEARING & GALLACHER, 1994), hepatocelular (ITO et al., 1995), pulmão (HASEGAWA et al., 2001), pâncreas (JAVLE et al., 2014), carcinoma adenoide cístico (DONG et al., 2013) e gliomas (KJELLMAN et al., 2000), representado pela maior proliferação e invasão tumoral, maior densidade de vasos sanguíneos (angiogênese) e menor sobrevida. Por outro lado, outros estudos tem demonstrado que este mesmo subtipo pode estar relacionado com a melhor sobrevida de pacientes com carcinoma gástrico (VAGENAS et al., 2007), colorretal (TSAMANDAS et al., 2003), próstata (DESRUISSEAU et al., 1996) e tem correlação inversa com o índice proliferação das células do carcinoma de de lábio (SALVADORI et al., 2014). Outros autores tem demonstrado que um aumento da expressão de TGF- β 2 está relacionado a um pior prognóstico dos pacientes acometidos pelo carcinoma colorretal (TSAMANDAS et al., 2003), gástrico (VAGENAS et al., 2007), em gliomas (KJELLMAN et al., 2000) e melanomas avançados (VAN BELLE et al., 1996).

A IL-10 é outra citocina imunossupressora produzida principalmente por macrófagos, linfócitos T e B, mastócitos, eosinófilos, queratinócitos e células tumorais (ASADULLAH et al., 1999) com funções imunossupressoras semelhantes ao TGF- β (ZAMARRON & CHEN, 2001; LIN & KARIN, 2007). Essa citocina é capaz de inibir a expressão superficial da molécula de MHC classe I e comprometer a

apresentação de antígenos por células dendríticas e macrófagos (MATSUDA et al., 1994), favorecendo o desenvolvimento tumoral (LIU et al., 2011; GASPAROTO et al., 2010; KATO & WHITESIDE et al., 2011; CHEN et al., 2013). Além disso, a IL-10 tem sido bastante referenciada com um indicador de prognóstico ruim em lesões malignas humanas (FUJIEDA et al., 1999; DE VITA et al., 1999; HATANAKA et al., 2000; CHAN et al., 2012).

Diversos estudos demonstraram que a alta expressão da IL-10 está relacionada a um pior prognóstico, induzindo imunossupressão, e propiciando a invasão tumoral e metástase, em casos de carcinoma de esôfago (GHOLAMIN et al., 2009), pulmão (HATANAKA et al., 2000), hepatocelular (CHAN et al., 2012), ovário (PISA et al., 1992) e em melanoma (NEMUNAITIS et al., 2001).

Considerando o importante papel do TGF- β e IL-10 na carcinogênese há estudos que objetivaram avaliar essas citocinas em carcinoma de células escamosas de cavidade oral (CECO) (HAMZAVI et al., 2013; CHEN et al., 2013; MINCIONE et al., 2008; CHEN et al., 2012; COSTA et al., 2013; GAUR et al., 2014; FUJIEDA et al., 1999; CHANDLER et al., 2002) e, especialmente, a significância clínico-patológica das mesmas nesta patologia (HAMZAVI et al., 2013; CHEN et al., 2013; CHEN et al., 2012; COSTA et al., 2013; GAUR et al., 2014). Recentemente, Gaur et al. (2014) observaram que a alta expressão IL-10 e TGF- β em pacientes com CECO está relacionado com estágios mais avançados da doença (GAUR et al., 2014). Costa et al. (2013) também têm sugerido que a expressão gênica elevada de IL-10 e TGF- β no CECO pode estar relacionada a eventos imunossupressores que contribuem com um pior prognóstico dos pacientes (COSTA et al., 2013). Neste mesmo ano, Hamzavi et al. (2013) e Chen et al. (2013) demonstraram uma relação entre a alta expressão da IL-10 e um pior prognóstico de pacientes acometidos pelo CECO (HAMZAVI et al., 2013; CHEN et al., 2013). Com relação ao TGF- β 1, Logullo et al. (2003) e Mincione et al. (2008) demonstraram uma alta expressão desta citocina em amostras CECO bem diferenciado (LOGULLO et al., 2003; MINCIONE et al., 2008). Posteriormente, Elahi et al. (2012) e Chen et al. (2012) observaram uma correlação entre a alta expressão de TGF- β 1 no CECO e um pior prognóstico dos pacientes acometidos pelo tumor (ELAHI et al., 2012; CHEN et al., 2013).

Visando propiciar um melhor prognóstico para os pacientes com câncer, a aplicação clínica de agentes imunoterápicos tem sido alvo de investigação no tratamento de neoplasias, sendo que alguns pesquisadores têm demonstrado que a possibilidade de combinação da radioterapia e / ou quimioterapia com estes agentes pode ser eficaz no tratamento da doença (TAKESHIMA et al.; 2010; OKAMOTO et al., 2000). Tano et al. (2013) relataram que pacientes que recebem tratamento radio e/ou quimioterápico em conjunto com agente imunoterápico (OK-432), tiveram uma regressão do CECO sem a necessidade de ressecção cirúrgica (TANO et al., 2013). Estes autores observaram ainda que o uso da imunoterapia associada com radiação X e ao agente químico 5-fluorouracil em cultura de células pode aumentar a resposta imune tipo Th1 e inibir a produção de TGF- β e IL-10 (TANO et al., 2013). Desta forma, tem sido proposto que CECO é um excelente candidato para imunoterapia, pela sua acessibilidade e susceptibilidade à imunomodulação (TANO et al., 2013).

Embora estudos prévios tenham demonstrado o papel do TGF- β 2 na patogênese de algumas neoplasias malignas (MA et al., 2013; VAGENAS et al., 2007; TSAMANDAS et al., 2004; KJELLMAN et al., 2000; VAN BELLE et al., 1996), nenhum estudo avaliou a expressão desta isoforma de TGF- β em CECO. Adicionalmente, até o presente momento nenhum estudo avaliou comparativamente a expressão das proteínas TGF- β 1, TGF- β 2 e IL-10 em CECO e relação destas com fatores clínicos (estadiamento clínico, metástase em linfonodo cervical, tempo de sobrevida, recidiva e localização do tumor primário) e microscópicos (gradação histológica de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e profundidade de invasão) de prognóstico desta neoplasia.

2.3 BIOMARCADORES SALIVARES

A saliva é um fluido corporal que está em íntimo contato com lesões neoplásicas orais e tem apresentado atenção especial no diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento de doenças (ARELLANO-GARCIA et al., 2008; KAMATANI et al., 2013; KOROSTOFF et al., 2011). A técnica de coleta é rápida, simples de ser realizada e apresenta baixos custos. Esse fluido contém diversas proteínas, peptídeos, DNA, metabólitos que além de serem importantes para a manutenção da homeostasia da cavidade oral também foram propostos como potenciais biomarcadores para o câncer oral (ARELLANO-GARCIA et al., 2008; ELASHOFF et al., 2012; HU et al., 2005; KAMATANI et al., 2013; KOROSTOFF et al., 2011).

Neste contexto, algumas moléculas salivares já foram descritas como biomarcador promissor no CECO (ARELLANO-GARCIA et al., 2008; ELASHOFF et al., 2012, RHODUS et al., 2005), sendo o método de ELISA considerado eficaz tão quanto métodos mais modernos como Luminex na avaliação da especificidade e sensibilidade detas moléculas (ARELLANO-GARCIA et al., 2008). Por exemplo, Juretic et al. (2012) demonstraram que pacientes com CEC de boca tem uma concentração salivar significativamente maior de TNF- α e IL-6 do que indivíduos saudáveis (grupo controle), sugerindo que essas citocinas pró-inflamatórias possam ser usadas como marcador de diagnóstico e prognóstico das lesões (JURECTI et al., 2012). Em consonância, Sato et al. (2006) demonstraram que a concentração de IL-6 na saliva de pacientes com CEC de boca é significativamente maior do que no grupo controle. Estes autores demonstraram, ainda, que nos pacientes com CECO os níveis salivares de IL-6 apresentavam uma tendência de aumento antes do tratamento cirúrgico do tumor e retornando ao nível basal após o tratamento (SATO et al., 2006). Sahed Jamee et al. (2008) demonstraram que o nível salivar de TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IL-8 foi maior nos pacientes com CECO do que nos indivíduos saudáveis, porém só houve diferença estatisticamente significativa para IL-6. Dessa forma, os autores propõem que investigações adicionais devem ser realizadas para aceitar a utilidade dessas citocinas como biomarcadores no câncer de boca (SAHEDJAMEE et al., 2008).

Tendo como foco de estudo o carcinoma de língua, Korostoff et al. (2011) mostraram que os níveis salivares de IL-1 α , IL-6, TNF- α e VEGF foram significativamente elevados em pacientes com câncer quando comparado aos

indivíduos controle fumantes e etilistas. Desta forma, esses autores propõem que essas citocinas têm importante potencial no diagnóstico precoce, monitoramento e estabelecimento do tratamento desta neoplasia (KOROSTOFF et al., 2011). Mais recentemente, Kamatani et al. (2013), demonstraram que a concentração de IL-1 β na saliva de pacientes com CECO foi significativamente maior antes do tratamento do que após o tratamento, porém eles também sugerem que mais estudos sejam necessários para uma adequada conclusão de seus resultados (KAMATANI et al., 2013). Adicionalmente, Hamzavi et al. (2013) demonstraram que há uma alta expressão de IL-10 (86,6% das amostras de tumor) em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (22 casos de carcinoma de laringe e 8 casos de carcinoma de cavidade oral), através da técnica de imuno-histoquímica; no entanto, eles não evidenciaram nenhuma diferença significativa entre níveis salivares de IL-10, ao comparar os pacientes com o grupo controle, utilizando a técnica de ELISA (HAMZAVI et al., 2013).

Conforme exposto acima, vários têm sido os biomarcadores associados ao CECO. No entanto, para o nosso conhecimento até o presente momento há poucos estudos que avaliam a concentração das citocinas IL-10 e TGF- β na saliva de pacientes com essa neoplasia.

3 JUSTIFICATIVA

O presente trabalho foi proposto tomando como base:

- A elevada taxa de mortalidade e morbidade do CECO, em particular no Estado de Goiás (INCA, 2014), e a necessidade da busca de marcadores de predição do comportamento dessa neoplasia;
- A participação das proteínas TGF- β e IL-10 no microambiente tumoral promovendo uma imunossupressão local que pode ser utilizada pelas células neoplásicas para escapar da imunidade antitumoral;
- A associação do TGF- β com um pior prognóstico em pacientes com carcinoma de esôfago, gástrico, mama, hepatocelular, pulmão, próstata, pâncreas, carcinoma adenoide cístico, carcinoma colorretal, gliomas e melanomas avançados e da IL-10 em casos de carcinoma de esôfago, pulmão, hepatocelular, ovário, e em melanoma.
- Escassos estudos avaliando a concentração salivar das proteínas TGF- β e IL-10 em pacientes com CECO.
- Escassos estudos avaliando a significância clínico-patológica das proteínas TGF- β 1 e IL-10 em pacientes com CECO e ausência de estudos avaliando a isoforma TGF- β 2 nesta neoplasia;

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão tecidual e salivar das citocinas TGF- β e IL-10 em pacientes com CECO e associar essa expressão com fatores clínicos e microscópicos de prognóstico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar comparativamente a expressão tecidual do TGF- β (isoformas 1 e 2) e IL-10 em amostras de CECO e mucosa bucal saudável (controle).
- II. Investigar a expressão dessas citocinas em linfonodos cervicais metastáticos dos pacientes com CECO;
- III. Avaliar a concentração salivar de TGF- β e IL-10 em pacientes com CECO e comparar com aquela de indivíduos saudáveis (controle);
- IV. Investigar a associação do TGF- β (isoformas 1 e 2) e IL-10 com fatores clínicos (estadiamento clínico, metástase em linfonodo cervical, tempo de sobrevida, recidiva e localização do tumor primário) e microscópicos (gradação histológica de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e profundidade de invasão) de prognóstico do CECO.

5 METODOLOGIA

Para melhor compreensão da metodologia empregada, o presente estudo foi dividido em duas etapas:

5.1 ETAPA I

5.1.1 Seleção dos pacientes e controle

A etapa I deste estudo foi prospectiva. Foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo número 87/2007-Anexo A - *Emenda ao CEP inserindo as investigações do presente estudo foram feitas e aprovadas em 04/2013*). Todos os sujeitos participantes dessa etapa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Para realização desta etapa, foram selecionados amostras de tecido e saliva de 22 pacientes com diagnóstico histopatológico de CECO e saliva de 23 indivíduos saudáveis (grupo controle) do Projeto de Oncologia e Clínica de Semiologia/Patologia da FO/UFMG (anos de 2007 e 2013). Foram incluídos como indivíduos clinicamente saudáveis (grupo controle) aqueles atendidos na mesma instituição, em consultas de rotina ou que estivessem como acompanhantes. Era feito o exame físico da mucosa bucal antes da coleta da saliva. Amostras de mucosa oral clinicamente e histologicamente normal (n=10, Controle) também foram incluídos no estudo. Foram excluídos desta pesquisa os pacientes e controles que apresentavam sinais de morbidade, problemas de saúde como doença auto-imune, HIV, tabagistas, alteração da função renal, insuficiência cardíaca congestiva, infecção ativa, hepatite e outros tipos de carcinoma.

Os dados demográficos e clinicopatológicos como idade, sexo, etnia, tabagismo e consumo de álcool (sim ou não), localização, gradação tumoral segundo OMS (PINDBORG & WAHI, 1997), estágio T e metástase (sim ou não) foram obtidos junto aos prontuários médicos de atendimento e, quando necessário, em consulta aos laudos e lâminas.

5.1.2 Coleta da saliva

A coleta de saliva foi realizada após o diagnóstico clínico de CECO. Os participantes foram instruídos a não comer, beber, fumar ou realizar procedimentos de higiene oral por pelo menos 1 hora antes de a coleta de saliva. Para coleta, um

cotonete de algodão (Salivette®, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Oberbergischer Kreis, Alemanha) foi inserido na boca dos participantes por um período de 5 minutos. A amostra de saliva foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm a 4°C. Posteriormente, a saliva foi transferida para um tubo e diluída (1:1) numa solução salina tamponada com fosfato (PBS) (0,4 mM de NaCl e 10 mM de NaPO₄) contendo inibidores de protease (0,1 mM PMSF; 0,1 mM de cloreto de benzetônio; 10 mM de EDTA; 0,01 mg/mL de aprotinina A) e 0,05% de Tween-20. A solução foi homogenizada e congelada a -80°C até o momento da análise pelo ELISA.

5.1.3 Técnicas empregadas

5.1.3.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

As reações de ELISA (método direto) foram realizadas utilizando os Kits TGF-β1 (DY240, DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e IL-10 (DY217BE, DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as especificações do fabricante: inicialmente, pipetou-se 100 µL/poço da solução calibradora ou das amostras em um placa de 96 poços fornecida pelo fabricante. Em seguida, incubou-se a placa a 2-8°C por 16-20 horas, sem agitação. Depois, lavaram-se os poços 5 vezes com tampão de lavagem, adicionou-se 100 µL/poço da solução conjugada e incubou-se a placa à temperatura ambiente por 1 hora, agitando a 300 rpm num agitador orbital. Posteriormente, foi feita uma nova lavagem, adicionou-se 100 µL/poço do substrato, incubou-se a placa à temperatura ambiente por 25 minutos ao abrigo da luz. Finalmente, pipetou-se 100 µL/poço da solução stop e determinou-se a absorbância de cada poço (comprimento de onda: 450nm), utilizando um espectrofotômetro (*Molecular Devices; Spectra Max 190, USA*).

5.1.3.2 Técnica de rotina (hematoxilina e eosina)

Os espécimes selecionados, fixados previamente em solução tamponada de formol a 10% (pH 7,4), foram incluídos em parafina e posteriormente seccionados em micrótomo (Leica RM2165). Obteve-se de cada bloco cortes consecutivos de 5 µm, colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE). Esses cortes foram utilizados para caracterização microscópica de todas as amostras de CECO primários, classificados conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS) (PINDBORG et al., 1997).

