



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCA KIICHI SUZUKI TRANCOLIN

**PERFIL DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO
HPV(+) e HPV(-).**

LUCA KIICHI SUZUKI TRANCOLIN

**PERFIL DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO
HPV(+) e HPV(-).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz

Co-orientador: Prof. Dr. André Armani

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

T772p Trancolin, Luca Kiichi Suzuki.
Perfil de marcadores de estresse oxidativo e mediadores inflamatórios em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço HPV(+) e HPV(-) / Luca Kiichi Suzuki Trancolin. - Londrina, 2022.
86 f. : il.

Orientador: Rodrigo Cabral Luiz.
Coorientador: André Armani.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Papillomavirus Humano - Tese. 2. Radicais livres - Tese. 3. Citocinas - Tese. 4. Gradação histológica de tumores - Tese. I. Luiz, Rodrigo Cabral . II. Armani, André . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616

LUCA KIICHI SUZUKI TRANCOLIN

**PERFIL DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO
HPV(+) e HPV(-).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Fernando Pinheiro de Souza Neto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Maria Isabel Lovo-Martins
Instituto Carlos Chagas - Fiocruz

Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 11 de maio de 2022.

AGRADECIMENTOS

Nesses anos de mestrado, de muito estudo, esforço e empenho, em meio a uma pandemia tudo foi mais intenso e difícil, por isso, gostaria de agradecer a algumas pessoas que foram fundamentais durante todo esse processo. Expresso aqui, através de poucas palavras, um pouco da importância que elas tiveram nessa conquista.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Karina Mie Suzuki Trancolin e Gilberto Trancolin Júnior que me concederam o privilégio de estar onde estou, me apoiaram em todos os momentos com muito amor, me estimularam a sempre continuar em busca de conhecimento e sempre acreditaram em mim.

Agradeço também à minha avó Maria José Silvério que me incentivou durante esse tempo e pelo profundo apoio. Ao Flávio Henrique, que se fez presente desde que me mudei para Londrina e se dispôs a estar ao meu lado em todos os momentos com muito amor.

Ao meu irmão (Gilberto Mitsuo) e à minha tia (Gislaine), que me acompanharam de perto e torceram por mim.

Aos meus amigos e amigas (Ana Lorena, João Scalada, Ketlyn, Maria Júlia, Mariana Sikina, Milena Giovana e Tardelli) que mesmo com a distância, sempre se fizeram presentes na minha vida. Obrigado pelo companheirismo, risadas, conversas, apoio e amizade.

Agradeço à Kelly Bortoloti e Ana Cristina Pires que me acolheram como um amigo no setor 6 do ambulatório de clínicas e não pouparam esforços na colaboração desse trabalho.

À técnica do laboratório de anatomia patológica do HU, Maria Eunice de Almeida pela generosidade em aceitar me ajudar nos procedimentos de histologia.

Aos meus amigos de laboratório, doutorandas Isabela Chagas e Liara Freitas, doutorando Thiago Nascimento, mestrandos Josi de Melo e William Campellari e graduanda Gabriela Fernandes, que compartilharam e tornaram mais leves o dia a dia de trabalho, que muitas vezes me ajudaram e me orientaram neste árduo percurso acadêmico, compartilhando importantes conhecimentos e me ensinaram muitas coisas, estando ao meu lado, prontos para me ajudar sempre que necessário.

Ao técnico de laboratório Jesus (Zui), pela disposição, atenção e ajuda em diversos momentos, que faz o possível para o funcionamento do laboratório.

Agradecimentos também à profa. Dra. Maria Isabel Lovo-Martins pela disponibilidade, que mesmo em seus dias corridos reservou um tempo para me auxiliar e tirar dúvidas sobre citometria.

Minha gratidão especial ao meu orientador Professor Dr. Rodrigo Cabral Luiz, que me guiou e deu suporte durante esse processo, sendo sempre muito solícito e depositou sua confiança em mim ao longo desses anos. Agradecimentos também à Professora Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani pela confiança de me deixar conduzir um de seus projetos de pesquisa e ao Professor Dr. André Armani por ter me recebido tão bem em suas cirurgias e pela partilha de conhecimentos acerca do CCECP.

Agradeço às professoras Dra. Karen Brajão de Oliveira e Dra. Flávia Alessandra Guarnier, e ao prof. Dr. Fernando Pinheiro de Souza Neto, membros da banca de Qualificação e Defesa, pelos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento deste projeto.

Dedico este trabalho a todos os pacientes que aceitaram em participar mesmo estando em um momento tão difícil. Á todos os pacientes que se foram durante esses anos, que lutaram bravamente pela sobrevivência e que não estão mais entre nós. Minha dedicatória é em especial para o meu tio avô João Silvério que enquanto eu me preparava para terminar este trabalho acabou por não resistir ao câncer de cabeça e pescoço.

TRANCOLIN, Luca Kiichi Suzuki. **Perfil de marcadores de estresse oxidativo e mediadores inflamatórios em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço HPV(+) e HPV(-)**. 86 f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) é o sexto tipo de tumor mais comum no mundo e a infecção pelo papilomavirus humano (HPV) está presente no desenvolvimento desse câncer, tendo o envolvimento do estresse oxidativo e da inflamação crônica. Tivemos como objetivo avaliar os marcadores de estresse oxidativo e o perfil inflamatório sistêmico em pacientes com CCECP positivos e negativos para HPV. Amostras de sangue e de tumor foram coletadas de 43 pacientes em quatro hospitais entre setembro de 2019 a novembro de 2021. O grupo controle foi formado por voluntários saudáveis. Um questionário foi aplicado para coletar dados sociodemográficos e de hábitos. Os eritrócitos foram utilizados para quantificar peroxidação lipídica inicial, glutathiona reduzida (GSH), atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Lipoperoxidação tardia foi quantificada no plasma. O perfil inflamatório de citocinas de perfil Th1/Th2 foi dosado por citometria de fluxo no soro. Fragmentos de tumor foram submetidos a imunohistoquímica para marcação p16INK4a para presença de HPV. Observamos predomínio de homens (71.7%) e caucasianos (83.7%), consumo de álcool frequente (37.2%) e tabagismo (44%). A atividade das enzimas SOD ($p < 0.0001$) e CAT ($p < 0.0001$) estavam elevadas nos pacientes com CCECP. Níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-2 estavam indetectáveis no grupo CCECP. Níveis de IL-10 ($p < 0.0001$) e IL-4 ($p < 0.0001$) estavam mais baixos em comparação com controle e para IL-6 não observamos diferença significativa. O HPV estava presente em 30% dos pacientes e nenhuma diferença significativa foi encontrada nos parâmetros avaliados entre pacientes HPV(-) e HPV(+). Já nos grupos de diferentes gradações histológicas, somente aumento de GSH no grupo pouco diferenciado foi observado. Demonstramos que a infecção pelo HPV não afeta os parâmetros inflamatórios e de estresse, e que aparentemente ocorre uma adaptação sistêmica contra o estresse oxidativo em tumores pouco diferenciados.

Palavras-chaves: papillomavirus humano; radicais livres; citocinas; gradação histológica de tumores.

TRANCOLIN, Luca Kiichi Suzuki. **Profile of oxidative stress markers and inflammatory mediators in patients with head and neck squamous cell carcinoma HPV(+) and HPV(-)**. 2022. 86 p. Masters' dissertation (Post graduate Program in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common type of tumor in the world. Oxidative stress and chronic inflammation are present in this type of cancer and human papillomavirus (HPV) infection can also participate on carcinogenesis process. We aimed to evaluate oxidative stress markers and the systemic inflammatory profile in HNSCC patients positive and negative for HPV. Blood and tumor samples were collected from 43 patients at four hospitals between September 2019 and November 2021. The control group consisted of healthy volunteers. A questionnaire was applied to collect sociodemographic and habit data. Erythrocytes were used to quantify initial lipid peroxidation, reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activity. Late lipoperoxidation was quantified in plasma. The inflammatory Th1/Th2 profile was measured by flow cytometry in serum. Tumor fragments were submitted to immunohistochemistry for p16INK4a labeling for HPV presence. We observed a predominance of men (71.7%) and Caucasians (83.7%), frequent alcohol consumption (37.2%) and smoking (44%). The enzymes SOD ($p < 0.0001$) and CAT ($p < 0.0001$) activity were elevated in HNSCC patients. IFN- γ , TNF- α and IL-2 levels were undetectable in HNSCC group. IL-10 ($p < 0.0001$) and IL-4 ($P < 0.0001$) levels were lower compared to control and for IL-6 we did not observe significant difference. HPV was present in 30% patients and no significant difference was found in the parameters evaluated between HPV(-) and HPV(+) patients. In the different histological grade groups, only an increase in GSH in the poorly differentiated group was observed. We demonstrated that HPV infection does not affect stress and inflammatory parameters, and that systemic adaptation against oxidative stress appears to occur in poorly differentiated tumor.