5.1.3.3 Técnica imuno-histoquímica

A partir dos casos selecionados, emblocados em parafina, foram obtidos cortes seriados com aproximadamente 3µm de espessura, em micrótomo (Leica RM2165), montados em lâminas silanizadas e submetidos à técnica da imuno-histoquímica. Para o antígeno TGF-β1 utilizou-se o método da estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, kit, K0492, Dako), enquanto que para o antígeno IL-10 utilizou-se o método de polímeros (Kit Envision). Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados em xilol e hidratados em banhos crescentes de álcool etílico. Para exposição antigênica das proteínas TGF-β1 e IL-10 as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH=6.0), aquecido à uma temperatura de 95°C, com auxílio de Banho Maria Digital (DeLeo), por 25 minutos. Após lavagem com TBS, as lâminas foram mergulhadas em peróxido de hidrogênio a 3% e posteriormente incubadas com os anticorpos primários descritos na **Tabela 1** com incubação “overnight”. Em seguida, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina, por 30 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck). Todos os anticorpos utilizados foram previamente submetidos a testes para padronização. Controles positivos: expressão positiva do TGF-β1 em parede muscular de arteríolas e da IL-10 nas células imune-inflamatórias das amostras de CECO. Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por solução salina tamponada com fosfato (PBS; NaCl 0,4 mM , NaPO₄ 10 mM) contendo 1% de soro albumina bovino (BSA) e por soro não-imune de coelho (X0902 ,DAKO) ou camundongo (X501-1, DAKO).

Tabela 1. Representa a lista de anticorpos com seus respectivos clones e fabricantes

Anticorpos	Clones	Diluição	Fabricantes
Monoclonal de camundongo anti – TGF-β1 humano	sc130348	1:50	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Monoclonal de camundongo anti – IL10 humano	ab34843,	1:300	Abcam Inc, MA, EUA

5.1.4 Análise qualitativa e quantitativa dos dados

5.1.4.1 Concentração salivar de TGF- β 1 e IL-10

As concentrações salivares destas citocinas foram expressas em pg/mg. A concentração da proteína total (método de Bradford) foi utilizada para corrigir os valores do TGF- β 1 e IL-10 para cada amostra de saliva.

Para analisar a associação entre as concentrações salivares de IL-10 e TGF- β 1 com dados demográficos e clínico-patológicos, o valor médio foi estabelecido. Classificou-se como "baixa expressão" o valor igual ou menor do que a mediana e "alta expressão" o valor maior do que a mediana.

5.1.4.2 Expressão tecidual de TGF- β 1 e IL-10

Avaliou-se a expressão tecidual de TGF- β 1 e IL-10 em células tumorais e do infiltrado imune-inflamatório presentes no estroma do CECO. A quantificação destas citocinas foi determinada em células neoplásicas (parênquima tumoral) e células imune-inflamatórias no estroma próximo a frente de invasão do CECO (região peritumoral).

Avaliação semi-quantitativa foi realizada de acordo com Gonçalves et al. (2014) onde a porcentagem de células tumorais positivas (PP) foi classificada como segue: 0, ausência de células tumorais coradas; 1, < 25 % de células coradas; e 2, \geq 25 % de células coradas. A intensidade da coloração (SI) também foi classificada como se segue: 0, sem imunomarcção; 1, imunomarcção fraca; 2, imunomarcção moderada; e 3, de imunomarcção forte. O escore de imunomarcção (*immunoreactive score*) (IRS) foi calculado multiplicando a porcentagem de células positivas (PP, marcou 0-2) pela intensidade da coloração (SI, marcou 0-3). A expressão de TGF- β 1 e IL-10 em tumores com um IRS = 0 foi considerada ausente, IRS \leq 2 foi considerada baixa, enquanto os tumores com um IRS > 2 tiveram uma alta expressão. Todas as secções foram analisadas de forma cega usando um microscópio de luz com campos de alta potência (400X).

5.1.5 Análise estatística dos dados

Para análise comparativa da concentração salivar de TGF- β 1 e IL-10 entre pacientes com CECO e os indivíduos saudáveis (grupo controle), foi utilizado o teste de Mann-Whitney, uma vez que o teste de Shapiro-Wilk revelou uma distribuição

não-normal para os dados. Para a análise dos dados categóricos (referentes à expressão das citocinas TGF- β 1 e IL10) no grupo CECO foi utilizado o teste estatístico Pearson χ^2 . Análises descritivas foram expressas como mediana (valores mínimos-máximos).

O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram aplicados utilizando-se os programas IBM SPSS 20.0 (IBM Corporation, New York, USA) e Prism (GrahPad Prism 5; GrahPad Software, California, USA).

5.2 ETAPA II

5.2.1 Obtenção, seleção e caracterização da amostra

A etapa II deste estudo foi retrospectiva. Foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge/ Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG) (protocolo número 008/2010 – Anexo B). Para esta etapa, foram selecionadas dos arquivos de blocos e laudos do Laboratório de Patologia do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG) aproximadamente 43 amostras de CECO de pacientes diagnosticados, tratados e acompanhados no Serviço de cabeça e pescoço do HAJ. Os linfonodos desses pacientes foram avaliados microscopicamente e aqueles metastáticos (23 pacientes) foram selecionados para este estudo. Foram incluídas também 20 amostras de mucosa oral clínica e histologicamente normais, as quais foram obtidas a partir do Centro Goiano de Doenças da Boca do Estado de Goiás (Laboratório de Patologia Bucal) da Universidade Federal de Goiás, Brasil.

Foram incluídos no estudo, pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico (remoção da lesão e de linfonodos cervicais) e com tempo de acompanhamento mínimo de 24 meses. O estadiamento clínico T e N foi estabelecido conforme a classificação adotada pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) (EDGE et al., 2010). Foram coletados dos prontuários médicos os dados clinico-demográficos como idade, sexo, etnia, consumo de álcool e tabaco (sim ou não), bem como informações de acompanhamento, incluindo o tempo de sobrevivência, dados de recidiva e mortalidade. Como critérios de exclusão consideraram-se: lâminas e blocos defeituosos, os quais impossibilitavam a análise; CECs de outras localizações; casos sem seguimento clínico e com fichas incompletas e, por fim,

casos que foram submetidos a tratamentos prévios (quimioterápicos, radioterapia etc) e recidivas.

5.2.2 Técnicas empregadas

5.2.2.1 Técnica de rotina (hematoxilina e eosina)

Os espécimes selecionados, fixados previamente em solução tamponada de formol a 10% (pH 7,4), foram incluídos em parafina e posteriormente seccionados em micrótomo (Leica RM2165). Obteve-se de cada bloco cortes consecutivos de 5 μ m, colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE). Esses cortes foram utilizados para caracterização microscópica de todas as amostras, sendo que todas as secções de linfonodos foram avaliadas para a presença de metástase e as de CECO primários foram classificadas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (PINDBORG et al., 1997). A profundidade de invasão (por mm) foi avaliada por meio de uma régua milimetrada ligada a um microscópio de luz (100X), que nos permitiu investigar a profundidade da invasão tumoral a partir da superfície do epitélio até a frente mais profunda da invasão.

5.2.2.2 Técnica imuno-histoquímica

A partir dos casos selecionados, emblocados em parafina, foram obtidos cortes seriados com aproximadamente 3 μ m de espessura, em micrótomo (Leica), montados em lâminas silanizadas e submetidos à técnica da imuno-histoquímica. Utilizou-se o método de polímeros (Kit Envision) para os antígenos IL-10 e TGF- β 2. Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados em xilol e hidratados em banhos crescentes de álcool etílico. Para exposição antigênica da proteína IL-10 as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH=6.0), enquanto que para a proteína TGF- β 2 utilizou-se o tampão EDTA (pH=9.0), ambos aquecidos à uma temperatura de 95°C, com auxílio de Banho Maria Digital (DeLeo), por 25 minutos. Após lavagem com TBS, as lâminas foram mergulhadas em peróxido de hidrogênio a 3% e posteriormente incubadas com os anticorpos primários descritos na **Tabela 2** com incubação “overnight”. Em seguida, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina, por 30 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas

com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck). Todos os anticorpos utilizados foram previamente submetidos a testes para padronização. Controles positivos: expressão positiva da IL-10 nas células imune-inflamatórias das amostras de CECO e do TGF- β 2 nas células neoplásicas do carcinoma gástrico. Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por solução salina tamponada com fosfato (PBS; NaCl 0,4 mM , NaPO₄ 10 mM) contendo 1% de soro albumina bovino (BSA) e por soro não-imune de coelho (X0902 ,DAKO) ou camundongo (X501-1, DAKO).

Tabela 2. Representa a lista de anticorpos com seus respectivos clones e fabricantes

Anticorpos	Clones	Diluição	Fabricantes
Monoclonal de coelho anti – TGF- β 2 humano	sc90	1:100	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Monoclonal de camundongo anti – IL10 humano	ab34843,	1:300	Abcam Inc, MA, EUA

5.2.3 Análise qualitativa e quantitativa dos dados

Avaliou-se a expressão das citocinas IL-10 e TGF- β 2 em células tumorais e do infiltrado imune-inflamatório presentes no estroma do CECO, bem como na região epitelial e de tecido conjuntivo das amostras de mucosa bucal saudável. Em adição, essas citocinas também foram avaliadas nas amostras de linfonodos metastáticos (células tumorais metastáticas) de pacientes com CECO.

A quantificação das citocinas IL-10 e TGF- β 2 foi determinada em células neoplásicas (parênquima tumoral) e células imune-inflamatórias e fibroblastos presentes no estroma próximo a frente de invasão do CECO (região peritumoral), bem como no tecido epitelial e conjuntivo das amostras de mucosa oral clinicamente e histologicamente normal (Controles).

Avaliação semi-quantitativa foi realizada de acordo com Gonçalves et al. (2014) onde a porcentagem de células tumorais positivas (PP) foi classificada como segue: 0, ausência de células tumorais coradas; 1, < 25 % de células coradas; e 2, \geq 25 % de células coradas. A intensidade da coloração (SI) também foi classificada

como se segue: 0, sem imunomarcção; 1, imunomarcção fraca; 2, imunomarcção moderada; e 3, de imunomarcção forte. O escore de imunomarcção (*immunoreactive score*) (IRS) foi calculado multiplicando a percentagem de células positivas (PP, marcou 0-2) pela intensidade da coloração (SI, marcou 0-3). A expressão de IL-10 e TGF- β 2 em tumores com um IRS = 0 foi considerada ausente, IRS \leq 2 foi considerada baixa, enquanto os tumores com um IRS > 2 tiveram uma alta expressão. Todas as secções foram analisadas de forma cega usando um microscópio de luz com campos de alta potência (400X).

5.2.4 Análise estatística dos dados

O teste de Shapiro-Wilk revelou uma distribuição não-normal de dados. Para a análise dos dados categóricos (referentes à expressão das citocinas IL10 e TGF- β 2) nos grupos de CECO e Controle foi utilizado o teste estatístico Pearson χ^2 . Já para a análise comparativa dos dados numéricos (idade, tempo de sobrevida e profundidade de invasão) utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

A influência da expressão das citocinas IL10 e TGF- β 2 na sobrevida de pacientes com CECO foi avaliada através do teste de Kaplan-Meier seguido pelo teste Long Rank. O tempo de sobrevida foi calculado a partir da ressecção cirúrgica, até a última data de acompanhamento ou morte do paciente.

O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram aplicados utilizando-se os programas IBM SPSS 20.0 (IBM Corporation, New York, USA) e Prism (GrahPad Prism 5; GrahPad Software, California, USA).

6 RESULTADOS

6.1 ETAPA I

Os resultados demográficos e clínico-patológicas do nosso grupo de pacientes com CECO (n=22) estão apresentados na **Tabela 1**. Foram incluídas nesta etapa: amostras tecidual e salivar dos pacientes com CECO (n=22), amostras de saliva de indivíduos saudáveis (n=23) e amostras de mucosa oral clinicamente e histologicamente normais (n=10).

A média de idade dos pacientes foi de 55 anos (IC: 16-78), o gênero masculino foi predominante (68%) e 90% dos pacientes eram fumantes e etilistas. A língua e assoalho bucal foram os sítios tumorais mais comuns, representando 86% dos casos. Sete tumores foram classificados como bem diferenciado (32%), 6 moderadamente diferenciado (27%) e 9 pouco diferenciado (41%). A amostra total foi de 22 pacientes com CECO, mas apenas 19 tiveram um tempo de acompanhamento clínico de 6 meses após a cirurgia para remoção do tumor, enquanto os outros três faleceram após um tempo de sobrevivência médio de 5 meses, e estes três pacientes tiveram metástase.

A coloração por imuno-histoquímica mostrou que as células IL-10⁺ e TGF- β 1⁺ exibiram um padrão de coloração citoplasmática acastanhado e homogêneo (**Figura 1**). Nossos resultados mostraram também que essas citocinas foram expressas pelas células neoplásicas (parênquima tumoral) e células imuno-inflamatórias, como linfócitos, distribuídos de forma difusa ao longo do estroma tumoral. No que diz respeito a TGF- β 1, observamos que esta proteína foi predominantemente expressa em parede muscular lisa das arteríolas (**Figura 1**).

No microambiente tumoral, observou-se elevada expressão (IRS > 2) de IL-10 (em células neoplásicas e imune-inflamatórias) em 91% (20 amostras) dos casos de CECO analisados (**Figura 1 e Tabela 3**). Com relação ao TGF- β 1, observou-se expressão ausente ou baixa dessa citocina em células neoplásicas e imuno-inflamatórias em 86% das amostras de CECO (**Figura 1 e Tabela 3**). Em amostras de mucosa oral saudáveis (n = 10), 100% das amostras apresentaram expressão ausente ou muito baixa para a IL-10 e TGF- β 1 (**Figura 1 e Tabela 3**).

Em relação à concentração salivar de IL-10 e TGF- β 1, nossos resultados mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparamos os pacientes com CECO e indivíduos saudáveis (grupo controle), apenas para IL-10 ($P = 0,04$) (**Tabela 2**). Já a concentração de TGF- β 1 na saliva ($P = 0,97$) não apresentou diferença estatisticamente significativa (**Tabela 2**).

Para analisar a associação entre as concentrações salivares de IL-10 e TGF- β 1 com dados demográficos e clínico-patológicos, o valor médio foi estabelecido. Classificou-se como "baixa expressão" o valor igual ou menor do que a mediana e "alta expressão" o valor maior do que a mediana (IL-10, mediana = 0,037 e TGF- β 1, mediana = 0,027). Não houve associação significativa entre a concentração dessas proteínas na saliva com as características analisadas dos casos de CECO, ou seja, idade, sexo, etnia, consumo de álcool e tabaco, localização do tumor, grau de diferenciação (OMS), o estágio T e metástase. No entanto, a concentração de IL-10 salivar foi significativamente relacionada com o grau de diferenciação (OMS), isto é, quanto mais pobremente diferenciado o tumor, maior a concentração de IL-10 na saliva ($P = 0,04$) (**Figura 2 e Tabela 1**).

Em resumo, nós demonstramos uma alta expressão de IL-10 no microambiente tumoral e que a concentração desta proteína na saliva nos permitiu distinguir os pacientes com CECO dos indivíduos saudáveis (grupo controle), uma vez que houve uma diferença estatisticamente significativa ($P = 0,04$). Com relação ao TGF- β 1, foi evidenciada uma expressão ausente ou baixa dessa proteína em células neoplásicas. Nenhuma diferença foi observada quando comparado a concentração de TGF- β 1 na saliva de pacientes com CECO e grupo controle ($P = 0,97$).

Tabela 1. Parâmetros demográficos e clinicopatológicos de pacientes com CECO ($n=22$) e associação destes parâmetros com as concentrações salivares da IL-10 e TGF- β 1.

Parâmetros demográficos e clinicopatológicos	CECO <i>n de amostras</i> (%)	IL-10 Valor P	TGF-β1 Valor P
Idade			
≤ 55 anos	11 (50)	1,0	1,0
> 55 anos	11 (50)		
Gênero			
Masculino	15 (68)	1,0	1,0
Feminino	7 (32)		
Grupo étnico			
Leucoderma	16 (73)	0,62	0,15
Não leucoderma	6 (27)		
Álcool			
Sim	20 (90)	1,0	1,0
Não	2 (10)		
Tabaco			
Sim	20 (90)	1,0	1,0
Não	2 (10)		
Localização			
Língua	9 (41)	0,21	0,21
Soalho de boca	10 (45)		
Outros	3 (14)		
Gradação Histológica (OMS)			
Bem diferenciado	7 (32)	0,04*	0,88
Moderadamente diferenciado	6 (27)		
Pobremente diferenciado	9 (41)		
Estágio T			
T1- T2	7 (30)	0,72	0,78
T3- T4	15 (70)		
Metástase (N)			
Sim	12 (54)	0,67	1,0
Não	10 (46)		

CECO – Carcinoma espinocelular de cavidade oral

(OMS) Organização Mundial de Saúde

(*) Indica diferença estatisticamente significativa (Pearson χ^2 test; $P < 0,05$)

Tabela 2. Concentrações salivares da IL-10 e TGF- β 1 em pacientes com CECO e indivíduos saudáveis (grupo controle) (mediana; valores mínimo-máximo)

Concentrações Salivares	CECO (n=22)	Controle (n=23)	Valor P
IL-10 (pg/mg proteína total)	0,037 (0,011- 0,283)	0,027 (0,006- 0,094)	0,04*
TGF- β 1 (pg/mg proteína total)	0,037 (0,002- 0,852)	0,041 (0,0- 0,380)	0,97

(*) representa diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney test; $P < 0,05$)

Tabela 3. Porcentagem de amostras em relação às categorias de imunoexpressão (ausente, baixa e alta expressão) dos marcadores IL-10 e TGF- β 1 em células neoplásicas do CECO (n=22) e células epiteliais do controle (n=10).

Marcadores	Amostras	IRS = 0 (%) (Ausência de expressão)	IRS \leq 2 (%) (Baixa expressão)	IRS > 2 (%) (Alta expressão)	Valor P
IL-10	CECO	4,5	4,5	91,0	0,01*
	Controle	20,0	80,0	-	
TGF- β 1	CECO	68,0	18,0	14,0	0,22
	Controle	60,0	40,0	-	

(*) indica uma diferença estatisticamente significativa (Pearson χ^2 test; $P < 0,05$)

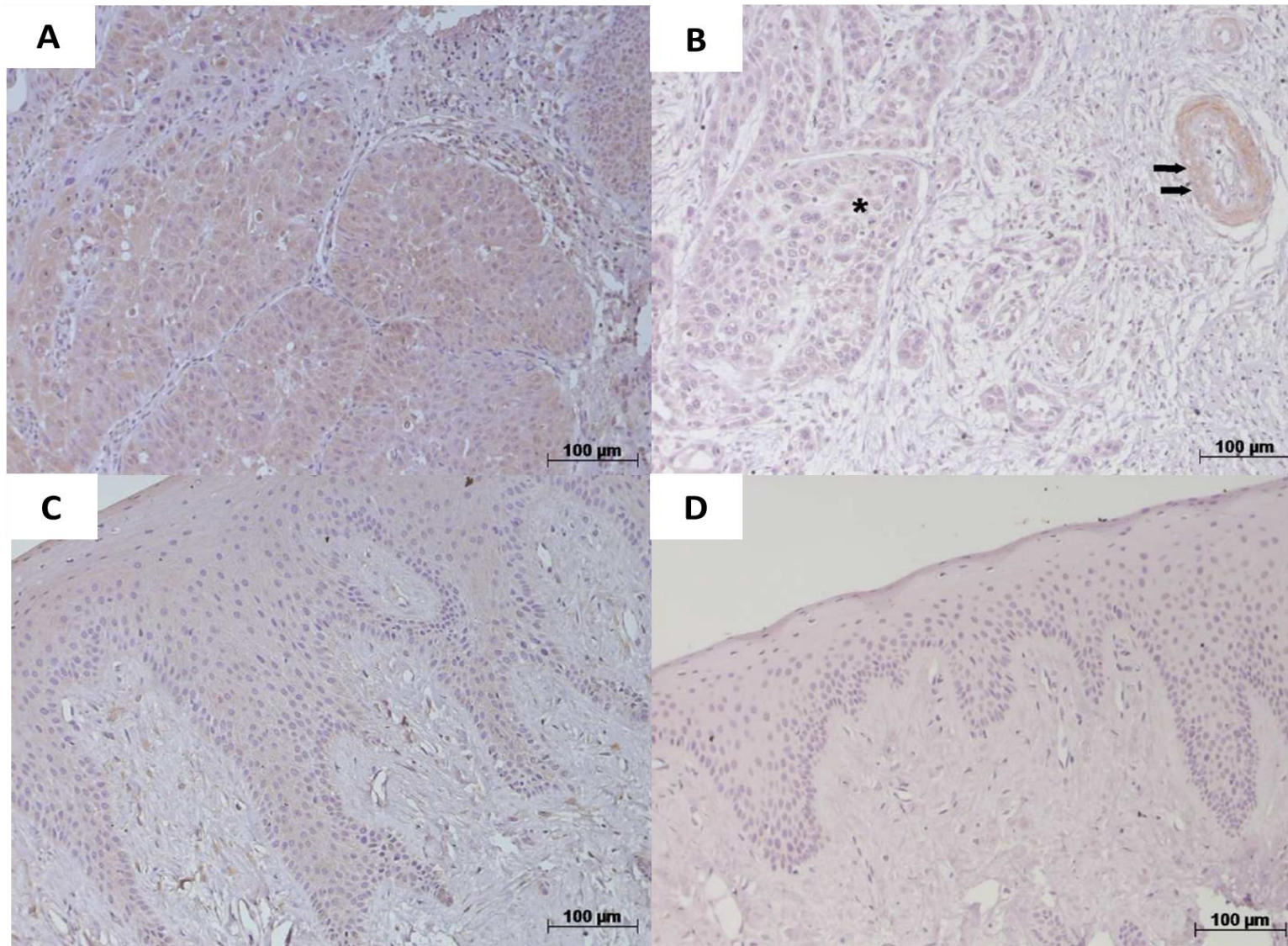


Figura 1. Amostras de pacientes com CECO (A-B) que mostram uma porcentagem elevada células neoplásicas IL-10⁺ (A) e com coloração intensa (IRS > 2). Expressão de TGF-β1 (B) em paredes das arteríolas do músculo liso (seta) e baixa expressão em células neoplásicas (*) (IRS ≤ 2). Baixa expressão de IL-10 (C) (IRS ≤ 2) e ausência de expressão de TGF-β1(D) pelas células epiteliais das amostras de mucosa saudável (grupo de controle) por via oral. Coloração imuno-histoquímica, aumento de 200x (escala = 100 μm) (A-D).

6.1.2 PUBLICAÇÃO I

TÍTULO: **Immunosuppressive mediators of oral squamous cell carcinoma in tumour samples and saliva**

Artigo publicado no periódico **Human Immunology** (Normas - Anexo C).

Link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25500427>

*** Embora os resultados referentes à biomolécula HLA-G tenham sido adicionados nesta publicação, estes foram apresentados em um trabalho prévio¹.**

Andréia Souza Gonçalves^a, Diego Antonio Costa Arantes^b, Vanessa Fátima Bernardes^c, Filipe Jaeger^d, Janine Mayra Silva^e, Tarcília Aparecida Silva^f, Maria Cássia Ferreira Aguiar^g, Aline Carvalho Batista^h

^aDepartment of Stomatology (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil; E-mail: andreia.sg.odonto@gmail.com

^bDepartment of Stomatology (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil; E-mail: diegoantonio_arantes@hotmail.com

^cDepartment of Pathology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; E-mail: bernardesvf@hotmail.com

^dDepartment of Oral Surgery and Pathology, Dental School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; E-mail: filipejaeger@gmail.com

^eDepartment of Oral Surgery and Pathology, Dental School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; E-mail: janinesilva@hotmail.com

^fDepartment of Oral Surgery and Pathology, Dental School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; E-mail: tarcilia@odonto.ufmg.br

^gDepartment of Oral Surgery and Pathology, Dental School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; E-mail: cassiafa@ufmg.br

^hDepartment of Stomatology (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil; E-mail: ali.caba@uol.com.br

¹ Andréia de Souza Gonçalves. Avaliação da expressão da molécula HLA-G no microambiente tumoral e na saliva de pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014. Referência seguindo as normas da ABNT NBR 6023:2002

6.2 ETAPA II

Os principais dados clínicos e histológicos encontrados no grupo de 43 pacientes com CECO estão resumidos na **tabela 1**. A análise dos casos revelou um predomínio do gênero masculino (61,36%) com idade média de 58 anos (IC: 24–90), sendo que 79,54% dos pacientes eram fumantes. A língua foi o sítio tumoral mais comum, representando 52,27% dos casos. No que se refere ao último acompanhamento, o tempo de sobrevida médio para estes pacientes foi de 24 meses (IC: 0–138). No momento do diagnóstico, 63,63% dos pacientes com CECO apresentaram metástase regional e 36,37% apresentaram linfonodos cervicais livres de tumor (**Tabela 1**).

Com relação ao grupo controle (n=20), a análise dos casos revelou um predomínio do sexo masculino (85%) com idade média de 32 anos (IC: 18–41), sendo que 100% destes pacientes não eram fumantes. Fragmentos de mucosa lingual e gengival adjacentes a pigmentação fisiológica foram utilizados como tecido saudável.

A técnica de imuno-histoquímica identificou as citocinas IL-10 e TGF- β 2 em citoplasma de células neoplásicas (parênquima tumoral) e células imuno-inflamatórias com morfologia de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (**Figura 1 A-B e D-E**). A expressão destas proteínas foi homogênea considerando o fronte de invasão e a área mais central do tumor (**Figura 1**). A intensidade de coloração (IS) variou de fraco a forte. Notou-se, ainda, expressão de TGF- β 2 em fibroblastos, filetes nervosos, parede muscular lisa de arteríolas e capilares (**Figura 1 E**).

A análise quantitativa revelou uma alta expressão de IL-10 (IRS > 2) nas células neoplásicas (82,14% dos casos) e estromais (71,42% dos casos) na maioria das amostras de CECO avaliadas. De forma similar, observamos uma elevada expressão do TGF- β 2 (IRS > 2) nas células neoplásicas (87,50% dos casos) e estromais (71,87% dos casos). Essa alta expressão das citocinas IL-10 e TGF- β 2 foi significativamente maior no CECO se comparadas às amostras de mucosa oral saudável (P < 0,05) (**Figura 1 e Tabela 2**).

Considerando a associação da expressão das citocinas imunossupressoras e os parâmetros clínicos e microscópicos de prognóstico do CECO pode-se concluir que a expressão de IL-10 e TGF- β 2 foi similar no grupo de pacientes que

apresentaram metástase linfonodal (n=23) se comparado aquele grupo de pacientes livres de metástase (n=20) (P=0,21 e P=0,30, respectivamente) (**Tabela 1**). Por outro lado, independentemente se o paciente apresentou ou não metástase no momento do diagnóstico, a alta expressão (IRS > 2) da IL-10 e TGF- β 2 no microambiente do tumor primário também foi observada pelas células neoplásicas metastáticas nos linfonodos cervicais em 62,5% (IL-10) e 76,92% (TGF- β 2) dos pacientes com CECO que desenvolveram metástase (**Figura. 2, A- D**).

Para as análises de sobrevida, a expressão das citocinas IL-10 e TGF- β 2 foi dicotomizada em dois grupos: ausente ou baixa (IRS \leq 2) e alta expressão (IRS >2). Os resultados demonstraram que pacientes com IRS \leq 2 apresentaram um tempo de sobrevida médio de 38 \pm 50,1 (IL-10) e 33 \pm 28,8 (TGF- β 2) meses enquanto pacientes com IRS > 2 apresentaram um tempo de sobrevida médio de 35 \pm 43,4 (IL-10) e 32 \pm 39,8 (TGF- β 2) meses. O teste de log-rank não evidenciou relação da expressão destas citocinas com a sobrevida (P>0,05).

No que se refere ao estadiamento clínico observamos uma associação positiva entre este parâmetro e a alta expressão de IL-10 pelas células neoplásicas (IRS>2) (P=0,02), sendo que o número de casos com um estágio clínico mais avançado (T3-T4) e com alta expressão de IL-10 (78,27% das amostras) foi significativamente maior do que o número de casos com estágio clínico menor (T1-T2) e com expressão elevada desta citocina (21,73% das amostras). Relação similar foi demonstrada entre o estadiamento clínico e a expressão de TGF- β 2, no entanto não foi confirmada diferença estatisticamente significativa (P=0,42) (**Tabela 1**).

Não houve associação significativa entre a expressão de IL-10 e TGF- β 2 com as demais características clínico-patológicas do CECO avaliadas, ou seja, idade, sexo, etnia, consumo de álcool e tabaco, localização do tumor, profundidade de invasão, estágio T, evolução clínica (recidiva) e gradação histológica (**Tabela 1**).

Tabela 1. Dados demográficos e clinicopatológicos (%) dos pacientes com CECO (n=43) e associação desses achados com a expressão tecidual de IL-10 e TGF- β 2.

Dados demográficos e clinicopatológicos	CCEO <i>n de amostras (%)</i>	IL-10 Valor P	TGF-β2 Valor P
Idade #			
≤ 58 anos	21 (47,72)	0,42	0,65
> 58 anos	22 (52,28)		
Gênero			
Masculino	27 (61,36)	0,64	0,57
Feminino	16 (38,64)		
Grupo étnico			
Leucodermas	24 (56,81)	0,21	0,13
Não-leucodermas	19 (43,19)		
Consumo de Álcool			
Sim	29 (61,36)	0,60	0,17
Não	14 (38,64)		
Tabaco			
Sim	33 (79,54)	0,71	0,31
Não	10 (20,46)		
Localização			
Língua	24 (52,27)	0,57	0,54
Outros sítios	19 (47,73)		
Metástase			
Sim	23 (63,63)	0,21	0,30
Não	20 (36,37)		
Estadiamento clínico (T)			
T1- T2	13 (31,82)	0,02*	0,42
T3- T4	30 (68,18)		
Tempo de sobrevida			
≤ 24 meses	32 (68,19)	0,63	0,70
> 24 meses	11 (31,81)		
Evolução clínica			
Óbitos	27 (56,81)	0,55	0,79
Vivos (sobrevida global)	16 (43,19)		
Recidiva			
Sim	19 (61,36)	0,17	0,18
Não	24 (38,64)		
Gradação histológica (OMS)			
Gradação I- II	26 (59,00)	0,71	0,69
Gradação III- IV	17 (41,00)		

Profundidade de invasão (média= 5.06 mm; 1.25 ± 8.75)			
≤ 5.06 mm	23 (54,54)		
> 5.06 mm	20 (45,46)	0,51	0,57

CECO = carcinoma espinocelular de cavidade oral

OMS = Organização Mundial de Saúde

(*) indica uma diferença estatisticamente significativa (Teste Pearson χ^2 ; $P < 0,05$)

Tabela 2. Porcentagem de amostras em relação às categorias de imunoexpressão (ausente, baixa e alta expressão) das citocinas IL-10 e TGF- β 2 em células neoplásicas e estromais do CECO ($n=43$) se comparado ao grupo controle ($n=20$).