Key-words: human papillomavírus; free radicals; cytokines; neoplasm grading.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Números estimados mundialmente de incidência e mortalidade do câncer de cabeça e pescoço de 2020 a 2040 entre homens e mulheres.....	11
Figura 2 – Carcinoma de células escamosas. Bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado.....	15
Figura 3 – Organização do genoma do HPV16.....	17
Figura 4 – Ciclo de vida do Papilomavirus humano	19
Figura 5 – Efeito da proteína E7 sobre a proteína do retinoblastoma (pRb) e E2F.....	21
Figura 6 – Danos celulares induzidos pelo estresse oxidativo	25
Figura 7 – Reações realizadas pelas enzimas superóxido dismutase e catalase	26
Figura 8 – Ciclo catalítico da glutathione.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8OHdG	8-hidroxi,2-deoxiguanosina
CAT	Catalase
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CCECP	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
CDK	Quinases dependentes de ciclina
CEC	Carcinoma epidermóide/ Carcinoma de células escamosas
CK	Citoqueratina
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GLOBOCAN	Observatório global de câncer
GO	Glutathione Oxidase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma (Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço)
HPV	Papilomavírus Humano
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de câncer
LCR	Longa região de controle
MDA	Malondialdeído
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida
O ₂ ⁻	Superóxido
OH•	Radical hidroxil
ORF	Região de leitura aberta
pRb	Proteína do retinoblastoma
SOD	Superóxido dismutase
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	11
1.2	CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO	13
1.3	FATORES DE RISCO	16
1.3.1	Vírus Do Papiloma Humano (HPV)	16
1.3.2	Tabagismo E Etilismo	21
1.4	INFLAMAÇÃO E CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.....	22
1.5	ESTRESSE OXIDATIVO	24
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
	RESULTADOS	30
	ARTIGO	32
	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

O termo “Câncer de cabeça e pescoço (CCP)” é utilizado para descrever um conjunto de tumores malignos que surgem na região compreendida entre a base do crânio e as clavículas, principalmente no trato aero digestivo superior (LAURA, CHOW, 2020). Desta forma, são cânceres que podem surgir em lábios, cavidade oral, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, laringe, seios paranasais e glândulas salivares (ALFOUZAN, 2020).

O CCP é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, sendo mais incidente em indivíduos do sexo masculino e acima de 50 anos. No mundo, a estimativa para o ano de 2020 foi de 878 mil casos, sendo a Índia o país com maior incidência (20 casos/100.000 indivíduos) (COELHO, 2012). A incidência do CCP tem aumentado ao longo dos anos, sendo previsto que até 2040 ocorra um aumento de 30% no número de casos, ou seja 1,08 milhão de casos/ano (Fig.1) (GLOBOCAN, 2021).

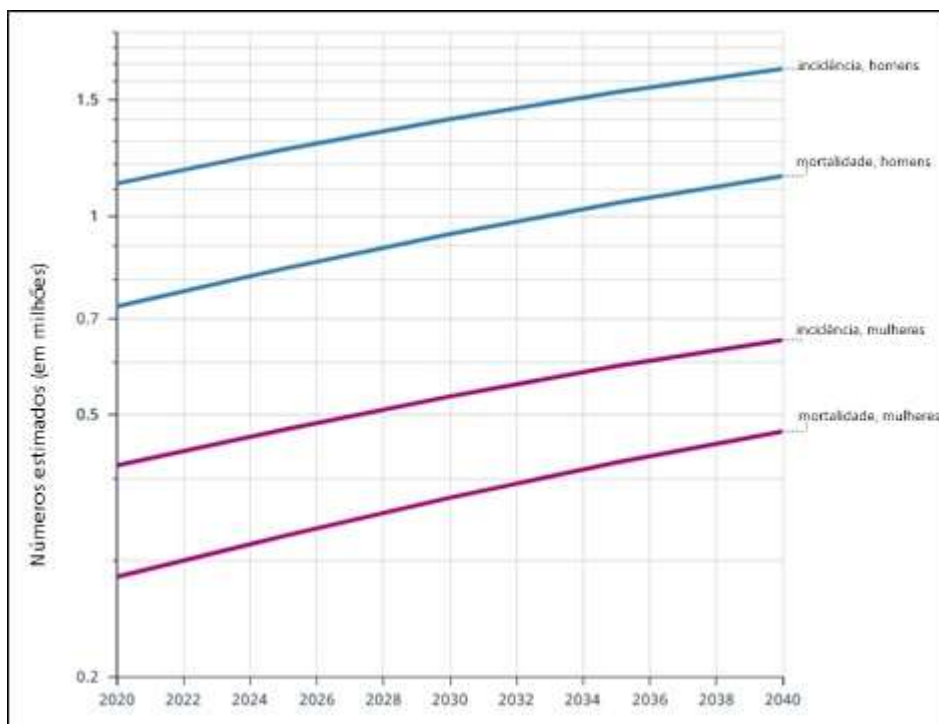


Figura 1- Números estimados mundialmente de incidência e mortalidade do câncer de cabeça e pescoço de 2020 a 2040 entre homens (azul) e mulheres (rosa). Fonte: GLOBOCAN, 2021.

No Brasil, tumores na cavidade oral e na laringe aparecem entre os dez tipos de cânceres que mais afetam homens com 11.180 e 6.470 mil casos, respectivamente (INCA, 2020). Em termos de mortalidade, no ano de 2017 ocorreram 507 mil mortes no mundo devido a CCP, representando cerca de 5,3% de todas as mortes por câncer (AUPÉRIN, 2020).

A sobrevida global de cinco anos (após o diagnóstico) de CCP nos Estados Unidos é de aproximadamente 65,0%, e aumentou significativamente nos últimos vinte anos, tendo sido atribuído a avanços no tratamento e relacionado ao status do tumor acerca do Papilomavírus Humano (HPV) (RETTIG, D'SOUZA, 2015).

A apresentação dos sintomas do CCP depende da localização anatômica e da etiologia do tumor. Na cavidade oral, por exemplo, o paciente pode visualizar a própria lesão, especialmente quando há o surgimento de úlceras ou feridas que não cicatrizam comprometendo a fala e a mastigação, desta forma na cavidade oral o CCP costuma ser diagnosticado mais precocemente (VALDEZ, BRENNAN, 2018). Tumores da orofaringe geralmente se tornam sintomáticos em uma fase mais tardia, sendo a disfagia (dificuldade de comer), dor ao engolir e dor de ouvido os mais frequentes (LICITRA *et al.*, 2002). No acometimento da laringe, os pacientes apresentam alterações vocais ou rouquidão, e se o tumor estiver em situação avançada o indivíduo costuma apresentar dispneia (STEUER *et al.*, 2016).

O diagnóstico é realizado por biópsia (excisional ou incisional) e avaliação em microscópio após coloração de cortes histológicos com hematoxilina e eosina. Testes de imuno-histoquímica para diferenciação dos subtipos e gradação tumoral podem ser utilizados para complementar o diagnóstico (CHUN-HUI, ZHAI, WANG, 2017). Para o estadiamento do tumor é necessário reunir resultados de exames laboratoriais e clínicos, como biópsia, tomografias e ressonâncias, que auxiliam na tomada de decisões terapêuticas do paciente (ARGIRIS *et al.*, 2008).

Cada abordagem terapêutica é individual e será guiada pela localização do tumor, estágio da doença e desejos do paciente. As principais modalidades terapêuticas para o tratamento curativo são a ressecção do tumor, a radioterapia e a quimioterapia. Em pacientes com um câncer primário pequeno, altas taxas

de cura podem ser alcançadas com uma única modalidade de intervenção, geralmente radioterapia ou ressecção cirúrgica (LEE *et al.*, 2018). Em tumores mais avançados, a radioterapia pós-operatória e a quimio-radioterapia são mais utilizadas e reduzem o risco de recorrência tumoral (COOPER *et al.*, 2004).

1.2 – CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

Do ponto de vista histológico o CCP é relativamente diverso, mas os tipos mais comuns são os carcinomas, adenocarcinomas, melanomas, sarcomas e linfomas. Destes, os carcinomas apresentam maior frequência, sendo que o carcinoma de células escamosas (CCE) ou também denominado carcinoma epidermóide corresponde a mais de 90% dos casos. (BATISTA *et al.*, 2015). É importante ressaltar que carcinoma é um termo utilizado para descrever neoplasias malignas de origem epitelial. No caso do carcinoma de células escamosas, as células neoplásicas apresentam características morfológicas semelhantes às do estrato escamoso da pele e de mucosas (KUMMAR, 2010).

O desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) segue uma série ordenada de etapas. O processo se inicia com hiperplasia de células epiteliais que evolui para displasia. O maior comprometimento dos estratos da mucosa permite a evolução de uma displasia leve até uma displasia grave. Nesta fase as células apresentam maior facilidade para finalizar o processo de malignização por acúmulo de mutações genéticas e evoluem para o carcinoma *in situ*, que seria um conjunto de células cancerígenas que ainda não invadiram tecidos adjacentes, como a submucosa. Após o acúmulo de novas mutações e adaptações, as células neoplásicas conseguem invadir outros tecidos surgindo o carcinoma invasivo (JOHNSON *et al.*, 2020).

As lesões do carcinoma de células escamosas podem se apresentar como nódulos, cordões ou agregados. Regionalmente podem invadir tecido submucoso, linfovascular, muscular, ósseo e cartilaginoso. Além disso, as lesões podem causar mais complicações ao ulcerar (HICKS, LIN, BUCZEK, 2020).

Histopatologicamente, o carcinoma invasivo no CCP pode ser classificado como: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (indiferenciado ou anaplásico). Tumores bem diferenciados se assemelham ao epitélio estratificado com células de aparência madura e que se organizam em camadas com queratinização irregular formando figuras denominada de “pérolas

córneas” ou “pérolas de queratina”, também é possível observar desmossomos que conferem um aspecto espinhoso ou de ponte nas regiões de contato célula-célula (Fig. 2). Já o tumor pouco diferenciado se caracteriza pela presença de células imaturas com pleomorfismo nuclear, mitoses atípicas e perda da organização celular e da queratinização (KUMAR, 2010; FLETCHER, 2013).

Clinicamente o CCECP pode ainda apresentar subtipos menos comuns:

- Carcinoma verrucoso: mais comum na laringe com aparência de verruga. Histologicamente apresenta proliferação epitelial florida e em formato de folhas bulbosas, células uniformes com pouca ou nenhuma displasia, sem a presença de disceratose ou pleomorfismo nuclear, mitose celular apenas na área basal, pouca proliferação de células epiteliais e queratinização da superfície (queratose). As formas puras de carcinoma verrucosos não metastizam, porém, os carcinomas híbridos com CEC convencional apresentam esta capacidade (FLETCHER, 2013; ECHANIQUE *et al.*, 2016);
- Carcinoma papilífero escamoso: mais comum na cavidade nasal e laringe e apresenta crescimento em forma de fio (filiforme) com projeções digitiformes em crescimento bulboso e arredondados que se assemelham a couve-flor, e diferentemente do CCE verrucoso, a sua queratinização da superfície é limitada ou ausente (DING *et al.*, 2013);
- Carcinoma escamoso de padrão basalóide: mais frequentemente na hipofaringe. É bastante invasivo e pode se organizar em diversos padrões como lóbulos, ninhos, cordões, trabéculas. Pode apresentar displasia severa com grande atividade mitótica e presença de necrose no centro do tumor. Uma de suas principais características é a presença predominante de células de aparência basalóide organizadas em paliçada associadas com células escamosas. Na imunohistoquímica apresenta positividade para marcação de citoqueratinas 5 e 6 e p63, enquanto é negativo para S100, CK7 e CK14. É considerado de pior prognóstico e muitas vezes resulta em morte em até um ano após diagnóstico (FLETCHER, 2013; JUMAILY *et al.*, 2018; HICKS, LIN, BUCZEK, 2020).

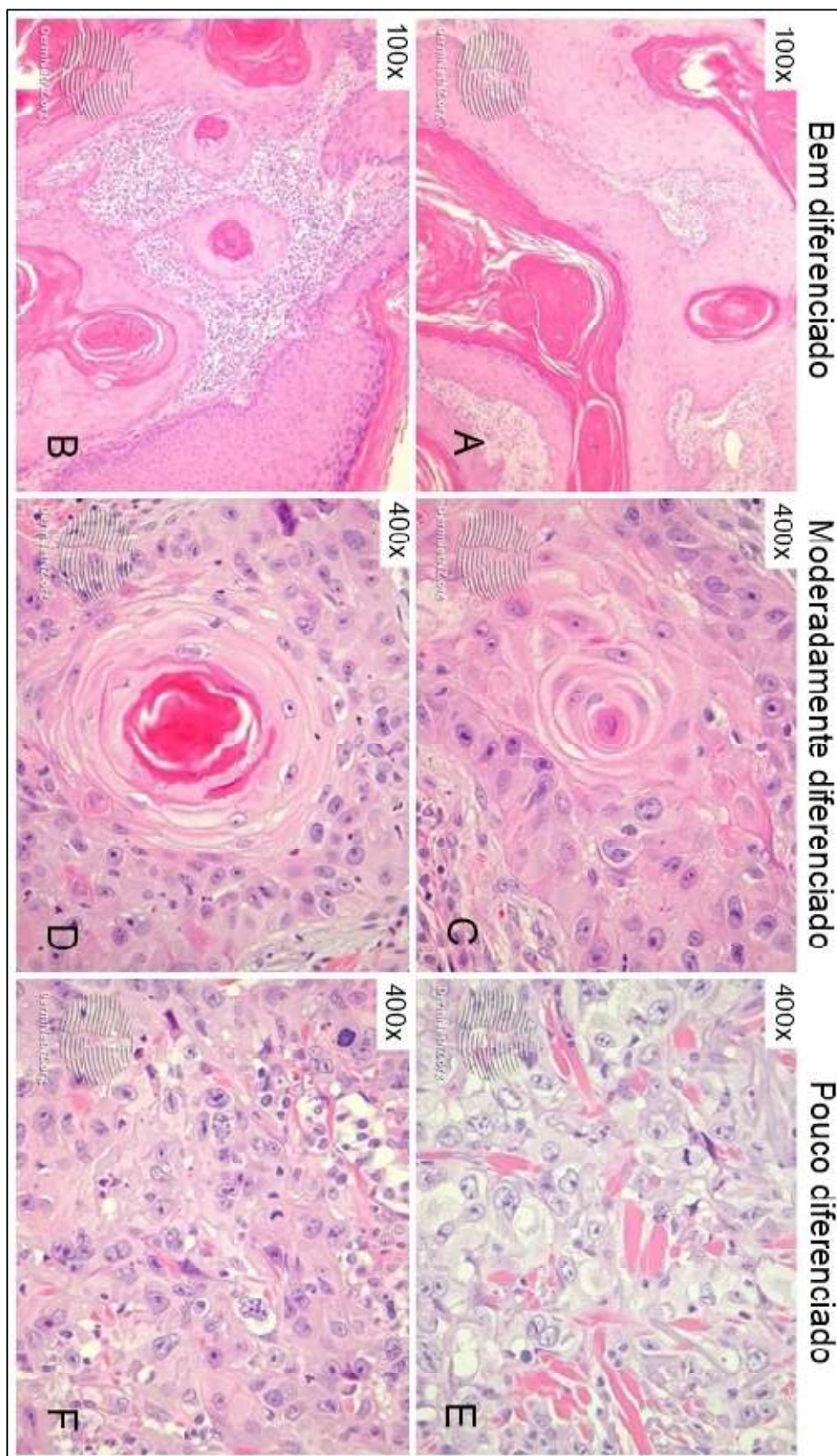


Figura 2- Carcinoma de células escamosas. (A, B) Bem diferenciado. Aumento de 100x (C, D) Moderadamente diferenciado. Aumento de 400x (E, F) Pouco diferenciado. Aumento de 400x. Fonte: TURNBULL, 2014.

1.3 – FATORES DE RISCO

Independentemente do tipo histológico, já são conhecidos alguns fatores de risco envolvidos na carcinogênese do CCECP. Destes podemos destacar o tabagismo, o alcoolismo e a infecção pelo Papilomavirus humano (HPV) (RETTIG, D'SOUZA, 2015).

1.3.1 – VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)

Em 2017 a União para o Controle Internacional do câncer reconheceu o HPV como fator de risco para o CCECP e que a detecção da infecção viral é determinante para o prognóstico e estadiamento da doença, tornando obrigatória a realização da testagem para o vírus nos casos de carcinoma de orofaringe. Para esta detecção é utilizada a marcação da proteína p16^{INK4A} em peças de biópsia tumoral (TABERNA *et al.*, 2017), que será melhor discutida adiante.

Nos Estados Unidos, cerca de 5 a 8% da população apresentam infecção oral por HPV, sendo que alguns grupos, como indivíduos com vírus da imunodeficiência humana (HIV), apresentam maior índice de infecção. Em relação à infecção da cérvix uterina, a infecção oral por HPV tem aumentado ao longo dos anos (SZYMONOWICZ, CHEN, 2020). Isso resulta em um aumento da taxa de positivos para HPV em pacientes com câncer de orofaringe. Por exemplo, neste tipo de câncer 16,3% dos pacientes apresentavam infecção por HPV entre anos 1984 a 1989, já entre os 2000 a 2004 a taxa de positivos para HPV subiu para 72,7% dos pacientes. Mais recentemente a taxa de positividade para HPV foi estimada em 70 a 90% dos pacientes (SCOTT-WITTENBORN, FAKHRY, 2021).

A relação entre HPV e o CCE teve início nos anos de 1930 em estudos com coelhos, onde foi observado que alguns animais eram capazes de eliminar o vírus sem complicações e enquanto outros desenvolviam CCE (PARSONS, KIDD, 1936).

O HPV é um vírus de DNA de fita dupla não envelopado e tem a capacidade de infectar tecidos mucosos e cutâneos. Seu material genético apresenta aproximadamente 8.000 pares de bases e fica contido dentro de uma estrutura protéica esférica, denominada capsídeo, composta por 72 capsômeros. O capsídeo é composto por basicamente 2 proteínas, a L1 e a L2, que também

estão envolvidas na infecção tecido-específica do vírus. Estas proteínas são codificadas a partir dos genes L1 e L2 respectivamente, onde a letra L se refere a palavra “*late*”, traduzido como tardio, uma vez que são genes que se expressam de forma mais tardia. A replicação viral é controlada pelos genes iniciais, do inglês “*early*”, denominados de E1 e E2. As proteínas E1 e E2 são reguladoras de transcrição de outros genes virais (Fig. 3). O genoma viral ainda apresenta uma região LCR (longa região de controle) que regula replicação do DNA viral e também outros genes como o E5, E6 e E7 que são considerados oncogenes virais responsáveis pela carcinogênese (SPENCE *et al.*, 2016; SABATINI, CHIOCCA; 2020).