<i>Região</i>	<i>Citocinas</i>	<i>Grupos</i>	<i>Ausência de expressão (IRS = 0) (% de amostras)</i>	<i>Baixa expressão (IRS \leq 2) (% de amostras)</i>	<i>Alta expressão (IRS >2) (% de amostras)</i>	<i>Valor P</i>
<i>Células Epiteliais (CECO x Controle)</i>	<i>IL-10</i>	<i>CECO</i>	0	17,9	82,1	0,013*
		<i>Controle</i>	0	90,9	9,1	
	<i>TGF-β2</i>	<i>CECO</i>	0	12,5	87,5	0,014*
		<i>Controle</i>	21,4	78,6	0	
<i>Células Estromais (CECO x Controle)</i>	<i>IL-10</i>	<i>CECO</i>	0	28,6	71,4	0,013*
		<i>Controle</i>	0	100	0	
	<i>TGF-β2</i>	<i>CECO</i>	3,1	25	71,9	0,012*
		<i>Controle</i>	46,7	26,7	26,6	

(*) indica uma diferença estatisticamente significativa se comparado ao grupo controle (Teste Pearson χ^2 ; $P < 0,05$)

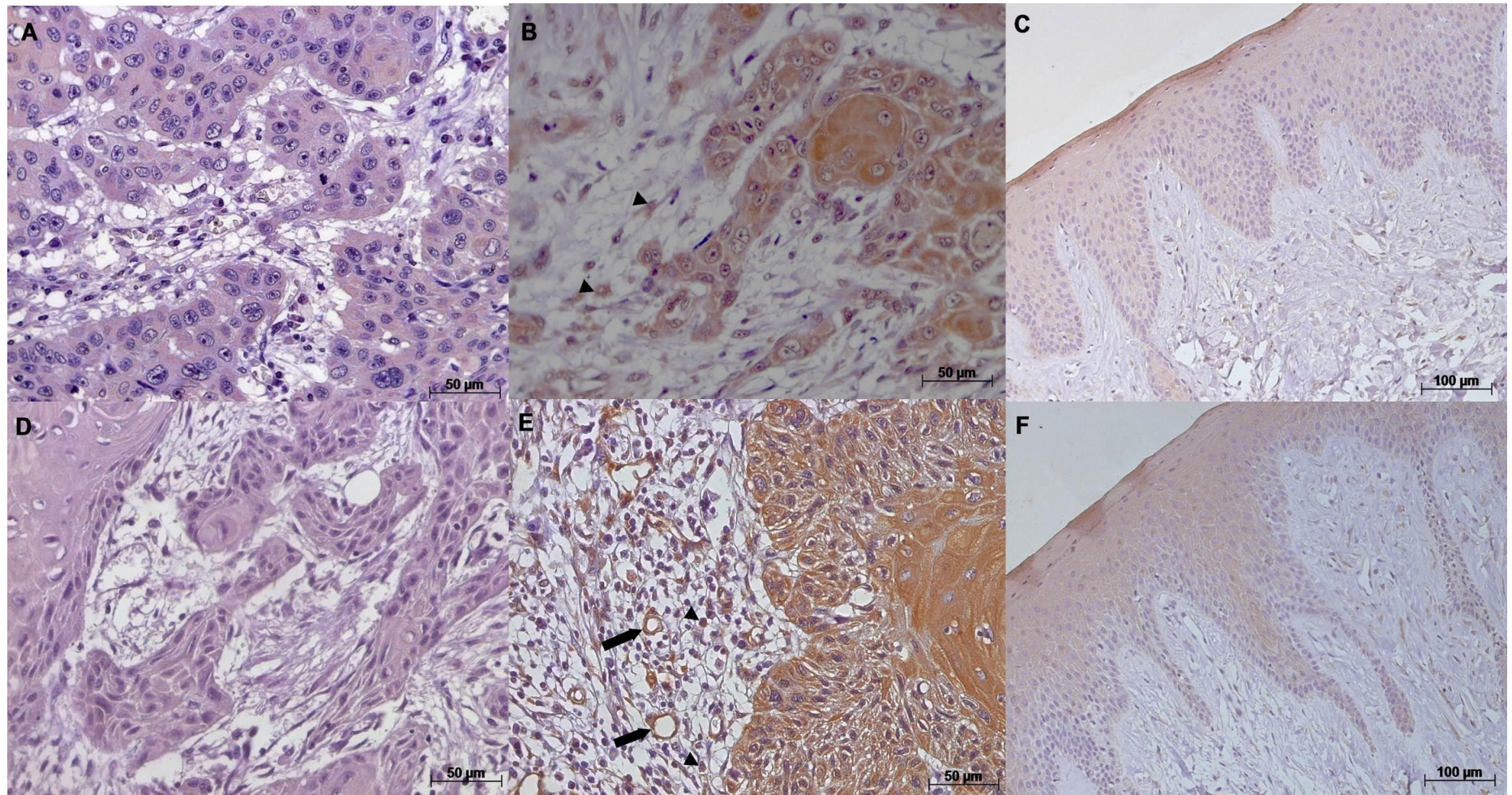


Figura 1 (A - F): Fotomicroscopias apresentando diferentes categorias de imunoexpressão das citocinas IL-10 (A-B) e TGF-β2 (D-E) em CECO: (A) baixa (IRS ≤ 2) e (B) elevada expressão (IRS > 2) da IL-10 nas células neoplásicas e estromais (ponta de seta) de um CECO moderadamente diferenciado. (D) baixa (IRS ≤ 2) e (E) elevada expressão (IRS > 2) do TGF-β2 nas células neoplásicas e estromais (ponta de seta) e em parede muscular lisa de arteríolas (setas) de um CECO bem diferenciado. Fotomicroscopias demonstrando baixa expressão da IL-10 (C) e TGF-β2 (F) (IRS ≤ 2) em mucosa oral saudável. Coloração de imuno-histoquímica. Aumento 200X (C e F) e 400X (A-B e D-E).

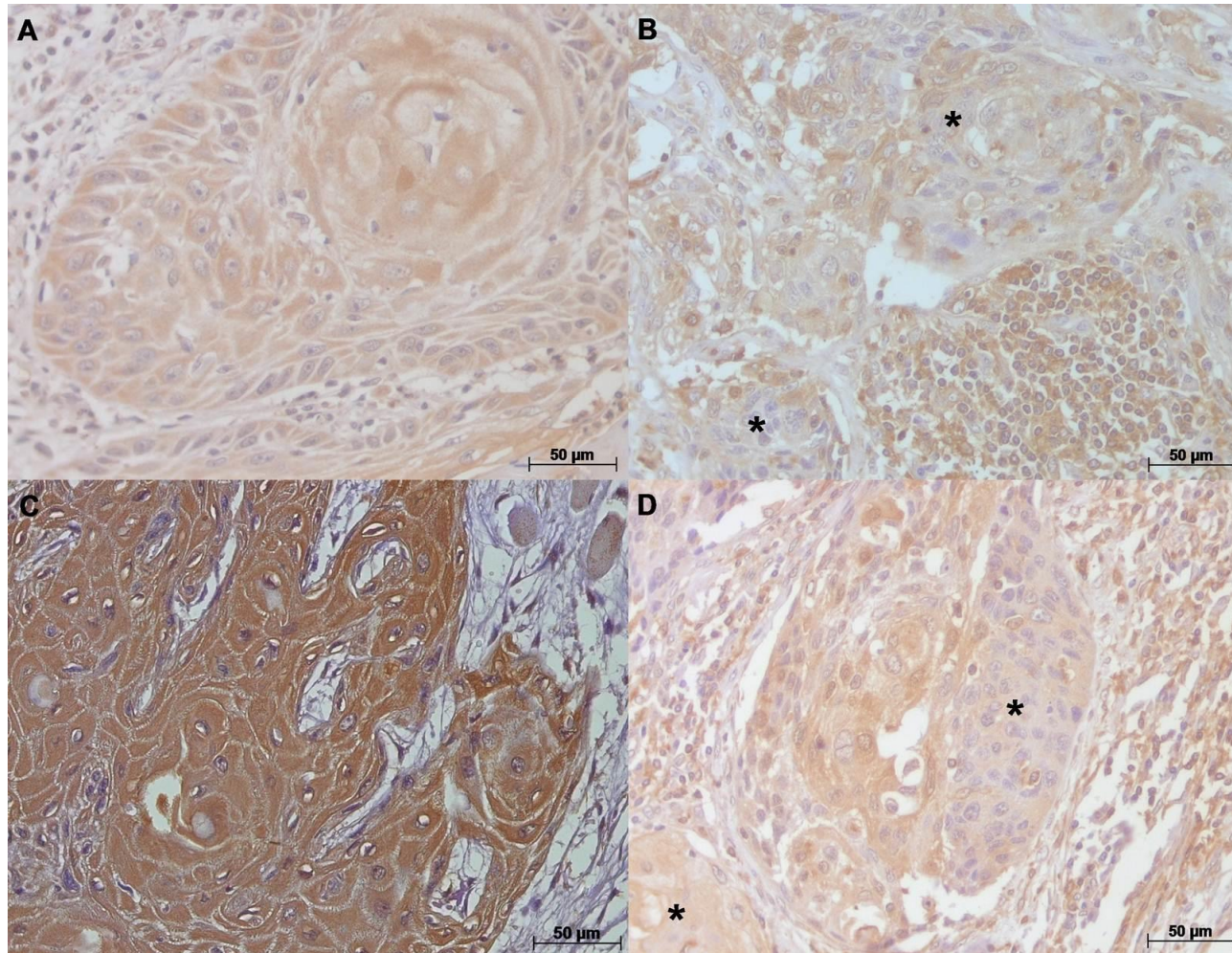


Figura 2 (A - D): Fotomicroscopias demonstrando elevada expressão da IL-10 (IRS > 2) (A) e TGF-β2 (IRS > 2) (C) nas células neoplásicas e estromais de um CECO primário moderadamente diferenciado, as quais são mantidas nos respectivos linfonodos cervicais metastáticos (B - IL-10) e (D - TGF-β2). * Indica células neoplásicas metastáticas em linfonodos cervicais. Coloração imuno-histoquímica. Aumento 400X.

6.2.1 PUBLICAÇÃO II

TÍTULO: Overexpression of immunosuppressive cytokines is associated with poorer clinical stage of oral squamous cell carcinoma

Artigo a ser submetido no periódico **Tumor Biology** (Normas - Anexo D).

Diego Antonio Costa Arantes^a, Nádia Lago Costa^b, Elismauro Francisco Mendonça^c, Tarcília Aparecida Silva^d, Aline Carvalho Batista^e

^aDepartment of Stomatology (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil; E-mail: diegoantonio_arantes@hotmail.com

^bDepartment of Stomatology (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil; E-mail: nadialago@hotmail.com

^cDepartment of Stomatology (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil; E-mail: elismaur@odonto.ufg.br

^dDepartment of Oral Surgery and Pathology, Dental School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; E-mail: tarcilia@odonto.ufmg.br

^eDepartment of Stomatology (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil; E-mail: ali.caba@uol.com.br

Abstract

Interleukin 10 (IL-10) and transforming growth factor β (TGF- β) are immunosuppressive cytokines associated with the clinical progression of tumours. The aim of this study was to evaluate the expression of IL-10 and TGF- β 2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its relationship with prognostic clinical and microscopic parameters. Immunohistochemistry was used to assess the expression of IL-10 and TGF- β 2 in OSCC samples from 43 patients who had undergone surgical excision and neck dissection. Metastatic lymph nodes were included in the study. Samples of healthy oral mucosa (n = 20) were used as controls. The sections were evaluated using a semi-quantitative method in conjunction with staining intensity. Our findings showed that the expression of IL-10 and TGF- β 2 by neoplastic and stromal cells was high in most of the OSCC samples (> 70% of samples), especially when compared to the controls (\cong 10% of samples) (P <0.05). Neoplastic cells from the primary in metastatic cervical lymph nodes were also positive for IL-10 and TGF- β 2. An association between high expression of IL-10 by neoplastic cells and advanced clinical stage (T3-T4) was verified (P = 0.02). Although not statistically significant, the expression of TGF- β 2 was also augmented in advanced stage tumours. These findings demonstrate that an “immunosuppressive” environment in OSCC, especially in advanced tumours, might be conducive to tumour progression, worsening the prognosis.

Keywords: Interleukin-10, Transforming growth factor β , Oral squamous Cell Carcinoma, Immunosuppression, Oral cancer

Abbreviations: IL-10, interleukin-10; TGF- β , transforming growth factor β ; OSCC, oral squamous Cell Carcinoma; CTLs, cytotoxic T lymphocytes; APCs, WHO, World Health Organization; UICC, Union for International Cancer Control; HE, hematoxylin and eosin; IRS, immunoreactive score.

Introduction

Interleukin 10 (IL-10) and transforming growth factor β (TGF- β) are anti-inflammatory and immunosuppressive cytokines that can contribute to the immune escape of neoplastic cells [1-3]. IL-10 prevents antigen presentation by macrophages and dendritic cells, reducing the expression of the MHC class I molecules on the cell

surface [1], regulating the differentiation of T regulatory (T reg) cells [2] and inducing the formation of a tumour cell phenotype resistant to the action of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) [4]. TGF- β contributes to the loss of differentiation of tumour cells [5], angiogenesis [6] and the synthesis of proteolytic enzymes [7]. It also inhibits the production and secretion of perforin and granzyme proteins from CTLs [3] and has a role in the epithelial-mesenchymal transition [8].

The roles of IL-10 and TGF- β in the tumoural microenvironment and their potential to influence the clinical course of the disease have been investigated in different tumours [5, 9-27]. Earlier studies showed an association between higher expression of IL-10 and poorer prognosis in oesophageal [9], lung [10], hepatocellular [14], ovarian carcinomas [15] and melanoma [16].

Regarding TGF- β , the distinct expression of two isoforms (β 1 and β 2) of this cytokine in tumours of different types and locations has been demonstrated [5, 17-20]. Of these isoforms, TGF- β 1 is considered pleiotropic because of its ability to either promote or suppress carcinogenesis [21]. High expression of TGF- β 1 has been related to a poorer prognosis for patients with oesophageal [9], gastric [5], breast [22], hepatocellular [23], lung [24], pancreatic [26] or adenocystic carcinomas [27]. On the other hand, other studies found that higher expression of this same TGF isoform could be related to improved survival of patients with gastric [17], colorectal carcinomas [18], prostate [25], and bears an inverse correlation with the proliferation index of squamous cell carcinoma of the lip [28]. Regarding isoform TGF- β 2, the expression of this cytokine has been related to a worse prognosis for patients with gastric [5,17] or colorectal carcinomas [18], gliomas [19] and advanced melanomas [20].

Studies have been undertaken to evaluate IL-10 and TGF- β expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity (OSCC) [11-13, 29-34] or, in particular, the clinicopathological significance of these cytokines for disease [11, 29-30, 32-34]. Recently, Gaur et al. (2014) observed that high expression of IL-10 and TGF- β in patients with OSCC is associated with more advanced stages of the disease [34]. Costa et al. (2013) have also suggested that elevated gene expression of IL-10 and TGF- β in OSCC could be related to immunosuppressive events that contribute to a worse prognosis for patients [33]. In that same year, Hamzavi et al. (2013) and Chen

et al. (2013) showed a relationship between high expression of IL-10 and a worse prognosis for patients with OSCC [29-30]. As regards TGF- β 1, Logullo et al. (2003) and Mincione et al. (2008) showed high expression of this cytokine in well-differentiated OSCC samples [31,35]. Subsequently, Elahi et al. (2012) and Chen et al. (2012) observed a correlation between high expression of TGF- β 1 in OSCC and an unfavourable prognosis for patients with this tumour [32, 36].