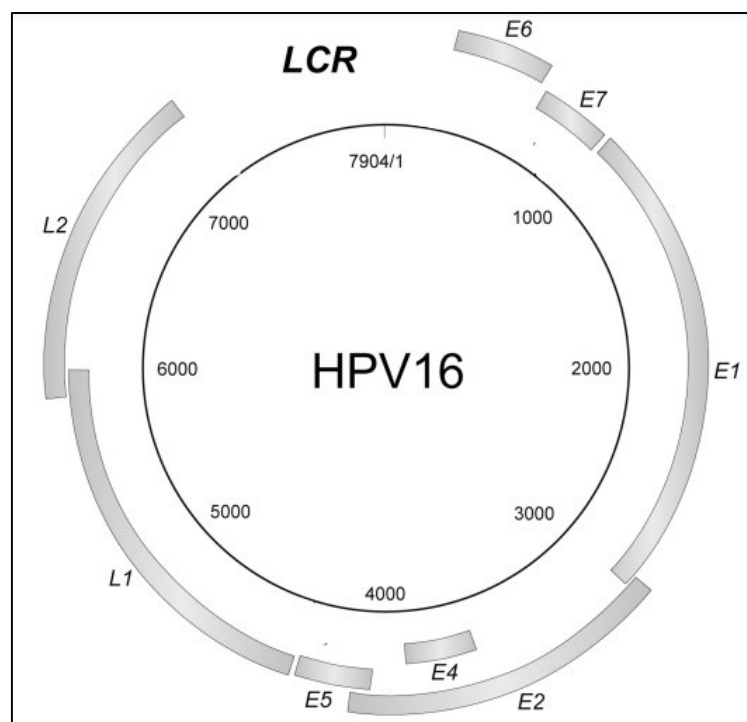


Figura 3- Organização do genoma circular do HPV16 com os genes de transcrição iniciais (E) e tardios (L). Adaptado de: KAJITANI *et al.*, 2012.

O HPV tem sido associado a uma ampla gama de doenças proliferativas que incluem desde lesões benignas a casos de câncer. A infecção pelo HPV está entre as infecções sexualmente transmissíveis e é considerada uma das infecções mais comuns no mundo. Estima-se que mais de 80% da população humana se infecte com algum tipo de HPV em algum momento da vida (WINER, KOUTSKY, 2002).

Existem cerca de 200 tipos de HPV, e estes são agrupados em cinco gêneros principais de acordo a sequência de nucleotídeos das regiões ORF (do inglês “*Open Reading Frames*”, locais de transcrição gênica): α -papilomavirus (mais relacionados com o câncer), β -papilomavirus, γ -papilomavirus, μ -papilomavirus e o ν -papilomavirus (BZHALAVA, EKLUND, DILLNER, 2015). Já do ponto vista clínico, os tipos de HPV são classificados em HPV de baixo risco e HPV de alto risco. Os de baixo risco (ex.: HPV 6, 11, 42, 43, 44) são associados a lesões benignas como verrugas ou papilomas, enquanto os de alto risco (ex.: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) apresentam maior potencial carcinogênico e são associados a diversos tipos de câncer incluindo o CCECP (CHANG, JEANG, 2020).

Com dito anteriormente, os HPV do grupo alfa possuem a capacidade de infectar tecidos mucosos e cutâneos, para que isso ocorra é necessário que lesões nestes tecidos deem acesso as camadas mais profundas do tecido, onde o vírus pode acessar células progenitoras de queratinócitos localizados na camada basal. Estas lesões muitas vezes são micro feridas induzidas por agentes físicos, e no caso de mucosa cervical, peniana, anal e oral podem ser causadas durante o ato sexual (SANJOSÉ, BROTONS, PAVON, 2017). A entrada do papilomavirus na célula hospedeira parece ocorrer via endocitose, por vesículas cobertas de clatrina (ARALDI *et al*, 2018). Após sua internalização, o material genético do HPV alcança o núcleo da célula onde permanece em forma circular sem interagir com o genoma celular (forma epissomal) (SOUZA *et al*, 2015).

Por ação do oncogenes virais, as células infectadas apresentam maior facilidade em entrar em divisão celular. À medida que estas células atingem camadas mais superficiais, o material genético viral também é duplicado durante a fase S, ocorrendo amplificação do genoma viral. Em seguida são produzidas as proteínas do capsídeo, montagem do virion e liberação de novos vírus nas camadas superiores do epitélio (Fig.4) (MOODY, LAIMINS, 2010).

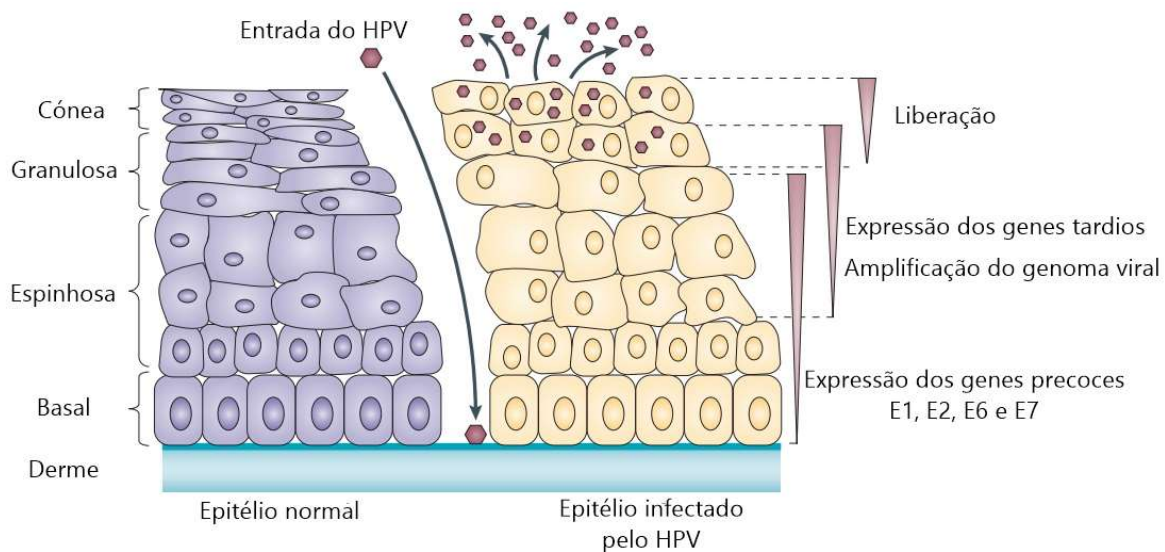


Figura 4- Ciclo de vida do Papilomavírus humano. Adaptado de: MOODY, LAIMINS, 2010.

Na maioria dos casos a infecção pelo HPV é assintomática e se resolve espontaneamente através da participação da resposta imune do hospedeiro e em torno de 10% progredem para lesões de baixo grau, já as lesões de alto grau podem progredir para o câncer (VIDAL, GILLISON, 2008). Em lesões benignas e pré-cancerosas o genoma do HPV costuma permanecer em seu estado episomal. Por outro lado, em lesões de alto grau é observado um fenômeno de integração do genoma do vírus ao DNA cromossômico celular, este evento é observado principalmente para os tipos HPV 16 e 18 e está associado ao escape do sistema imunológico do hospedeiro (FARAJI *et al*, 2017).

Duas proteínas, a E6 e E7, são essenciais no processo de carcinogênese, as ações cooperadas destas duas oncoproteínas promovem a proliferação celular, inibem a apoptose e a imortalização das células, conferindo uma vantagem adaptativa para as células infectadas que sofreram transformação maligna (LEEMANS, BRAAKHUIS, BRANKENHOFF, 2011).

A oncoproteína viral E6 é capaz de interagir com a proteína p53 e encaminhá-la para degradação proteassomal. A ação sobre a p53 pode ocorrer a nível nuclear, quando a E6 se liga diretamente ao gene TP53 ou interagindo com histonas acetiltransferases próximas ao gene TP53 impedindo sua transcrição. A ausência de sinalização da p53 celular resulta em uma série de eventos como continuidade da fase G1 para S mesmo quando houver lesões no DNA, resistência à apoptose, dentre outros (HUIBREGTSE, SCHEFFNER,

HOWLEY, 1991; MOODY, LAIMINS, 2010; WITTEKINDT *et al*, 2018; HOPPE-SYLER *et al*, 2018).

De forma complementar, a proteína E7 atua se ligando a várias proteínas celulares, dentre elas podemos destacar membros da família de proteínas do retinoblastoma (pRb). As pRb controlam a transição da fase G1 para a fase S da interfase. Em condições normais a pRb se encontra ligada diretamente ao E2F e reprime a transcrição de genes responsáveis pela transição G1/S. Através da ação de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (ex.: CDK4, CDK6), que se tornam ativadas quando formam complexos com as ciclinas D e promovem a hiperfosforilação da pRB, induzindo a dissociação da mesma em relação ao E2F. Assim, o fator E2F consegue chegar ao núcleo e dar início a transcrição de genes que permitirão a entrada da célula na fase S (MOODY, LAIMINS, 2010; SERRA, CHETTY, 2018; WOODS *et al*, 2014). Em células infectadas pelos tipos de HPV de alto risco, a oncoproteína E7 se liga à pRB, a dissocia em relação ao E2F e encaminha pRb para degradação proteossomal dependente de ubiquitina. Desta forma o fator E2F fica livre para que ocorra uma entrada descontrolada na fase S e sinalizações dependentes do pRB livre são comprometidas (Fig.5) (WITTEKINDT *et al*, 2018).

Outra proteína responsável pela regulação do complexo pRb/E2F é a p16^{INK4}. O gene desta proteína está localizado em 9p21.3, recebe diversas denominações (ex. MTS, INK4a, p16INK4, CDKN2A) e é considerado um supressor tumoral. A ação natural da p16INK4 é se associar com complexos CDK/ciclina impedindo a fosforilação da pRb (LIGGETT, SIDRANSKY, 1998; STEPHEN *et al*, 2013; SERRA, CHETTY, 2018). Não se conhece o mecanismo exato pelo qual ocorre o aumento de p16INK4 em células infectadas por HPV. A teoria mais aceita é que a pRb quando livre promove um feedback negativo sobre a expressão de p16, e como a pRb está sendo destruída, este feedback negativo não ocorre mantendo a expressão de p16 (CUNNINGHAM *et al*, 2006). Desta forma é possível utilizar o acúmulo intracelular de p16^{INK4} como marcador de infecção por HPV, para tal são utilizadas técnicas de imuno-histoquímica (STEPHEN *et al*, 2013; HASHMI *et al*, 2020; PAVER *et al*, 2020). A marcação de p16 é considerada positiva quando o acúmulo é observado no núcleo ou núcleo+

citoplasma, e deve ser considerada negativa quando a marcação ocorre apenas no citoplasma (MAHAJAN, 2016).

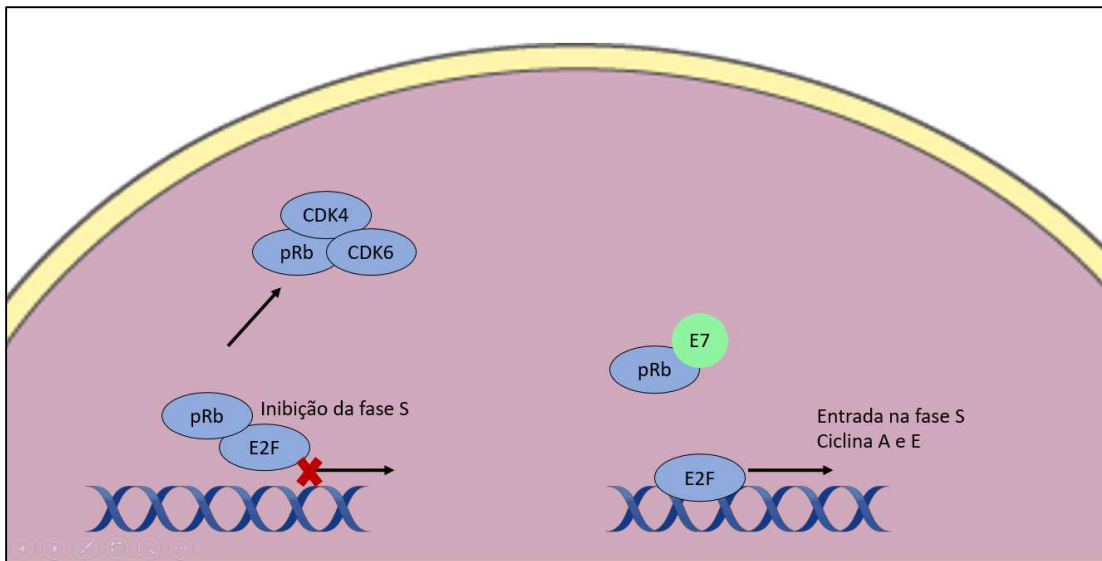


Figura 5- Efeito da proteína E7 sobre a proteína do retinoblastoma (pRb) e E2F. Autoria própria

É importante ressaltar que os tumores HPV(+) formam um grupo distinto dentro CCECP, uma vez que possuem um prognóstico melhor. Este prognóstico é decorrente da carência de mutações no gene TP53, permitindo a algumas proteínas p53 funcionais que escapem da ação de E6 sejam capazes de induzir a apoptose em procedimentos terapêuticos com a radioterapia. Já os casos negativos estão mais relacionados com o tabagismo e o etilismo, onde mutações em TP53 são frequentes (GILLISON *et al*, 2000; RAGIN, TAIOLI, 2007; WESTRA *et al*, 2008; LEEMANS, BRAAKHUIS, BRANKENHOFF, 2011).

1.3.2 – TABAGISMO E ETILISMO

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) classificou o tabagismo como agente carcinogênico do grupo 1 (IARC, 2019). O risco de desenvolvimento de CCECP em fumantes é 7 a 8 vezes maior do que em não fumantes, cigarros sem filtro conferem um risco de 8,7 vezes maior quando comparado a não fumantes (COHEN, FEDEWA, CHEN, 2018). O aumento deste risco é dose-dependente, e está relacionado com frequência, duração e intensidade do tabagismo. É importante salientar que não há nível seguro de consumo de cigarros (BERTHILLER, *et al.*, 2016).

Até o momento, mais de 70 carcinógenos foram descritos na fumaça do cigarro, dentre estes as principais substâncias são as nitrosaminas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que atuam sobre a dupla hélice de DNA promovendo rupturas. Estas lesões caso não possam ser reparadas, se fixam como mutações e estão envolvidas com o desenvolvimento de neoplasias caso ocorram em proto-oncogenes ou genes supressores tumorais (BOFFETTA, HECHT, GRAY, 2008; JETHWA, KHARIWALA, 2017; FROHWITTER *et al.*, 2020). O tabagismo também apresenta ação carcinogênica indireta através da geração de estresse oxidativo, relacionado também com a indução de danos no material genético celular (CALIRI, TOMASSI, BESARATINA, 2021).

O consumo de etanol tem sido considerado como agente carcinogênico desde 1988. O risco de desenvolvimento de CCECP em consumidores de bebidas alcoólicas é cerca de 5,13 vezes maior em comparação com indivíduos não etilistas (BAGNARDI, *et al.*, 2015). Evidências indicam que o álcool sozinho é responsável por 26,4% dos cânceres de lábio e cavidade oral, 21,6% de todos os cânceres de laringe e 30,5% de faringe (MARZILIANO, TECKIE, DIEFENBACH, 2020). Existem diversos mecanismos de carcinogênese propostos para o etilismo sendo os mais importante a geração da molécula reativa acetaldeído e a indução de hipometilação de proto-oncogenes (SEITZ, STICKEL, 2006; RETTIG, D'SOUZA, 2015). As consequências do consumo de etanol são potencializadas quando há interação com o tabagismo, aumentando em 35 vezes o risco de desenvolvimento de CCECP (KAWAKITA, MATSUO, 2017).

1.3 INFLAMAÇÃO E CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

A inflamação é uma resposta do organismo frente a uma lesão tecidual e tem por objetivo diluir toxinas, erradicar microrganismos ou isolar agentes mais resistentes, além de sinalizar o reparo tecidual. Os principais componentes que participam dessa resposta são as proteínas plasmáticas, os vasos sanguíneos e os leucócitos circulantes (MEDZHITOV, 2008).

A inflamação geralmente é classificada em aguda e crônica. A inflamação aguda tem início rápido, ocorre por um curto período e é caracterizada por sinais cardinais intensos (dor, rubor, calor, febre) com envolvimento de resposta

vascular e predomínio de atividade de neutrófilos (na maioria dos casos). Já na inflamação crônica, o processo tem um início mais lento e ocorre por um período mais prolongado, ainda podem existir os sinais cardinais, mas há um maior envolvimento de resposta de células do sistema imunológico e tecidual como macrófagos, linfócitos e fibroblastos (COUSSENS, WERB, 2002; KUMMAR, 2010).

A presença de células de defesa gerando espécies reativas e produzindo fatores de crescimento por um período prolongado relaciona o processo inflamatório crônico com o desenvolvimento de distúrbios de crescimento e diferenciação celular, como o câncer. A inflamação crônica causada pelo tabagismo, etilismo, exposição à radiação solar (lábios), dentre outros fatores, está relacionada com o surgimento do CCECP, favorecendo também a angiogênese e a evasão do sistema imune pelas células neoplásicas (NAIR, 2006; BARTSCH, BONOMI, 2014; O'GARRA et al., 2008; EYIGOR *et al.*, 2018; SUBBARAYAN *et al.*, 2019).

Citocinas são proteínas solúveis que desempenham diversos papéis no organismo, mediando o sistema imunológico e as respostas inflamatórias. Podem ser classificadas de acordo com sua ação na inflamação: em pró-inflamatórias (ex. IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ), produzidas predominantemente por macrófagos ativados e que favorecem o processo inflamatório; e anti-inflamatórias (ex. IL-4, IL-10 TGF- β e VEGF), que controlam a resposta das citocinas agindo em conjunto com inibidores específicos de citocinas e seus receptores (CONLON, MILJKOVIC, WALDMANN, 2019). Podem também ser classificadas baseando-se no fenótipo dos diferentes tipos funcionais de células T efectoras CD4⁺: T-helper 1 (Th1) (ex. IL-2, IFN- γ) que estimulam resposta celular imune, e T-helper 2 (Th2) (ex. IL-4, IL-6, IL-10) que predominantemente regula respostas humorais (YONEYAMA, KAWASAKI, MATSUSHIMA, 2000).

Pacientes com CCECP que apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias tem maior risco de apresentar um pior prognóstico (ALLEN *et al.*, 2007). E evidências associam o desenvolvimento do CCECP com diminuição de citocinas do perfil Th1 e aumento do perfil de resposta Th2 (RALLI *et al.*, 2020).

O envolvimento de citocinas na patogênese do CECCP vem sendo investigado na esperança para que possam ser utilizadas como marcadores de diagnóstico adicionais nos soros de pacientes. Isso poderia ser valioso na pesquisa atual sobre estratégias terapêuticas, uma vez que atualmente não existem marcadores confiáveis para prever o desenvolvimento tumoral ou recidivas em pacientes tratados com CCECP (RALLI *et al.*, 2020).