Recently, a study by our group evaluated the expression of IL-10 and TGF- β 1 in tissue and saliva samples from patients with OSCC [11]. This study showed high expression of IL-10 in OSCC tissue and saliva samples compared to those of healthy individuals. However, TGF- β 1 expression was low or absent in most samples of OSCC evaluated [11]. Although earlier studies have demonstrated the role of TGF- β 2 in the pathogenesis of certain malignancies [5, 17-20], to date no study has evaluated the expression of this TGF isoform in OSCC. Herein, this study investigated the expression of the TGF- β 2 isoform in OSCC and the relationship between this cytokine and IL-10 with prognostic clinical and microscopic factors.

Materials and methods

Sample selection

The study was approved by the Ethics Committee on Human Research (CEB/UFG Protocol 032/2011). In this cross-sectional study, 43 specimens were selected after the surgical excision of oral squamous cell carcinoma in patients who had undergone neck dissection, treated at the Head and Neck Division of the Araújo Jorge Hospital Association Against Cancer in Goiás, Goiânia, Brazil (HAJ/ACCG). The lymph nodes of these patients were evaluated microscopically and those with metastases (23 patients) were selected for this study. A total of 20 samples of clinically and histologically normal oral mucosa, obtained from the Goiás Oral Disease Center (Oral Pathology laboratory) at the Universidade Federal de Goiás, Brazil were also included.

Patients who had undergone surgical treatment (removal of lesion and cervical lymph nodes) and had had a minimum of 24 months follow-up were included in the study. Those patients with squamous cell carcinoma of the lip and oropharynx, those who did not return for their medical follow-up after surgical removal of the tumour and

those who had received radiotherapy, chemotherapy or any other treatment before surgery were also excluded from the study. The T and N clinical staging was established according to the classification adopted by the Union for International Cancer Control (UICC) [37]. Medical records provided clinico-demographic data such as age, gender, ethnicity, alcohol and tobacco consumption (yes or no), and information on follow-up, including survival time, recurrence and mortality.

Microscopic analysis

The specimens selected, previously fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4), were embedded in paraffin and subsequently sectioned by microtome (Leica RM2165). Each block provided consecutive 5 μ m sections, which were placed on slides and stained with hematoxylin and eosin (HE). These sections were used for the microscopic characterization of all samples, as all lymphonodal sections were evaluated for the presence of metastasis and those of primary OSCC were graded according to the World Health Organization (WHO) tumour classification [38]. The depth of invasion (in mm) was measured using a millimetre ruler attached to a light microscope (x100), which allowed for an investigation of the depth of tumour invasion from the surface of the epithelium to the deepest front of the invasion.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as previously described [11, 39]. For immunohistochemical staining, serial sections of 3 μ m placed on silanized slides were used. For antigenic exposure of IL-10 and TGF- β 2 proteins, the sections were incubated for 25 minutes in citrate buffer (pH 6.0) and EDTA (pH 9.0), respectively. Then, the slides were incubated with their respective primary antibodies previously subjected to standardization tests: IL-10 monoclonal mouse anti-human antibody (Abcam Inc. - ab34843, Cambridge, MA, USA, diluted 1: 300) and monoclonal rabbit anti-human TGF- β 2 antibody (Santa Cruz Biotechnology - sc124019, diluted 1:50). Subsequently, the sections containing anti-IL-10 and TGF- β 2 were incubated with the Advanced Kit (K4067 and 4068, Dako). Positive controls: positive expression of IL-10 in immune-inflammatory cells in OSCC and TGF- β 2 in neoplastic cells of gastric carcinoma. Negative controls were obtained by omitting the primary antibody, which was replaced by phosphate-buffered saline (PBS, 0.4 mM NaCl, 10 mM NaPO₄)

containing 1% bovine serum albumin (BSA) and non-immune rabbit (X0902, Dako) or mouse (X501-1, DAKO) serum.

Measurement of IL-10 and TGF- β 2

The quantification of IL-10 and TGF- β 2 cytokines was done in tumour cells (tumoural parenchyma), immune-inflammatory cells and fibroblasts in the stroma near the invasive front of the OSCC (peritumoural region), as well as in the epithelial and connective tissue of clinically and histologically normal samples of oral mucosa (controls). Semi-quantitative evaluation was performed according to Gonçalves et al. 2014 [11, 39], where the percentage of positive tumour cells (PP) was scored as follows: 0, no tumour cells immunostained; 1, <25% of cells immunostained; and 2, \geq 25% of cells immunostained. Staining intensity (SI) was also graded as follows: 0, no immunostaining; 1, weak immunostaining; 2, moderate immunostaining; and 3, strong immunostaining. The immunoreactive score (IRS) was calculated by multiplying the percentage of positive cells (PP, stained 0–2) by the staining intensity (SI, stained 0–3). In tumours with an IRS = 0, the expression of IL-10 and TGF- β 2 was considered absent, with an IRS \leq 2 it was low, whereas tumours with an IRS > 2 were considered to have a high expression. All sections were analysed blind using a light microscope under high power (x400).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with the aid of IBM SPSS 20.0 (IBM Corporation, New York, USA) and Prism (GraphPad Prism 5; GraphPad Software, California, USA). The Shapiro-Wilk test revealed a non-normal distribution of data. Categorical variables were analysed using the Fisher Exact and Pearson χ^2 tests. Survival time was calculated from surgical resection until the last follow-up date or death of the patient. Differences in survival between the groups were assessed by the log-rank test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

The main clinical and histological data found in the group of 43 patients with OSCC are summarized in Table 1. Analysis of the cases showed a predominance of males (61.4%) with a mean age of 58 years (CI: 24–90), and 79.5% of patients were smokers. The tongue was the most common tumour site, accounting for 52.3% of

cases. In terms of the last follow-up, the mean ti survival time for these patients was 33 months (CI: 0–138). At diagnosis, 63.6% of patients with OSCC presented regional metastasis and 36.4% presented tumour-free cervical lymph nodes (**Table 1**).

In the control group (n = 20), the analysis showed a predominance of males (85%) with a mean age of 32 years (CI: 18–41), and all the patients were non-smokers. Fragments of oral mucosa adjacent to the physiological pigmentation were used as healthy tissue.

Immunohistochemistry identified IL-10 and TGF- β 2 in the cytoplasm of neoplastic cells (tumoural parenchyma) and immune-inflammatory cells with the morphology of macrophages, lymphocytes and plasmocytes (**Fig. 1 A-B and D-E**). The expression of these proteins was homogeneous when considering the invasive front and the most centrally located area of the tumour (**Fig. 1**). Staining intensity (SI) varied from weak to strong. In addition, expression of TGF- β 2 was seen in fibroblasts, nerve endings, and in the smooth muscle walls of arterioles and capillaries (**Fig. 1 E**).

Quantitative analysis revealed high expression of IL-10 (IRS > 2) in neoplastic (82.1% of cases) and stromal cells (71.4% of cases) from OSCC samples evaluated. Similarly, we observed high expression of TGF- β 2 (IRS > 2) in neoplastic (87.5% of cases) and stromal cells (71.9% of cases). This high expression of IL-10 and TGF- β 2 was significantly greater in OSCC samples than in healthy oral mucosa ($p < 0.05$) (**Fig. 1 and Table 2**).

The expression of IL-10 and TGF- β 2 was similar in patients who presented lymph node metastasis (n = 23) when compared to the group of metastasis-free patients (n = 20) ($p = 0.21$ and 0.30 , respectively) (**Table 1**). On the other hand, irrespective of whether the patient did or did not have metastasis at diagnosis, high expression of IL-10 and TGF- β 2 (IRS > 2) in the microenvironment of the primary tumour was also evidenced by metastatic neoplastic cells in cervical lymph nodes in 62.5% (IL-10) and 76.9% (TGF- β 2) of patients with OSCC who developed metastases (**Fig. 2 A-D**).

For the survival analysis, the expression of IL-10 and TGF- β 2 was dichotomized into two groups: absent or low ($IRS \leq 2$) and high expression ($IRS > 2$). The results showed that patients with $IRS \leq 2$ had a median survival of 38 ± 50.1 (IL-10) and 33 ± 28.8 (TGF- β 2) months whereas patients with $IRS > 2$ had a median survival of 35 ± 43.4 (IL-10) and 32 ± 39.8 (TGF- β 2) months. The log-rank test showed no relationship between the expression of these cytokines and survival ($p > 0.05$).

With regard to clinical stage, there was a positive association between this parameter and high IL-10 expression in neoplastic cells ($IRS > 2$) ($p = 0.02$), i.e. the number of cases at an advanced clinical stage (T3-T4) with high expression of IL-10 (78.3% of the samples) was significantly greater than the number of cases with a lower clinical stage (T1-T2) and high expression of this cytokine (21.7% of the samples). A similar relationship was shown between the clinical stage and expression of TGF- β 2; however, no statistically significant difference was confirmed ($p = 0.42$) (**Table 1**).

There was no significant association between the expression of IL-10 and TGF- β 2 and the other clinicopathological features of OSCC evaluated, e.g. age, gender, ethnicity, alcohol and tobacco consumption, tumour location, depth of invasion, T stage, clinical outcome (relapse) or WHO tumour classification (**Table 1**).

Discussion

This study demonstrated elevated expression of IL-10 and TGF- β 2 by neoplastic cells in primary and metastatic sites of OSCC. The overexpression of these immunosuppressive cytokines, especially IL-10, was associated with advanced clinical stages. These findings suggest that these molecules contribute to an “immunosuppressive” environment in which neoplastic cells evade cells of the immune system and spread to distant sites.

Regarding the expression of IL-10 in the OSCC microenvironment, there are studies published that corroborate our findings, showing that overexpression of IL-10 in this tumour has clinical significance [11, 29-30, 33-34]. Hamzavi et al. (2013) also demonstrated high expression of IL-10 (86.6% of tumour samples) in samples from patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity ($n = 8$) and the larynx ($n =$

22) and an association between this cytokine and an advanced clinical stage [29]. In the same year, Chen et al. (2013) investigated immune expression of IL-10 in 325 samples of OSCC and found that high expression of this interleukin by tumour cells was associated with shorter survival time and a 1.99-fold greater risk of death [30]. Chuang et al. (2012) also observed an association between high expression of IL-10 and shorter survival times in non-smoking and non-drinking patients with OSCC, but who were infected with HPV (subtypes 16 and/or 18) [40]. Other researchers also demonstrated high tissue expression of IL-10 in OSCC and the oropharynx, but it was not associated with clinical prognostic parameters [12-13].

Gasparoto et al. (2009) showed overexpression of IL-10 in SCC of the mouth and demonstrated that the primary role of this cytokine in the tumour microenvironment contributes to the activity and maintenance of T reg cells and the inhibition of macrophages and dendritic cells, resulting in a deficient cytotoxic antitumor immune response [41]. Corroborating these data, a positive correlation has been shown between IL-10 and T reg cells (CD4⁺ CD25⁺) in the blood of patients suffering from carcinoma of the head and neck and shorter survival time [42-43].

IL-10 can increase susceptibility to oral cancer and act synergistically with other immunosuppressive cytokines [44]. It is possible that the simultaneous action of IL-10 and TGF- β strongly contributes to the progression and clinical prognosis of OSCC. Gaur et al. (2014) showed elevated serum levels of IL-10 and TGF- β 1 in patients with OSCC and also an association of these cytokines with more advanced stages of the tumour [34]. With regard to IL-10, earlier results from our group [11] and those presented in this study corroborate the findings of Gaur et al. (2014). On the other hand, an earlier study showed low expression of TGF- β 1 in OSCC samples, and salivary expression of this cytokine did not distinguish healthy individuals from those with cancer [11]. Our hypothesis is that TGF- β 1 could play a physiological role in the differentiation and proliferation of epithelial cells, regulated by the transcription of cytoplasmic signalling factors (Smads) [45], whereas other TGF subtypes, such as β 2, could be more associated with oral carcinogenesis.

Distinct expression of these two TGF isoforms (β 1 and β 2) has been seen in some malignancies [5, 17-20]. The β 1 isoform is considered pleiotropic as it plays a dual role in carcinogenesis: it regulates cell proliferation in the early stages of cancer

and contributes to progression and invasion at more advanced stages [21]. On the other hand, the $\beta 2$ isoform seems to be related to events which promote tumour growth, acting on type I and type II cell surface receptors (TGF- β RI and TGF- β RII) and on the Smad intracellular signalling pathways [5, 17-20].

TGF- β signalling occurs through its connection with TGF- β RI and TGF- β RII followed by phosphorylation of cytoplasmic Smad proteins (pSmads). Subsequently, pSmads associate with other DNA binding proteins and thus control gene expression and cell proliferation [21]. Some studies have suggested that the presence of somatic mutations or decreased expression of TGF- β RII could contribute to tumour development due to an imbalance in cell cycle control [31, 46]. Sivadas et al. (2014) have recently shown the presence of five subtypes of genetic alteration in TGF- β RII from neoplastic cells of OSCC generated by a gene expression mechanism called alternative splicing [46]. In addition, positivity for alternative splicing in the samples analysed was related to a shorter survival time of patients affected by the disease [46]. Mincione et al. (2008) observed lower tissue expression of the TGF- β RI, TGF- β RII and TGF- β 1 isoforms in cases of poorly differentiated OSCC [31]. These earlier data [31, 46], along with the high expression of TGF- β 2 in OSCC shown in this study, demonstrate the importance of evaluating the role of this other TGF isoform in oral carcinogenesis.

To the best of our knowledge, this is the first study to date to evaluate the tissue expression of the TGF- β 2 isoform in OSCC and its relationship with clinical and microscopic prognostic factors. OSCC, in both primary and metastatic sites, exhibits high expression of TGF- β 2, which tends to be higher in patients at an advanced clinical stage. Corroborating our results, elevated tissue expression of TGF- β 2 associated with more advanced stages of gastric and colorectal carcinoma and melanoma [17-18, 20] was previously observed. Additionally, increased gene expression of the TGF- β 2 isoform related to advanced clinical stage and lower survival time has been shown in gliomas [19]. Further studies to investigate another known TGF isoform, TGF- β 3 [47], in OSCC would be important for a better understanding of the role of these three TGF phenotypes in the pathophysiology of this tumour.

Investigation of the expression and secretion of IL-10 and TGF- β 2 by neoplastic OSCC cells helps to better understand the pathophysiology of this tumour and to design further alternative interventions using immunotherapy. Certain researchers have shown that the possibility of combining radiotherapy and/or chemotherapy with immunotherapy could be effective in patients with cancer [48-49]. Tano et al. (2013) reported that in patients receiving radiotherapy and/or chemotherapy in conjunction with an immunotherapy agent (OK-432), the OSCC regressed without needing surgical resection [50]. These authors also observed that the use of immunotherapy in conjunction with X-radiation and the chemical agent 5-fluorouracil in cultured cells could increase the Th1 type immune response and inhibit the production of IL-10 and TGF- β [50]. Thus, it has been proposed that OSCC is an excellent candidate for immunotherapy due to its accessibility and susceptibility to immunomodulation [50].

The results of this study show that OSCC, regardless of whether or not it presents metastasis at diagnosis, has high expression of IL-10 and TGF β 2. This was also evidenced by the neoplastic cells in the metastatic site and was associated with a worse clinical stage. These data suggest that the ability of OSCC neoplastic cells to secrete immunosuppressive cytokines could contribute to clinical progression by maintaining a microenvironment conducive to evasion and tumour proliferation.

Acknowledgements

This study was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq Processes 473324/2012-1 and 303886/2012-9) and the Goiás Foundation for Research Support (FAPEG grant, 201210267001105). ACB, TAS and EFM are research fellows of CNPq.

Conflicts of interest

None

Table 1 Demographic and clinical histological findings (%) from patients with OSCC (n = 43) and association of these findings with the tissue expression of IL-10 and TGF- β 2.

Demographic and clinical pathological data	OSCC	IL-10	TGF- β 2
	No. of samples (%)	p value	p value
Age			
≤ 58 years	21 (47.7)	0.42	0.65
> 58 years	22 (52.3)		
Gender			
Male	27 (61.4)	0.64	0.57
Female	16 (38.6)		
Ethnicity			
Caucasian	24 (56.8)	0.21	0.13
Non-Caucasian	19 (43.2)		
Alcohol Consumption			
Yes	29 (61.4)	0.60	0.17
No	14 (38.6)		
Tobacco			
Yes	33 (79.5)	0.71	0.31
No	10 (20.5)		
Location			
Tongue	24 (52.3)	0.57	0.54
Other sites	19 (47.7)		
Metastasis			
Yes	23 (63.6)	0.21	0.30
No	20 (36.4)		
Clinical Staging (T)			
T1- T2	13 (31.8)	0.02*	0.42
T3- T4	30 (68.2)		
Survival Time			
≤ 24 months	32 (68.2)	0.63	0.70
> 24 months	11 (31.8)		
Clinical Evolution			
Deaths	27 (56.8)	0.55	0.79
Alive (overall survival)	16 (43.2)		
Relapse			
Yes	19 (61.4)	0.17	0.18
No	24 (38.6)		
Histological Grading (WHO)			
Grades I- II	26 (59.0)	0.71	0.69
Grades III- IV	17 (41.0)		

Depth of invasion (mean= 5.06 mm; 1.25 ± 8.75)			
≤ 5.06 mm	23 (54.5)	0.51	0.57
> 5.06 mm	20 (45.5)		

(*) denotes a statistically significant difference (Pearson χ^2 Test; $p < 0.05$)

Table 2 Percentage of samples per category of immunoexpression (absent, low and high expression) of IL-10 and TGF- β 2 cytokines in neoplastic and stromal OSCC cells (n = 43) compared to the control group (n = 20).

<i>Region</i>	<i>Cytokines</i>	<i>Groups</i>	<i>Expression abser (IRS = 0) (% of samples)</i>	<i>Low Expression (IRS \leq 2) (% of samples)</i>	<i>High Expression (IRS >2) (% of samples)</i>	<i>p value</i>
Epithelial Cells (OSCC vs. Control)	<i>IL-10</i>	<i>OSCC</i>	0	17.9	82.1	0.013*
		<i>Control</i>	0	90.9	9.1	
	<i>TGF-β2</i>	<i>OSCC</i>	0	12.5	87.5	0.014*
		<i>Control</i>	21.4	78.6	0	
Stromal Cells (OSCC vs. Control)	<i>IL-10</i>	<i>OSCC</i>	0	28.6	71.4	0.013*
		<i>Control</i>	0	100	0	
	<i>TGF-β2</i>	<i>OSCC</i>	3.1	25	71.9	0.012*
		<i>Control</i>	46.7	26.7	26.6	

(*) denotes a statistically significant difference when compared to the control group (Pearson χ^2 Test; $p < 0.05$)

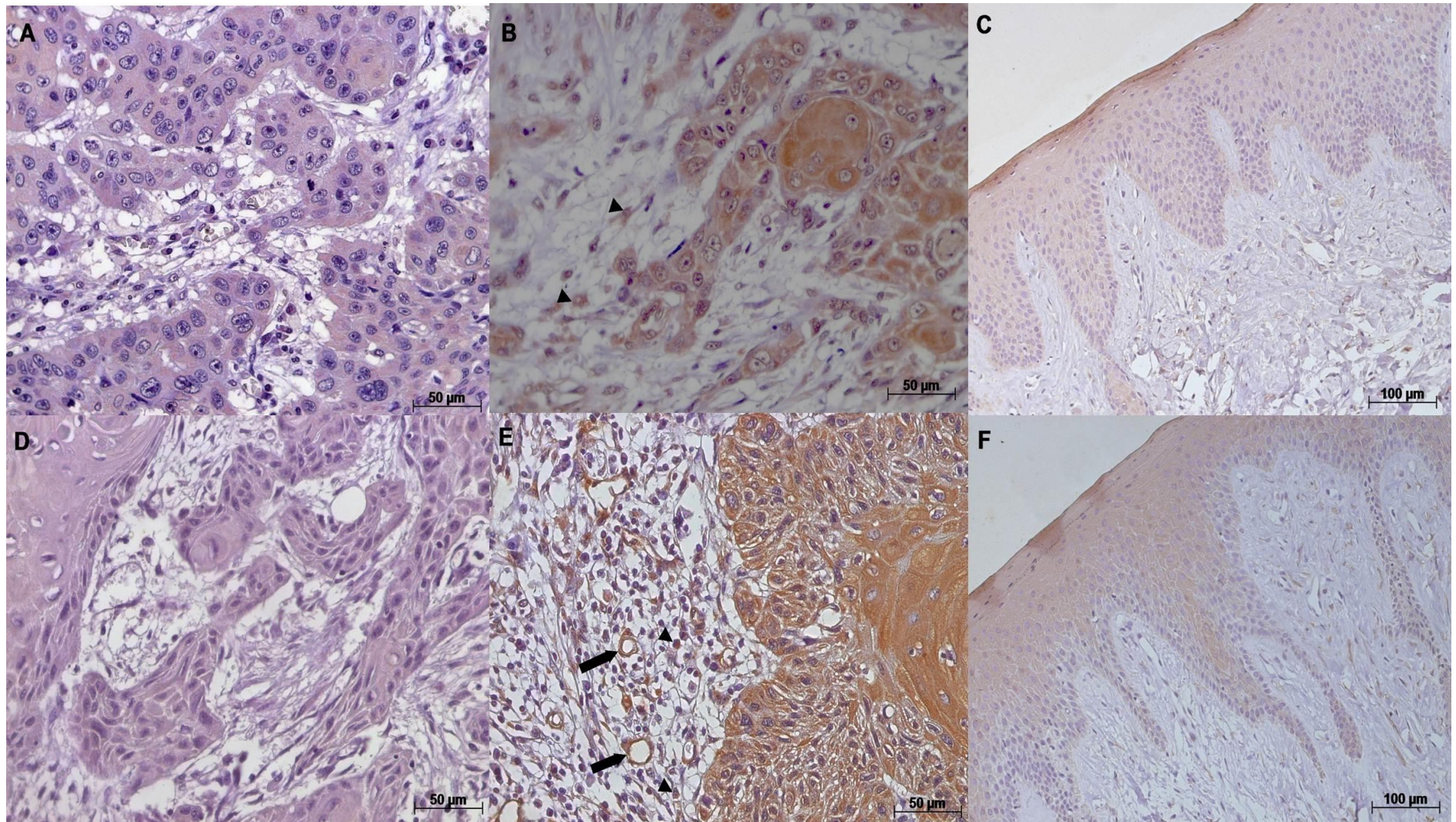


Fig. 1 (a - f): Representative images showing different immunostaining categories of the IL-10 (a and b) and TGF- β 2 (d and e) cytokines in OSCC: (a) low (IRS \leq 2) and (b) high expression (IRS > 2) of IL-10 in neoplastic and stromal cells (arrowheads) in a moderately differentiated OSCC. (d) Low (IRS \leq 2) and (e) high expression (IRS > 2) of TGF- β 2 in neoplastic and stromal cells (arrowheads) and smooth muscle walls of arterioles (arrows) in a well differentiated OSCC. Photomicroscopy showing low expression of IL-10 (c) and TGF- β 2 (f) (IRS \leq 2) in healthy oral mucosa. Immunohistochemical staining.

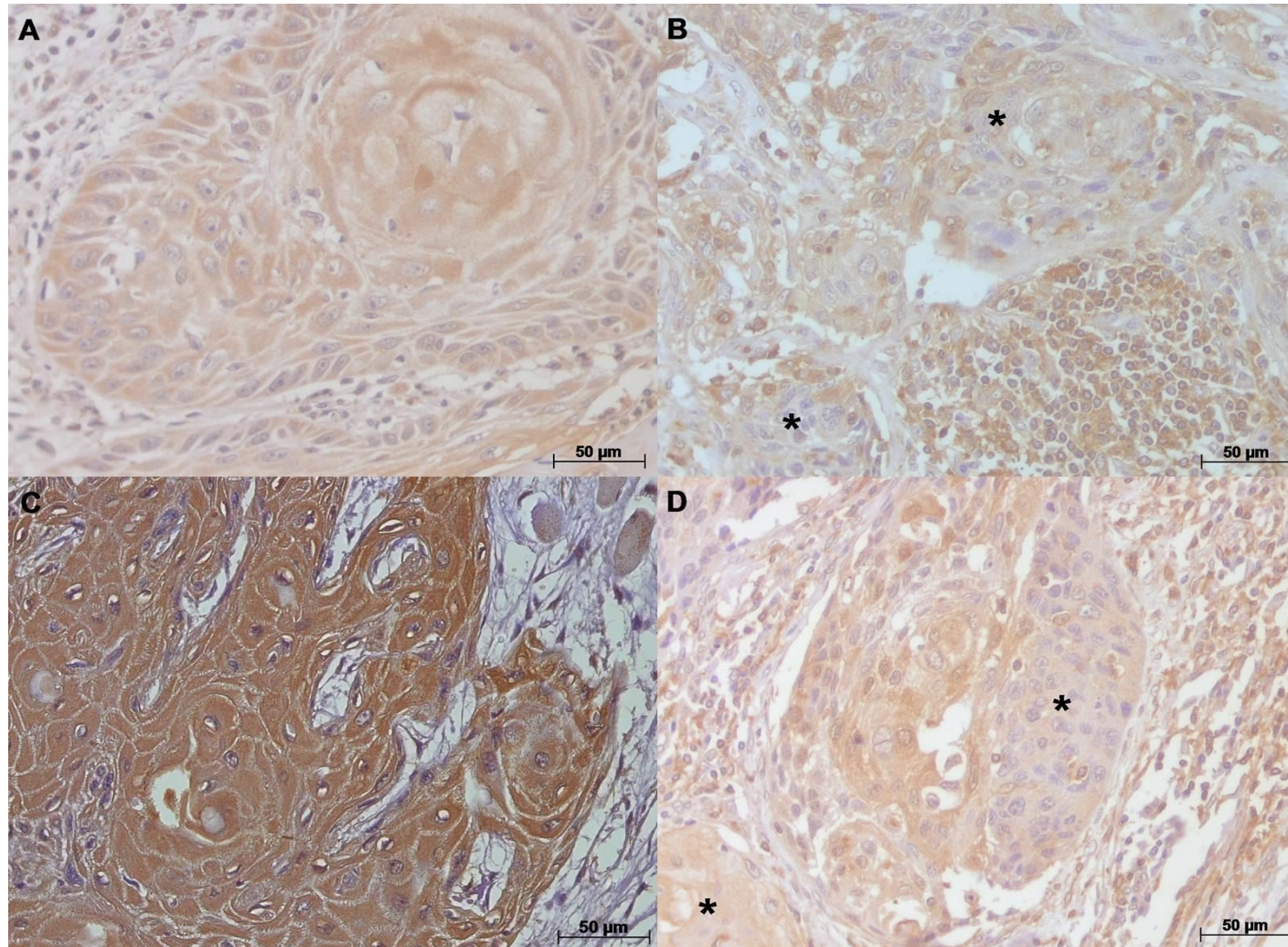


Fig. 2 (a - d): Photomicroscopy illustrating high expression of IL-10 (IRS> 2) (a) and TGF- β 2 (IRS> 2) (c) in neoplastic and stromal cells of a primary moderately differentiated OSCC, which are evidenced in their respective metastatic cervical lymph nodes (b - IL-10) and (d - TGF- β 2). *Denotes metastatic neoplastic cells in cervical lymph nodes. Immunohistochemical staining.

References

1. Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, et al. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumour and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J. Exp. Med.* 1994;180:2371–6.
2. Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, et al. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J. Immunol.* 2006;177:40–4.
3. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell.* 2005;8:369–80.
4. Kurte M, López M, Aguirre A, Escobar A, Aguillón JC, Charo J, et al. A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells. *J. Immunol.* 2004;173:1731–7.
5. Ma GF, Miao Q, Zeng XQ, Luo TC, Ma LL, Liu YM, et al. Transforming growth factor- β 1 and - β 2 in gastric precancer and cancer and roles in tumour-cell interactions with peripheral blood mononuclear cells in vitro. *PLoS ONE.* 2013;8:e54249.
6. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor β in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 1994;269:6271–4.
7. Kim HS, Shang T, Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ. TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 2004;79:263–74.
8. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19:156–72.
9. Gholamin M, Moaven O, Memar B, Farshchian M, Naseh H, Malekzadeh R, et al. Overexpression and interactions of interleukin-10, transforming growth factor beta, and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg.* 2009;33:1439–45.
10. Hatanaka H, Abe Y, Kamiya T, Morino F, Nagata J, Tokunaga T, et al. Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2000;11:815-9.
11. Gonçalves AS, Arantes DAC, Bernardes VF, Jaeger F, Silva JM, Silva TA, et al. Immunosuppressive mediators of oral squamous cell carcinoma in tumour samples and saliva. *Hum. Immunol.* 2015;76:52-8.

12. Fujieda S, Sunaga H, Tsuzuki H, Fan GK, Saito H. IL-10 expression is associated with the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 1999;136:1-9.
13. Chandler S, Rassekh C, Roadman S, Ducatman BS. Immunohistochemical localization of Interleukin-10 in human oral and pharyngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 2002;112:808-15.
14. Chan SL, Mo FK, Wong CS, Chan CM, Leung LK, Hui EP, et al. A study of circulating interleukin 10 in prognostication of unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2012;118:3984-92.
15. Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Bucht A, et al. Selective expression of interleukin 10, interferon γ and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89:7708-12.
16. Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D, et al. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Invest.* 2001;19:239-47.
17. Vagenas K, Spyropoulos C, Gavala V, Tsamandas AC. TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3 protein expression in gastric carcinomas: correlation with prognostic factors and patient survival. *J. Surg. Res.* 2007;139:182-8.
18. Tsamandas AC, Kardamakis D, Ravazoula P, Zolota V, Salakou S, Tepetes K, et al. The Potential Role of TGF-1, TGF-2 and TGF-3 protein expression in colorectal carcinomas. *Strahlenther Onkol.* 2004;180:201-8.
19. Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I, et al. Expression of TGF- β isoforms, TGF- β receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int. J. Cancer.* 2000;89:251-8.
20. Van Belle P, Rodeck U, Nuamah I, Halpern AC, Elder DE. Melanoma-associated expression of transforming growth factor- β isoforms. *Am. J. Pathol.* 1996;148:1887-94.
21. Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β signalling in cancer – a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 2001;11:S44-51.
22. Walker RA, Dearing SJ, Gallacher B. Relationship of transforming growth factor β 1 to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma. *Br. J. Cancer.* 1994;69:1160-5.
23. Ito N, Kawata S, Tamura S, Shirai Y, Kiso S, Tsushima H, et al. Positive correlation of plasma transforming growth factor- β 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 1995;89:45-8.
24. Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor- β 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 2001;91:964-71.