Entretanto, os dados sobre os níveis de citocinas no sangue de pacientes com CCECP é ainda variado entre autores e isso pode estar relacionado com a meia-vida das citocinas, metabolismo de cada paciente (PRIES, WOLLENBERG, 2006), técnica utilizada, diferentes estágios da doença e tamanhos amostrais (RALLI *et al.*, 2020), por esses motivos ainda precisa ser melhor elucidado.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo consiste em um desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, predominando as oxidantes (SIES, 1985). Dentre as moléculas oxidantes podemos destacar as espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio são moléculas formadas durante a redução parcial do oxigênio durante a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, mas também são produzidas no processo de fagocitose, e pela atividade de enzimas como a NADPH oxidase, xantina oxidase e as do citocromo P450 (MAGDER, 2006; QIANG, 2013; MOLONEY, COTTER, 2018). Exemplos de espécies de oxigênio: peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, oxigênio *singlet* e peroxinitrito (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

Em quantidades moderadas, as espécies reativas são importantes para o funcionamento normal do organismo (MAGDER, 2006; REUTER *et al.*, 2010; SOSA *et al.*, 2013). Porém, quando o equilíbrio redox é rompido, elas podem interagir com o ferro e gerar outras espécies mais reativas (FERREIRA, MATSUBARA, 1997), como o radical hidroxil (OH•), e também reagir com proteínas, lipídeos e DNA das células provocando modificações bioquímicas (Fig. 7) (REUTER *et al.*, 2010). No DNA (celular ou mitocondrial) podemos destacar a formação da 8-hidroxi,2-deoxiguanosina (8OHdG) (AITKEN *et al.*, 2014) relacionada com a ruptura da estrutura do DNA que podem resultar em mutações (SANTOS, 2008). Nas membranas celulares, as espécies reativas

podem desencadear a reação de peroxidação lipídica, que resulta na desestabilização estrutural e funcional destas membranas e na geração de moléculas como o malondialdeído (MDA) (SANTOS, 2008; REUTER *et al.*, 2010; MOLONEY, COTTER, 2018).

Uma das classes das espécies reativas são os radicais livres, moléculas que apresentam um elétron desemparelhado na sua camada de valência (FERREIRA, MATSUBARA, 1997), reagindo com biomoléculas para doar o elétron excedente (sofrendo redução) ou receber um elétron (sofrendo oxidação) (MCCORD, 2000). Dentre os radicais livres podemos citar os radicais: hidroxil (o mais reativo e com maior potencial danoso), peroxil, hidroperoxil, superóxido e alcóxil (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

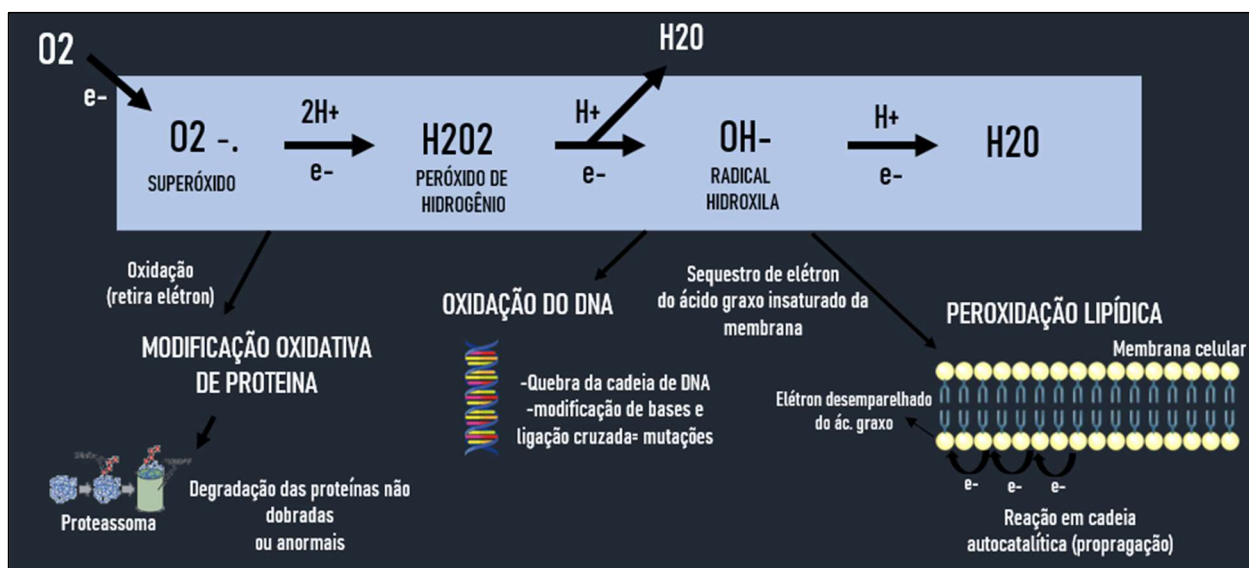


Figura 6- Danos celulares induzidos pelo estresse oxidativo. Autoria própria

As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não enzimáticas, que irão neutralizar as espécies reativas produzidas no organismo. Entre as defesas enzimáticas podemos citar a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx). Já a glutatona (GSH), carotenos, ácido ascórbico (vitamina C), vitamina D, vitamina E, dentre outros, pertencem a classe dos antioxidantes não enzimáticos (REUTER *et al.*, 2010; MOLONEY, COTTER, 2018; MISHRA *et al.*, 2018).

A SOD é uma metaloenzima localizada no citosol, na mitocôndria ou no meio extracelular (FUKAI, USHIO-KUKAI, 2011 *apud* MOLONEY, COTTER,

2018). Sua principal função é reagir com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) transformando-o em peróxido de hidrogênio H_2O_2 e oxigênio, sendo a primeira linha de defesa contra esse radical (Fig. 8).

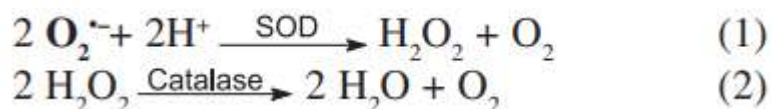


Figura 7- Reações realizadas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) (1) e catalase (2). Fonte: VASCONCELOS et al., 2007

A catalase é uma enzima presente no citosol e nos peroxissomos, e que utiliza a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) como substrato para a conversão principalmente de H_2O_2 em água e oxigênio (Fig. 8)

A glutatona peroxidase (GPx) é responsável por reduzir indiretamente o peróxido de hidrogênio durante o processo de oxidação da GSH (Fig. 9) (HUBER, ALMEIDA, 2008). A glutatona oxidase (GO) é uma enzima FAD dependente que converte GSH em glutatona oxidada (GSSG) (Fig. 9) (WU, BATIST, 2013; OESTREICHER, MORGAN, 2018). A glutatona redutase (GR) é uma flavoproteína que também utiliza o NADPH como substrato para converter GSSG a GSH (Fig. 9), proporcionando a manutenção das defesas antioxidantes, já que GSSG é resultado da exposição de GSH a um agente oxidante (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; BARREIROS, DAVID, 2006).

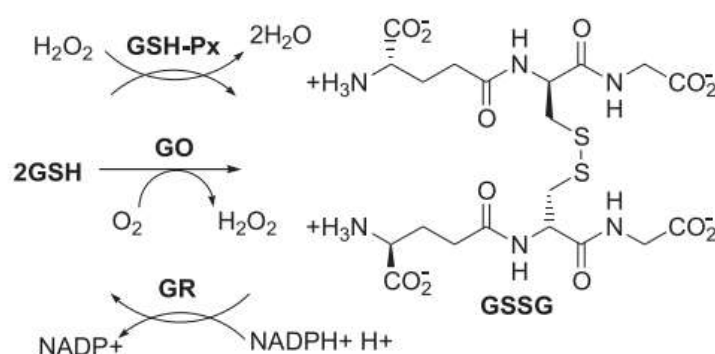


Figura 8- Ciclo catalítico da glutatona: conversão de GSH a GSSG pelas enzimas glutatona peroxidase (GSH-px) ou glutatona oxidase (GO) e redução de GSH a GSGG pela enzima glutatona redutase (GR). Fonte: HUBER, ALMEIDA, 2008.

Os níveis de GSH, SOD, catalase e GPx são regulados por vias de sinalização, entre elas, uma das mais importantes é a relacionada ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) (QIANG, 2013; MOLONEY, COTTER, 2018).

Outra via de sinalização envolvida na resposta ao estresse é a da p53 (MOLONEY, COTTER, 2018). Quando a célula apresenta níveis elevados de

espécies reativas, a p53 modifica a expressão de genes criando um estado pró-oxidativo para indução da morte celular (GAMBINO *et al.*, 2013).

Para muitos tipos de câncer o aumento da geração e manutenção de produção das espécies reativas favorece o processo de carcinogênese. As espécies reativas podem atuar nos estágios de: (i) Iniciação, ao causar lesões no material genético e eventuais mutações; (ii) Promoção, ao induzir mecanismos de sobrevivência e divisão celular; (iii) Progressão, ao ativar vias de sinalização envolvidas na angiogênese e na metástase do câncer (CHIKARA *et al.*, 2018).

Estresse oxidativo local e sistêmico é um fenômeno que tem um papel etiológico importante na patogênese e progressão de diversos tipos de câncer (ARMANI, CECCHINI, 2014; CHOE *et al.*, 2021). Está presente nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, com níveis elevados no sangue de MDA, um indicador de peroxidação lipídica e diminuição de enzimas antioxidantes nos estudos de Subapriya *et al* (2002) e Srivastava *et al* (2012). Porém, nenhum dos autores levou em consideração a presença do HPV.

Analisar o comportamento das enzimas antioxidantes bem como os marcadores de lipoperoxidação em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, tendo em vista a presença do HPV a qual ainda não é bem elucidada, é de grande importância.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de cabeça e pescoço vem aumentando em números e é previsto um aumento para aproximadamente 1 milhão de casos/ano para o ano de 2040. Este tipo de câncer pode estar relacionado com o vírus HPV, o que acarreta na formação de um grupo distinto dentro dos tumores da cabeça e pescoço, apresentando uma diferença molecular, etiológica, de estadiamento, no prognóstico e na abordagem terapêutica dos pacientes.