25. Desruisseau S, Ghazarossian-ragni E, Chinot O, Martin PM. Divergent effect of TGFbeta1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. *Int. J. Cancer.* 1996;66:796-801.
26. Javle M, Li Y, Tan D, Dong X, Chang P, Kar S, et al. Biomarkers of TGF- β Signaling Pathway and Prognosis of Pancreatic Cancer. *PLoS ONE.* 2014;9:e85942.
27. Dong L, Ge X, Wang Y, Yang LQ, Li SL, Yu GY, et al. Transforming growth factor- β and epithelial-mesenchymal transition are associated with pulmonary metastasis in adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol.* 2013;49:1051-8.
28. Salvadori G, Santos JN, Martins MA, Vasconcelos AC, Meurer L, Rados PV, et al. Ki-67, TGF- β 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. *Tumor Biol.* 2014;35:7635-44.
29. Hamzavi M, Tadbir AA, Rezvani G, Ashraf MJ, Fattahi MJ, Khademi B, et al. Tissue Expression, Serum and Salivary Levels of IL-10 in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013;14:1681-5.
30. Chen CJ, Sung W W, Su TC, Chen MK, Wu PR, Yeh KT, et al. High expression of interleukin 10 might predict poor prognosis in early stage oral squamous cell carcinoma patients. *Clin. Chim. Acta.* 2013;415:25-30.
31. Mincione G, Di Marcantonio MC, Artese L, Vianale G, Piccirelli A, Piccirilli M, et al. Loss of expression of TGF-beta1, TbetaRI, and TbetaRII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Oncol.* 2008;32:323-31.
32. Chen MF, Wang WH, Lin PY, Lee KD, Chen WC. Significance of the TGF- β 1/IL-6 axis in oral cancer. *Clin Sci.* 2012;122:459-72.
33. Costa NL, Valadares MC, Souza PP, Mendonça EF, Oliveira JC, Silva TA, et al. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2013;49: 216-23.
34. Gaur P, Singh AK, Shukla NK, Das SN. Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancerpatients and their clinical significance. *Hum. Immunol.* 2014;75:330-7.
35. Logullo AF, Nonogaki S, Miguel RE, Kowalski LP, Nishimoto IN, Pasini FS, et al. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. *J. Oral Pathol. Med.* 2003;32:139-45.
36. Elahi M, Rakhshan V, Ghasemian NT, Moshref M. Prognostic value of transforming growth factor beta 1 [TGF- β 1] and matrix metalloproteinase 9 [MMP-9] in oral squamous cell carcinoma. *Biomarkers.* 2012;17:21-7.
37. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC: Lip and oral cavity. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual.* New York: Springer; 2010. pp. 29-40.

38. Pindborg JJ, Reichard PA, Smith CJ, Wall I van der. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. World Health Organization Classification of Tumours. 2nd ed. Berlin: Springer; 1997.
39. Gonçalves AS, Wastowski IJ, Capeletti LR, Sacono NT, Cortez AP, Valadares MC, et al. The clinicopathological significance of the expression of HLA-G in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;117:361–8.
40. Chuang CY, Sung WW, Wang L, Lin WL, Yeh KT, Su MC, et al. Differential Impact of IL-10 Expression on Survival and Relapse between HPV16-Positive and -Negative Oral Squamous Cell Carcinomas. *PLoS ONE.* 2012;7:e47541.
41. Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJ Jr, Costa MR, Damante JH, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009;59:819–28.
42. Alhamarneh O, Agada F, Madden L, Stafford N, Greenman J. Serum il10 and circulating CD4(+) CD25(high) regulatory t cell numbers as predictors of clinical outcome and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2011;33:415–23.
43. Green VL, Irune E, Prasai A, Alhamarneh O, Greenman J, Stafford ND. Serum IL10, IL12 and circulating CD4+CD25high T regulatory cells in relation to long-term clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Int. J. Oncol.* 2012;40:833-9.
44. Voorzanger N, Touitou R, Garcia E, Delecluse HJ, Rousset F, Joab I, et al. Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced *in vivo* by non-Hodgkin's lymphoma cells and acts as cooperative growth factors. *Cancer Res.* 1996;56:5499-505.
45. White RA, Malkoski SP, Wang XJ. TGF β signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2010;29:5437-46.
46. Sivadas VP, Gulati S, Varghese BT, Balan A, Kannan S. The early manifestation, tumor-specific occurrence and prognostic significance of TGFBR2 aberrant splicing in oral carcinoma. *Exp. Cell Res.* 2014;327:156-62.
47. Sefat F, Denyer MC, Youseffi M. Effects of different transforming growth factor beta (TGF- β) isomers on wound closure of bone cell monolayers. *Cytokine.* 2014;69:75-86.
48. Takeshima T, Chamoto K, Wakita D, Ohkuri T, Togashi Y, Shirato H, et al. Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. *Cancer Res.* 2010;70:2697–706.
49. Okamoto M, Ohe G, Oshikawa T, Nishikawa H, Furuichi S, Yoshida H, et al. Induction of cytokines and killer cell activities by cisplatin and 5-fluorouracil in head and neck cancer patients. *Anticancer Drugs.* 2000;11:165–173.
50. Tano T, Okamoto M, Kan S, Bando T, Goda H, Nakashiro K, et al. Immunochemoradiotherapy for Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma:

Augmentation of OK-432–Induced Helper T Cell 1 Response by 5-FU and X-ray Irradiation¹. *Neoplasia*. 2013;15:805-14.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso trabalho evidenciou uma expressão tecidual significativamente maior das citocinas IL-10 e TGF- β 2 e menor da TGF- β 1 em pacientes com CECO. Esse resultado pode sugerir que a presença da IL-10 e TGF- β 2 no microambiente do CECO esteja favorecendo a imunossupressão local, a disseminação metastática, e também possivelmente contribuindo com uma redução na sobrevida dos pacientes. Já a citocina TGF- β 1 parece exercer um papel fisiológico na mucosa bucal e pode não contribuir significativamente para a progressão tumoral. Além disso, das citocinas imunossupressoras investigadas, a IL-10 apresenta maior potencial para se tornar um biomarcador salivar associado ao prognóstico clínico desfavorável do paciente com CECO.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a expressão tecidual de TGF- β 2 em CECO e sua relação com parâmetros clínicos de prognóstico e grau histológico de malignidade. Estudos futuros devem ser realizados para investigar outra isoforma de TGF conhecida, o TGF- β 3, e a relação com as vias de sinalização desta citocina, com ênfase nas proteínas citoplasmáticas Smads e nos receptores TGF- β RI, TGF- β RII e TGF- β RIII, em CECO. Estas investigações permitirão melhor compreensão do papel destas proteínas na fisiopatologia deste tumor.

Além disso, deve ser avaliado a expressão das citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- β em distúrbios potencialmente malignos de boca, para entendermos o papel destas proteínas na carcinogênese oral.

O conhecimento da fisiopatologia do CECO, envolvendo a avaliação de citocinas imunossupressoras e suas vias de sinalização, é fundamental para o desenvolvimento de intervenções alternativas utilizando imunoterapia no tratamento desta neoplasia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN A. H.; PILLAI S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
2. ALMOFTI A.; UCHIDA D.; BEGUM N. M.; et al. The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v.25, n.1, p. 65-71, jul. 2004.
3. AKHURST R. J.; DERYNCK R. TGF- β s signalling in cancer – a double-edged sword. **Trends Cell Biol**, v.11, n.11, p. 44-51, nov. 2001.
4. ANNEROTH G.; BATSAKIS J.; LUNA M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res**, v. 95, n.3, p. 229-49, jun. 1987.
5. ARELLANO-GARCIA M. E.; HU S.; WANG J.; et al. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. **Oral Dis**, v. 14, n.8, p. 705-12, nov. 2008.
6. ASADULLAH K.; SABAT R.; WIESE A.; et al. Interleukin-10 in cutaneous disorders: implications for its pathophysiological importance and therapeutic use. **Arch Dermatol Res**, v. 291, n.12, p. 628-636, dec. 1999.
7. BALKWILL F.; MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v. 357, p. 539-45, 2001.
8. BARNES L.; EVESON J. W.; REICHAERT P.; SINDRANSKY D. **Pathology & genetics head and neck tumours**. World health organization classification of tumours. In: Slootweg PJ, Eveson JW. Tumours of the oral cavity and oropharynx: Introduction. In: Johnson N et al. Squamous cell carcinoma Lyon: IARCPress, p.166-75, 2005.
9. BEJARANO MT, DE WAAL M. R.; ABRAMS J. S.; et al. Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. **Int. Immunol**, v. 4, n.4, p.1389-97, dec. 1992.
10. BRENER S.; JEUNON F. A.; BARBOSA A. A.; GRANDINETTI H. A. M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, p. 53-63, 2007.
11. BRIGATI C.; NOONAN D. M.; ALBINI A.; BENELLI R. Tumor and inflammatory infiltrates: friends or foes. **Clin Exp Metastasis**, v. 19, p. 247-58, 2002.
12. CAMISASCA D. R.; HONORATO J.; BERNARDO V.; et al. Expression of bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 45, n.3, p. 225-233, mar. 2009.

¹ As referências apresentadas nesse capítulo se referem àquelas citadas na Introdução, Fundamentação Teórica, Justificativa e Metodologia. Referências seguindo as normas da ABNT NBR 6023:2002

13. CHAN S. L.; MO F. K.; WONG C. S.; et al. A study of circulating interleukin 10 in prognostication of unresectable hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 118, n.16, p.3984-3992, aug. 2012.
14. CHANDLER S, RASSEKH C, ROADMAN S.; et al. Immunohistochemical localization of Interleukin-10 in human oral and pharyngeal carcinoma. **Laryngoscope** v. 112, n.16, p.808-15, aug. 2002.
15. CHEN C. J.; SUNG W. W.; SU T. C. ; et al. High expression of interleukin 10 might predict poor prognosis in early stage oral squamous cell carcinoma patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 415, n.5, p. 25-30, may. 2013.
16. CHEN M. F.; WANG W. H.; LIN P. Y.; et al. Significance of the TGF- β 1/IL-6 axis in oral. **Cancer Clinical Science**, v. 122, n.10, p.459-72, may. 2012.
17. CARMELIET P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n.7070, p. 932-936, dec. 2005.
18. COSTA N. L.; ALENCAR R. C.; VALADARES M. C.; et al. The clinicopathological significance of the expression of Granzyme B in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 46, n.3, p.185-189, mar. 2010.
19. COSTA N. L.; GONÇALVES A. S.; SOUZA-LIMA N. C.; et al. Distinct expression of perforin and granzyme B in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n.5, p. 380-384, may. 2011.
20. COSTA N. L.; VALADARES M. C.; SOUZA P. P.; et al. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 49, n.3, p. 216-223, mar. 2013.
21. COUSSENS L. M.; WERB Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v. 420, p.19-26, 2002.
22. DE VITA F.; ORDITURA M.; GALIZIA G.; et al. Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. **Cancer**, v. 86, n.10, p.1936-1943, nov. 1999.
23. DESRUISSEAU S.; GHAZAROSSIAN-RAGNI E.; CHINOT O.; et al. Divergent effect of TGFbeta1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. **Int J Cancer**, v. 66, n.6, p. 796- 801, jun. 1996.
24. DONG L.; GE X.; WANGA Y.; et al. Transforming growth factor-b and epithelial-mesenchymal transition are associated with pulmonary metastasis in adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncology**, v. 49, n.11, p. 1051-1058, nov. 2013.
25. DORTA R. G.; LANDMAN G.; KOWALSKI L. P.; et al. Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. **Histopathology**, v. 41, n.2, p. 152-157, aug. 2002.

26. EDGE S. B.; BYRD D. R.; COMPTON C. C.; FRITZ A. G.; GREENE F. L.; TROTTI A. **AJCC: Lip and oral cavity**. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*, New York: Springer; 29-40, 2010.
27. ELAHI M, RAKHSHAN V, GHASEMIAN N. T.; et al. Prognostic value of transforming growth factor beta 1 [TGF- β 1] and matrix metalloproteinase 9 [MMP-9] in oral squamous cell carcinoma. **Biomarkers**, v.17, n.1, p. 21-27, feb. 2012.
28. ELASHOFF D.; ZHOU H.; REISS J.; et al. Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. **Cancer Epidemiol Biomarkers**, v. 21, n.4, p. 664-72, apr. 2012.
29. ELLIOTT R. L.; BLOBE G. C. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, n.9, p. 2078–2093, mar. 2005.
30. FAHEY M. S.; PATERSON I. C.; STONE A.; et al. Dysregulation of autocrine TGF-b isoform production and ligand responses in human tumor-derived and Ha-ras-transfected keratinocytes and fibroblasts. **Br J Cancer**, v. 74, n.7, p. 1074–1080, oct. 1996.
31. FAN S.; TANG Q. L.; LIN Y. J. et al. A review of clinical and histological parameters associated with contralateral neck metastases in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Sci**, v. 3, n.4, p. 180-191, oct. 2011.
32. FERREIRA C. G. **Oncologia Molecular**. In: *Imunologia Tumoral*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
33. FERREIRA F. O.; RIBEIRO F. L. L.; BATISTA A. C.; et al. Association of CCL2 with lymph node metastasis and macrophage infiltration in oral cavity and lip squamous cell carcinoma. **Tumor Biol**, v. 29, n.2, p.114-121, jun. 2008.
34. FUJIEDA S.; SUNAGA H.; TSUZUKI H.; et al. IL-10 expression is associated with the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. **Cancer Letters**, v. 136, n.1, p. 1-9, feb. 1999.
35. FUKAI Y.; FUKUCHI M.; MASUDA N.; et al. Reduced expression of transforming growth factor-beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 104, n.2, p. 161–166, mar. 2003.
36. GHOLAMIN M.; MOAVEN O.; MEMAR B.; et al. Overexpression and Interactions of Interleukin-10, Transforming Growth Factor *b*, and Vascular Endothelial Growth Factor in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **World J Surg**, v. 33, n.7, p.1439–1445, jul. 2009.
37. GASPAROTO T. H.; DE SOUZA MALASPINA T. S.; BENEVIDES L.; et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. **Cancer Immunol Immunother**, v. 59, n.6, p. 819-828, jun. 2010.

38. GAUR P.; SINGH A. K.; SHUKLA N. K.; et al. Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancer patients and their clinical significance. **Human Immunology**, v.7, n.4, p.330–37, apr. 2014.
39. GOLDSMITH M, M.; BELCHIS D. A.; CRESSON D. H.; et al. The importance of eosinophil in head and neck cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 106, n.1, p. 27-33, jan. 1992.
40. GONÇALVES A. S.; COSTA N. L.; ARANTES D. A. C.; et al. Immune response in cervical lymph nodes from patients with primary oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 42, n.7, p. 535-540, aug. 2013.
41. GONÇALVES A. S.; WASTOWSKI I. J.; CAPELETTI L. R.; et al. The clinicopathological significance of the expression of HLA-G in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v.117, n.3, p.361–8, mar. 2014.
42. GOUMANS M.J.; VALDIMARSDOTTIR G.; ITOH S.; et al. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. **EMBO J**, v. 21, n.7, p. 1743–1753, apr. 2002.
43. HAMZAVI M.; TADBIR A. A.; REZVANI G.; et al. Tissue Expression, Serum and Salivary Levels of IL-10 in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Asian Pacific J Cancer Prev**, v. 14, n.3, p. 1681-1685, 2013.
44. HASEGAWA Y.; TAKANASHI S.; KANEHIRA Y.; et al. Transforming growth factor- β 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**, v. 9, n.5, p. 964–971, mar. 2001.
45. HATANAKA H.; ABE Y.; KAMIYA T.; et al. Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. **Ann Oncol**, v. 11, n.7, p. 815-829, jul. 2000.
46. HIRATSUKA H.; MIYAKAWA A.; NAKAMORI K.; et al. Multivariate analysis of occult lymph node metastasis as a prognostic indicator for patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer**, v. 80, n.3, p. 351-6, aug. 1997.
47. HU S.; XIE Y.; RAMACHANDRAN P.; et al. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. **Proteomics**, v. 5, n.6, p. 1714-28, apr. 2005.
48. HUBER M.A.; KRAUT N.; BEUG H. Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. **Cell Biol**, v. 17, n.5, p. 548–558, oct. 2005.
49. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2014: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca>> Acesso em: 25 maio 2014.
50. ITO N.; KAWATA S.; TAMURA S.; et al. Positive correlation of plasma transforming growth factor- β 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett**, v. 89, n.1, p. 45–48, feb. 1995.