Até o momento os artigos que abordam o CCECP ainda não avaliaram os níveis de citocinas em concomitância aos marcadores de estresse oxidativo levando em consideração a presença do HPV e o grau de diferenciação celular. Por este motivo, o presente trabalho avaliou estes parâmetros para enriquecer o conhecimento sobre o CCECP.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o estresse oxidativo e perfil inflamatório sistêmico em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CECP), positivos e negativos para a presença do HPV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os níveis de estresse oxidativo e perfil inflamatório de pacientes com CCECP com um grupo controle.
- Investigar a presença do vírus HPV no microambiente tumoral através da marcação da proteína p16;
- Comparar o estresse oxidativo e o perfil inflamatório sistêmico de pacientes com CCECP infectados ou não com HPV;
- Comparar o estresse oxidativo e o perfil inflamatório sistêmico de pacientes com diferentes gradações do perfil histológico no CCECP.

RESULTADOS

Nosso grupo amostral foi composto por 43 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, dos quais observamos predomínio de pacientes caucasianos (33 [71.7%]) e do sexo masculino (36 [83.7%]). Dos pacientes com CCECP 19 (44%) ainda eram fumantes no período de coleta, dezesseis (37.2%) eram ex-fumante e oito (18.6%) nunca haviam feito uso do tabaco. O consumo de bebidas alcoólicas todos os dias foi relatado por 16 (37.2%) pacientes. Catorze (32.5%) pacientes relataram contato sexual com mais de 10 parceiros ao longo da vida.

A atividade das enzimas antioxidantes estava aumentada nos pacientes com CCECP. Tanto a atividade da enzima SOD quanto da Catalase estavam significativamente elevadas nos pacientes em comparação com o grupo controle ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$, respectivamente) (Fig. 1A, 1C). Para a defesa antioxidante não enzimática observamos uma redução significativa dos níveis de glutathione reduzida (GSH) comparado ao controle ($p = 0.0010$) (Fig. 1B). Em relação aos efeitos do estresse oxidativo observamos que pacientes com CCECP apresentam níveis menores de peroxidação lipídica iniciais e finais nos eritrócitos quando comparados com o controle ($p < 0.0001$; $p = 0.0414$, respectivamente) (Fig. 1D, 1E).

Para os níveis séricos das citocinas avaliadas observamos que os níveis de IFN- γ , TNF e IL-2 não foram detectáveis em nosso grupo de pacientes com CCECP (Fig. 2A, 2B, 2F). Estes pacientes apresentaram níveis reduzidos de IL-10 ($p < 0.0001$) e IL-4 ($p < 0.0001$) em comparação com o controle (Fig. 2C, 2E). Para os níveis de IL-6 não observamos diferença significativa em relação ao controle (Fig. 2D).

Após marcação de p16INK4a, os pacientes com CCECP foram divididos em dois grupos (Tabela 1) de acordo com a presença do HPV(+) (13 [30%]) ou ausência do HPV(-) (30 [70%]) no tecido tumoral (Fig. 3).

A presença de HPV foi observada somente nos pacientes do sexo masculino (13 [30%]) (Tabela 1). A média de idade dos pacientes HPV(+) foi significativamente menor (56.5 ± 9.5) em comparação com a idade média de pacientes HPV(-) (65.5 ± 11.1) ($p = 0.016$). Não observamos diferenças significativas na etnia ($p = 0.313$), tabagismo ($p = 0.566$), no uso de bebidas

alcólicas ($p=0.211$) e na exposição sexual ($p=0.094$) entre os grupos HPV(+) e HPV(-) (Tabela 1). Pacientes HPV(+) não apresentaram padrão histológico pouco diferenciado, porém, nenhuma significância foi observada ($p=0.100$) (Tabela 1).

Não observamos diferenças significativas de atividade da SOD, catalase, GSH e peroxidação lipídica entre os grupos HPV(+) e HPV(-) (Fig. 4), bem como para os níveis de IL-6, IL-10 e IL-4 (Fig. 5).

Ao estratificarmos os pacientes de acordo com a gradação histológica do tumor obtivemos três grupos distintos de padrão histológico: bem diferenciado (15 [35%]), moderadamente diferenciado (21 [49%]) e pouco diferenciado (7 [16%]) (Tabela 1). Não encontramos diferença significativa nas atividades das enzimas SOD e catalase (Fig. 6A, 6C). Apenas os níveis de GSH estavam aumentados significativamente em pacientes com tumores pouco diferenciados em comparação com o grupo bem diferenciado (Fig. 6B). Os níveis de peroxidação lipídica entre os grupos não apresentaram diferenças significativas (Fig. 6D, 6E), assim como os níveis de IL-6, IL-10 e IL-4 (Fig. 7).

ARTIGO

O presente trabalho foi realizado na Universidade Estadual de Londrina nos laboratórios de Patologia Molecular, e de Fisiopatologia e Radicais livres, sendo as amostras obtidas a partir do Ambulatório Hospital de clínicas-UEL, no Hospital Universitário da Região Norte do Paraná, Hospital Norte Paranaense de Arapongas e no Hospital do Coração de Londrina. Os dados obtidos permitiram a produção de um artigo científico que será submetido para publicação em revista internacional Head and Neck Cancer Journal (3.147), B1, Medicina II. (<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10970347/homepage/forauthors.html>).

TÍTULO: “BLOOD LEVELS OF OXIDATIVE STRESS MARKERS AND INFLAMMATORY MEDIATORS IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA: AN HPV INFECTION AND HISTOLOGICAL GRADATION APPROACH”.

Luca Kiichi Suzuki Trancolin¹; Isabela Chagas Silva¹; Liara Freitas Cavalcanti³; Lucas Rennan de Oliveira Andrade¹; Gabriela Fernandes da Costa¹; Maria Isabel Lovo-Martins²; Jose de Melo¹; William Capellari Fumegali¹; Thiago Henrique Daniel do Nascimento¹; Rubens Cecchini³; Alessandra Lourenço Cecchini¹; André Armani⁴; Rodrigo Cabral Luiz^{1*}.

¹Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.

²Laboratory of Experimental Immunopathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.

³Laboratory of Pathophysiology and Free radicals, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.

⁴State University of Londrina, Department of Clinical Surgery, UEL, Londrina, PR, Brazil.

Corresponding author: Rodrigo Cabral Luiz

Email: rc.luiz@uel.br

Fax: +55 (43) 3371-4267

Phone: +55 (43) 3371-4529.

Laboratório de Patologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, Km 380 Campus Universitário, Londrina, CEP 86051-990, Paraná, Brazil.

Abstract

Head and neck cancer is the sixth most common cancer worldwide. The large majority are squamous cell carcinomas (HNSCC). These tumors can develop from HPV infection. Thus, HNSCC can be separated into HPV(+) or HPV(-). This study compared the oxidative stress and systemic inflammatory profile in blood of 43 HNSCC patients with healthy individuals, addressing the virus infection and the different histological gradations. The enzymes SOD ($p < 0.0001$) and CAT ($p < 0.0001$) activity were elevated in HNSCC patients. IFN- γ , TNF- α and IL-2 levels were undetectable in HNSCC group. IL-10 ($p < 0.0001$) and IL-4 ($P < 0.0001$) levels were lower compared to control and for IL-6 we did not observe significant difference. HPV was present in 30% patients and no significant difference was found in the parameters evaluated between HPV(-) and HPV(+) patients. In the different histological grade groups, only an increase in GSH in the poorly differentiated group was observed. We demonstrated that HPV infection does not affect stress and inflammatory parameters, and that systemic adaptation against oxidative stress appears to occur in poorly differentiated tumor.

Introduction

Head and neck carcinoma corresponds to a group of malignant tumors located between the base of the skull and the collarbones, mainly in the aerodigestive tract (LAURA, CHOW, 2020), that means lips, oral cavity, nasopharynx, oropharynx, hypopharynx, larynx, sinuses, and salivary glands (ALFOUZAN, 2020). One of the subtypes is the head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), being the sixth most common cancer in the world with approximately 878 thousand cases in the year 2020 (COELHO, 2012; GLOBOCAN, 2021).

Regardless the histological type, some risk factors are known to be involved in the carcinogenesis of HNSCC, like smoking, alcoholism and human papillomavirus (HPV) infection (RETTIG, D'SOUZA, 2015). The relationship between HPV and HNSCC is due to the virus replication, process that requires E6 and E7 genes, that affects pRB and TP53 expression (WITTEKINDT *et al*, 2018; SERRA, CHETTY, 2018).

Inflammation is an organism's response to tissue injury with the aim of eradicating or isolating resistant agents and tissue repair. Its main components that participate in this response are plasma proteins, blood vessels and circulating leukocytes (MEDZHITOV, 2015). Local and systemic oxidative stress is a phenomenon that plays an important etiological role in the pathogenesis and progression of several types of cancer (ARMANI, CECCHINI, 2014; CHOE *et al.*, 2021). The chronic inflammation and oxidative stress are caused by reactive species produced by cells, smoking, alcoholism, and radiation exposure, creating a pro-tumor microenvironment in the tissue (SUBBARAYAN *et al.*, 2019).

The oxidative stress is present in patients with head and neck cancer, with high blood levels of lipid peroxidation and decreased antioxidant enzymes in the studies by Subapriya *et al* (2002) and Srivastava *et al* (2012).

Cytokines are soluble proteins that play several roles in the inflammatory process, they can be classified according to their action on inflammation: in pro-inflammatory (e.g. Interleukin-1 (IL), IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ) , or anti-inflammatory (e.g. IL-4, IL-10 TGF- β and VEGF) (CONLON, MILJKOVIC, WALDMANN, 2019), but also divided based on the phenotype of the different

functional types of effector T cells CD4+: T-helper 1 (Th1) (e.g. IL-2, IFN- γ) which stimulate cellular immune response, and T-helper 2 (Th2) (e.g. IL-4, IL-6, IL-10) which predominantly regulates humoral responses (YONEYAMA, KAWASAKI, MATSUSHIMA, 2000).