51. JAKOBSSON L.; VAN MEETEREN L. A. Transforming growth factor β family members in regulation of vascular function: In the light of vascular conditional knockouts. **Experimental Cell Research**, v. 319, n.9, p.1264-1270, may. 2013.
52. JAKOWLEW S. B. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n.3, p. 435–457, sep. 2006.
53. JAVLE M.; LI Y.; TAN D.; et al. Biomarkers of TGF- β Signaling Pathway and Prognosis of Pancreatic Cancer. **PLOS ONE**, v. 9, n.1, p. 1-8, jan. 2014.
54. JURETIĆ M.; CEROVIĆ R.; BELUŠIĆ-GOBIĆ M.; et al. Salivary levels of TNF- α and IL-6 in patients with oral premalignant and malignant lesions. **Folia Biol (Praha)**, v. 59, n.2, p. 99-102, 2013.
55. KJELLMAN, C.; OLOFSSON, S.P.; HANSSON, O.; et al. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. **Int. J. Cancer**, v. 89, n.3, p. 251-258, may. 2000.
56. KAMATANI T.; SHIOGAMA S.; YOSHIHAMA Y.; et al. Interleukin-1 beta in unstimulated whole saliva is a potential biomarker for oral squamous cell carcinoma. **Cytokine**, v. 64, n.2, p. 497-502, nov. 2013.
57. KATO Y.; INOUE H.; YOSHIOKA U.; et al. Effects of transforming growth factor b1, interleukin-1b, tumor necrosis factor a and platelet-derived growth factor on the collagen synthesis and the proliferation of periacinal fibroblastoid cells isolated and cultured from rat pancreatic acini. **Pathophysiology**, v. 3, p. 175–179, 1999.
58. KATO H.; WHITESIDE T. L. Expression of IL-10 and IL-10 Receptors on Peripheral Blood Lymphocytes and Monocytes in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Experimental Clinical Medicine**, v. 36, n.4, p. 144-151, dec. 2011.
59. KATSUNO Y.; LAMOUILLE S.; DERYNCK R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. **Curr Opin Oncol**, v. 25, n.1, p. 76-84, jan. 2013.
60. KIM H. S. ; SHANG T. ; CHEN Z. ; et al. TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP- 1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. **Exp Eye Res**, v. 79, n.2, p. 263–74, aug. 2004.
61. KOROSTOFF A.; REDER L.; MASOOD R.; et al. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. **Oral Oncol**, v. 47, n.4, p. 282-7, apr. 2011.
62. KUMAGAI K.; HAMADA Y.; GOTOH A.; et al. Evidence for the changes of antitumor immune response during lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 110, n.3, p. 341-50, sep. 2010.
63. LEE HM, KIM KS, KIM J. A comparative study of the effects of inhibitory cytokines on human natural killer cells and the mechanistic features of transforming growth factor-beta. **Cell Immunol**, v. 290, n.1, p. 52-61, jul. 2014.

64. LI M.O.; WAN Y. Y.; SANJABI S.; et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 99–146, 2006.
65. LIN W. W.; KARIN M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest**, v. 117, n.5, p.1175-83, may. 2007.
66. LIOTTA L. A.; KOHN E. C. The microenvironment of the tumor-host interface. **Nature**, v. 411, p. 375-9, 2001.
67. LIU J.; SONG B.; WANG J. L.; et al. Polymorphisms of Interleukin-10 promoter are not associated with prognosis of advanced gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 17, n.10, p. 1362-1367, mar. 2011.
68. LOGULLO A. F.; NONOGAKI S.; MIGUEL R. E.; et al. Transforming growth factor b1 (TGFb1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n.3, p. 139–45, mar. 2003.
69. LUWOR R. B.; KAYE A. H.; ZHU J. H. Transforming growth factor- beta (TGF-b) and brain tumours. **J Clin Neurosci**, v. 15, n.8, p.845–855, aug. 2008.
70. MA G. F.; MIAO Q.; ZENG X. Q.; et al. Transforming growth factor-β1 and -β2 in gastric precancer and cancer and roles in tumor-cell interactions with peripheral blood mononuclear cells in vitro. **PLoS ONE**, v. 8, n.1, p. 542-549, jan. 2013.
71. MASSAGUÉ J. TGFβ in Cancer. **Cell**, v. 134, p. 215-230, 2008.
72. MASSANO J. REGATEIRO F. S.; JANUÁRIO G.; et al. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod**, v. 102, n.1, p. 67-76, jul. 2006.
73. MATSUDA M.; SALAZAR F.; PETERSSON M.; et al. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. **J Exp Med**, v. 180, n.6, p. 2371-2376, dec. 1994.
74. MINCIONE G.; DI MARCANTONIO M. C.; ARTESE L.; et al. Loss of expression of TGF-beta1, TbetaRI, and TbetaRII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. **Int J Oncol**, v. 32, n.2, p.323-331, feb. 2008.
75. MONJAZEB A. M.; ZAMORA A. E.; GROSSENBACHER S. K.; et al. Immunoediting and Antigen Loss: Overcoming the Achilles Heel of Immunotherapy with Antigen Non-Specific Therapies. **Front Oncol**, v.3, p. 197, jul. 2013.
76. MOSES H. L.; Roberts A. B. The discovery of TGF-β: A historical perspective. In The TGF-β family. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 1, p. 1–28, 2008.
77. NEMUNAITIS J.; FONG T.; SHABE P.; et al. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. **Cancer Invest**, v. 19, n.3, p. 239–247, 2001.

78. NEVILLE B. W.; DAY T. A. Oral Cancer and Precancerous Lesions. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n.4, p. 195-215, aug. 2002.
79. OKAMOTO M.; OHE G.; OSHIKAWA T.; et al. Induction of cytokines and killer cell activities by cisplatin and 5-fluorouracil in head and neck cancer patients. **Anticancer Drugs**, v. 11, n.3, p.165–173, mar. 2000.
80. OKURA M. Lymph node metastasis. **Recent Res Devel Cancer**, v. 4, p. 331-337, 2002.
81. OLIVEIRA-NETO H. H.; LEITE A. F. O.; COSTA N. L.; et al. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. **Oral Oncol**, v. 43, n.5, p. 484-90, may. 2007.
82. OLIVEIRA-NETO H. H.; SILVA E. T.; LELES C. R.; et al. Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastasis and tumor proliferation in oral squamous cell carcinomas. **Tumour Biol**, v. 29, n.4, p. 262-271, sep. 2008.
83. PARDALI K.; MOUSTAKAS A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1775, n.1, p.21–62, jan. 2007.
84. PEPPER M.S. Transforming growth factor- β : vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 8, n.1, p. 21–43, mar. 1997.
85. PERTOVAARA, L., KAIPAINEN, A., MUSTONEN, T.; et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor β in fibroblastic and epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n.9, p. 6271– 6274, mar. 1994.
86. PINDBORG J. J.; WAHI P. N. Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. World Health Organization Classification of Tumours. 2.ed., **Springer-Verlag**, Berlin, p. 21-31, 1997.
87. PISA P.; HALAPI E.; PISA E.K.; et al. Selective expression of interleukin 10, interferon g and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. **Proc Natl Acad Sci**, v. 89, n.16, p. 7708-7712, aug. 1992.
88. PLATTEN, M.; WICK, W.; WELLER, M. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. **Microsc Res Tech**, v. 52, n.4, p. 401-410, feb. 2001.
89. RHODUS N. L.; HO V.; MILLER C. S.; et al. NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. **Cancer Detect Prev**, v. 29, n.1, p. 42-5, jan. 2005.
90. ROBERTS A.B.; WAKEFIELD L.M. The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, n.15, p. 8621–8623, jul. 2003.
91. ROBBINS, K.T.; CLAYMAN G.; LEVINE P. A.; et al. Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society

and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 128, n.7, p.751-8, jul. 2002.

92. SAHEBJAMEE M.; ESLANI M.; ATARBASHIMOUGHADAM F.; SARAFNEJAD A. Salivary concentration of TNF α , IL1 α , IL6 and IL8 in oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol oral Cir Bucal**, v. 13, N.5, p. E292-5, may. 2008.

93. SALVADORI G.; SANTOS J. N.; MARTINS M. A. T.; et al. Ki-67, TGF- β 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. **Tumor boil**, v. 35, n.8, p. 7635-44, aug. 2014.

94. SANDERSON R. J.; DE BOER M. F.; DAMHUIS R. A.; et al. The influence of alcohol and smoking on the incidence of oral and oropharyngeal cancer in women. **Clinical Otolaryngol Allied Scienc**, v.22, n.5, p. 444-8, oct. 1997.

95. SATO J.; GOTO J.; MURATA T.; et al. Changes in saliva interleukin-6 levels in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 110, n.3, p. 330-6, sep. 2010.

96. SMITH A.; TEKNOS T. N.; PAN Q. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 49, n.4, p. 287–292, apr. 2013.

97. SPIRO R. H.; GUILLAMONDEGUI O. J. R.; PAULINO A. F.; et al. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. **Head Neck**, v. 21, n.5 p. 408-13, aug. 1999.

98. TAKESHIMA T.; CHAMOTO K.; WAKITA D.; et al. Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. **Cancer Res**, v. 70, n.7, p.2697–2706, apr. 2010.

99. TANO T.; OKAMOTO M.; KAN S.; et al. Immunochemoradiotherapy for Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma: Augmentation of OK-432–Induced Helper T Cell 1 Response by 5-FU and X-ray Irradiation1. **Neoplasia**, v.15, n.7, p.805-14, jul. 2013.

100. THIERY J. P. Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, p. 740–746, 2003.

101. THOMAS, D. A.; MASSAGUE, J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. **Cancer Cell**, v. 8, n.5, p. 369–380, nov. 2005.

102. TIAN Y. C.; PHILLIPS A. O. Interaction between the transforming growth factor-beta type II receptor/Smad pathway and beta-catenin during transforming growth factor-beta 1-mediated adherens junction disassembly. **Am J Pathol**, v. 160, n.5, p.1619–1628, may. 2002.

103. TSAMANDAS A. C.;, KARDAMAKIS D.; RAVAZOULA P.; et al. The Potential Role of TGF_1, TGF_2 and TGF_3 Protein Expression in Colorectal Carcinomas. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 180, n.4, p.201–28, apr. 2004.

104. TUMULURI V.; THOMAS G. A.; FRASER I. S. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 33, n.4, p.204-208, apr. 2004.
105. VAGENAS K.; SPYROPOULOS C.; GAVALA V.; et al. TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3 protein expression in gastric carcinomas: correlation with prognostics factors and patient survival. **J Surg Res**, v. 139, n.2, p. 182–188, may. 2007.
106. VAN BELLE P.; RODECK U.; NUAMAH I.; et al. Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms. **Am J Pathol**, v. 148, n.6, p.1887–1894, jun. 1996.
107. VAN DER WAAL I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, v. 45, n.5, p. 317-23, may. 2009.
108. VAN-DIEST P. J.; BRUGAL G.; BAAK J. P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. **J Clin Pathol**, v. 51, n.10, p. 716-24, oct. 1998.
109. VAN-KEMPEN L. C.; RHEE J. S.; DEHNE K.; et al. Epithelial carcinogenesis: dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment. **Differentiation**, v. 70, n.10, p. 610-23, dec. 2002.
110. VAN-KEMPEN L. C.; RUITER D. J.; VAN MUIJEN G. N.; et al. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. **Eur J Cell Biol**, v. 82, n.11, p. 539-48, nov. 2003.
111. VISSER K. E.; COUSSENS L. M. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. **Cancer Immunol Immunother**, v. 54, n.11, p. 1143–52, nov. 2005.
112. VISSER K. E.; EICHTEN A.; COUSSENS L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature**, v.6, n.1, p.24-36, jan. 2006.
113. XIE X.; CLAUSES O. P.; DE ANGELIS P.; et al. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, bcl-2, and p53 in oral squamous cells carcinoma of the tongue. **Cancer**, v. 860, n.6, p. 913-920, sep. 1999.
114. ZAMARRON B. F.; CHEN W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **Int J Biol Sci**, v. 7, n.5, p.651-658, may. 2001.
115. ZANCOPE E.; COSTA N. L.; JUNQUEIRA-KIPNIS A. P.; et al. Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 39, n.2, p.162-167, feb. 2010.
116. ZHANG M.; ZHANG P.; ZHANG C.; et al. Prognostic significance of bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n.3, p. 307-313, mar. 2009.
117. ZICHA D.; GENOT E.; DUNN G. A.; et al: TGFbeta1 induces a cell-cycle-dependent increase in motility of epithelial cells. **J Cell Sci**, v.112, n.4, p. 447-454, feb. 1999.

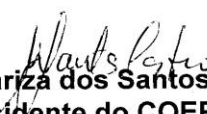
118. WALKER R.A.; DEARING S.J.; GALLACHER B. Relationship of transforming growth factor β 1 to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma. **Br J Cancer**, v. 69, n.6, p. 1160–1165, jun. 1994.
119. WATANABE S, WATANABE R, OTON-LEITE AF.; et al. Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Sci**, v. 52, n.3, p. 417-424, sep. 2010.
120. YANG L.; PANG Y.; MOSES L. H. TGF-b and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends in Immunology**, v. 31, n.6, p. 220–227, jun. 2010.

ANEXOS

ANEXO A**UFMG**Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP**Parecer nº. ETIC 087/07****Interessado(a): Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas
Faculdade de Odontologia-UFMG****DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 17 de maio de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Papel dos receptores c-erbB-1 (EGFR) e c-erbB-2 (Neu/HER-2) em carcinoma de células escamosas de língua e assoalho bucal: avaliação da imunexpressão, dos níveis salivares, e da associação com amplificação gênica, metaloproteinases de matriz (MMPs) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Mariza dos Santos Castro
Vice-Presidente do COEP-UFMG
Presidente, em exercício

ANEXO B



RECEBEMOS

Em _____

PROTOCOLO N.
032/2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO**I – Identificação:**

- Título do projeto: Mecanismos moleculares envolvidos na evasão tumoral do carcinoma espinocelular de boca e sua relação com fatores de prognóstico e microscópico
- Pesquisador Responsável: Aline Carvalho Batista
- Instituição responsável pela pesquisa: Universidade Federal de Goiás - FO.
- Data de apresentação ao CEP/UFG: 22/02/2011

VI – Parecer do CEP:

- Após análise dos documentos anexados, pelos pesquisadores, em atenção aos itens pendentes, constata-se o atendimento aos requisitos solicitados e por sua vez à resolução CNS 196/96, portanto o parecer, S.M.J deste comitê, é pela **APROVAÇÃO.**

P.S. Observações: Favor verificar as datas para entrega dos relatórios parcial e final.

VII – Data da reunião: 28 /03/2011

Assinatura do(a) relator(a)

Assinatura do(a) Coordenador(a)/ CEP:

Prof. João Carlos da Rocha Medra^d
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFG

ANEXO C

Normas de publicação do periódico Human Immunology.

• **GUIDE FOR AUTHORS**

Manuscript format and structure

Full-Length Articles

Limit 4000 words excluding references, tables, and figures

Abstract 200 words maximum

References up to 50

The manuscript should include the following sections: Title Page, Abstract (not more than 200 words), Keywords (up to 5), Abbreviations (list of abbreviations used), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Figure Legends, and Figures.

The title page should include the names and affiliations of the authors, the complete address, e-mail address, and telephone and facsimile numbers of the corresponding author, five keywords, and an abbreviated title of not more than 45 characters and spaces. Footnotes in the text should be defined on the page on which they appear and be numbered consecutively with superscript Arabic numerals.

Contact details for submission

Submission of manuscripts to this journal proceeds totally online, by means of the electronic submission tool (EES) at <http://ees.elsevier.com/him>

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation,

so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available

from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals, <http://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/him/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>).

Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Each table should be typed double-spaced on a separate page, and numbered consecutively in accordance with their appearance in the text. Table titles should be informative, with detailed information appearing as footnotes. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Use only horizontal rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in

the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

ANEXO D

Normas de publicação do periódico Tumor Biology.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.
- Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a

reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article
Smith JJ. The world of science. Am J Sci. 1999;36:234–5.
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. 2000; doi:10.1007/s001090000086
- Book
Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.
- Book chapter
Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. pp. 251–306.

- Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

(http://www.springer.com/biomed/cancer/journal/13277?detailsPage=plctci_1490509)