Patients with HNSCC who have high levels of pro-inflammatory cytokines are at greater risk of having a poor prognosis (ALLEN et al, 2007). And evidence associates the development of HNSCC with a decrease in Th1 cytokines and an increase in the Th2 response profile (RALLI et al., 2020).

However, data of cytokine levels in the blood of patients with HNSCC is still varied between authors and this may be related to the half-life of cytokines, metabolism of each patient (PRIES, WOLLENBERG, 2006), technique used, different stages of the disease and sample sizes (RALLI et al., 2020). In this way, the present manuscript reports new data about the systemic profile of oxidative stress and cytokines in patients with HNSCC.

Materials and Methods

Study population and design

The experimental group was composed by 43 patients with squamous cell carcinoma in the head and neck regions, these sampling population was chosen by convenience, recruited at the Outpatient Clinic at State University of Londrina, University Hospital of Londrina (HU-UEL), Heart Hospital of Londrina and Hospital of North Paraná- Arapongas during September 2019 to November 2021 (CAAE nº 20516119.4.0000.5231). Exclusion criteria were: less than 18 years of age and having any autoimmune condition. The samples were obtained right after the diagnosis, therefore, any patient had been submitted to any therapeutic intervention as radiotherapy, chemotherapy or immunotherapy. After explanation of the study and signature of the consent form, blood sample were collected. Tumor tissue samples were obtained during surgical removal or biopsy. The control group was composed of 43 individuals of both sexes, with an age like the patients' group and who had no history of cancer or any autoimmune condition. A questionnaire was applied to patients and control individuals to obtain information such as age, habits (smoking and alcohol intake), presence of chronic diseases and knowledge about HPV.

Blood Samples

Peripheral blood was obtained by venipuncture from all participants in a heparin tube for erythrocytes and a tube without additives for serum. All material was centrifuged at 1331 x G for 5 minutes at 4°C. Serum was stored at -20°C. The erythrocytes were washed three times with 1mL of 0.9% sodium chloride solution followed by centrifugation at 1331 x G for 5 minutes at 4°C and then stored in Alsever at 4°C for a maximum period of seven days.

Systemic oxidative stress parameters

The early lipid peroxidation was evaluated by tert-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence (GONZALEZ-FLECHA, LLESUY, BOVERIS, 1991). Erythrocytes were diluted (1:1200) in ice-cold 10mM monobasic phosphate buffer, pH 7.4 (Na 0.9%). The reaction was started with the addition of tert-butyl hydroperoxide and the curve was obtained in a GloMax luminometer after 60 minutes. After measurement, the results were plotted and peak were calculated.

The plasma MDA levels (final product of lipid peroxidation) were determined following the technique described by Victorino et al. (2013) in a high performance liquid chromatograph (HPLC- Shimadzu 20AT). The readings were taken at 535 nm, during an 11-minute run, with a flow rate of 0.8 mL / min at 35°C, and the results were expressed in nM of MDA.

The activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) was determined using the method developed by Marklund & Marklund (1974) in erythrocytes. The oxidation was measured in a spectrophotometer 420nm at 37°C. The results were expressed in U SOD/g protein, considering that one SOD unit is able to inhibit 50% of the auto-oxidation of pyrogallol.

Using the methodology developed by Tietze (1968), the levels of total glutathione (GT) were determined at 412 nm. The difference between total glutathione and oxidized glutathione concentrations were calculated and the results were expresses in $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein.

The activity of catalase was measured using erythrocytes at a dilution of 1:80 in deionized water according to Aebi, 1984. The enzymatic kinetics was monitored using a UV-1650 PC UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The results were expressed in velocity of absorbance decreased in 1 min per milligram of total protein (Vabs/min/mg protein).

Systemic inflammatory profile

Serum samples from patients and controls were used for the analysis of the inflammatory profile markers, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and IFN- γ by flow cytometry, using the BD™ Cytometric Bead Array assay (CBA) Human Th1 / Th2 II cytokine kit (Becton Dickinson, New Jersey, USA). The minimum detection limit of the cytokine kit was: IL-2 (2.6 pg/mL), IL-4 (2.6 pg/mL), IL-6 (3.0 pg/mL), IL-10

(2.8 pg/mL), TNF (2.8 pg/mL), IFN- γ (7.1 pg/mL). The cytometer used for the analyzes was the ACCURI C6 BD™.

Immunohistochemical

Fragments of tumor were fixed in 10% neutral buffered-formalin, stored in 70% ethanol, and embedded in paraffin before sectioning. Then, 5 μ m serial sections were placed on silanized slides, deparaffinized, rehydrated, immersed in 15 mmol/L citrate buffer (pH 6.0), and submitted to heat-induced epitope retrieval using a vapor lock for 20 min. The slides were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and immersed in 3% hydrogen peroxide for 30 min to block endogenous peroxidases. Non-specific protein binding was blocked with 3% BSA (bovine serum albumin) solution for 30 min. The sections were then incubated with primary polyclonal antibody against p16INK4a (1:200- Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) overnight at 2°C-8°C in a humid chamber. After incubation and washing, peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit IgG (1:100- Sigma-Aldrich, Missouri, USA) was added for 1 h at 37°C, followed by their chromogenic detection, using 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich, Missouri, USA). The slides were counterstained with Harri's hematoxylin, dehydrated, and were finished with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Negative controls were made omitting the primary antibody. The intensities of immunoreactivities against the primary antibody were examined using a photomicroscope (Olympus BX41, Olympus Optical, Hamburg, Germany). The tissue samples were considered positive to HPV if there were a homogeneous light brown staining in the nucleus or in the nucleus and cytoplasm. The staining only in the cytoplasm was considered negative (MAHAJAN, 2016).

Statistical analysis

Continuous variables were described with mean and their respective standard deviation (SD). Categorical variables were presented in absolute numbers and percentages and compared using chi-square of Pearson test and Fisher's exact test performed in SPSS version 24.0 (SPSS; Chicago, IL, USA).

For the analysis of cytokines and stress parameters the data were analyzed using GraphPad Prism (version 6; San Diego, CA, USA). To verify the normality of the data the Kolmogorov-Smirnov test was applied. For the comparison between two groups the student t-test was used for parametric data and for non-parametric data the Mann-Whitney test. To compare three or more variables, parametric data were submitted to the one-way ANOVA test and non-parametric data to the Kruskal-Wallis test. The parametric data were expressed as mean \pm standart deviation and the non-parametric data were expressed as median with the interquartile interval. Values ≤ 0.05 were considered statistically relevant.

Results

Our sample group consisted of 43 patients with Head and neck squamous cell carcinoma, which we observed a predominance of Caucasian (33 [71.7%]) and male (36 [83.7%]) patients. Of the patients with HNSCC, 19 (44%) were still smokers at the time of collection, sixteen (37.2%) were former smokers and eight (18.6%) had never used tobacco. Alcohol consumption every day was reported by 16 (37.2%) patients. Fourteen (32.5%) patients reported sexual contact with more than 10 partners in their lifetime.

The activity of antioxidant enzymes was increased in patients with HNSCC. Both SOD and Catalase enzyme activity were significantly elevated in the patients compared to the control group ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$, respectively) (Fig. 1A, 1C). For non-enzymatic antioxidant defense, we observed a significant reduction in reduced glutathione (GSH) levels compared to control ($p = 0.0010$) (Fig. 1B). Regarding the effects of oxidative stress, we observed that patients with HNSCC present lower levels of early and late lipid peroxidation in erythrocytes when compared to controls ($p < 0.0001$; $p = 0.0414$, respectively) (Fig. 1D, 1E).

For the serum levels of the evaluated cytokines, we observed that the levels of IFN- γ , TNF and IL-2 were not detectable in our group of patients with HNSCC (Fig. 2A, 2B, 2F). These patients had reduced levels of IL-10 ($p < 0.0001$) and IL-4 ($p < 0.0001$) compared to the control (Fig. 2C, 2E). For IL-6 levels, we did not observe a significant difference in relation to the control (Fig. 2D).

After p16INK4a labeling, patients with HNSCC were divided into two groups (Table 1) according to the presence of HPV(+) (13 [30%]) or absence of HPV(-) (30 [70%]) in the tumor tissue (Fig. 3).

The presence of HPV was observed only in male patients (13 [30%]) (Table 1). The mean age of HPV(+) patients was significantly lower (56.5 ± 9.5) compared to the mean age of HPV(-) patients (65.5 ± 11.1) ($p = 0.016$). We did not observe significant differences in ethnicity ($p = 0.313$), smoking ($p = 0.566$), alcohol intake ($p = 0.211$) and sexual exposure ($p = 0.094$) between the HPV(+) and HPV(-)

) groups. (Table 1). HPV(+) patients did not present a poorly differentiated histological pattern, however, no significance was observed ($p=0.100$) (Table 1).

We did not observe significant differences in SOD, catalase, GSH and lipid peroxidation activity between the HPV(+) and HPV(-) groups (Fig. 4), as well as for the levels of IL-6, IL-10 and IL-4. (Fig. 5).

By stratifying the patients according to the tumor histological grade, we obtained three distinct groups of histological patterns: well differentiated (15 [35%]), moderately differentiated (21 [49%]) and poorly differentiated (7 [16%]) (Table 1). We found no significant difference in the activities of SOD and catalase enzymes (Fig. 6A, 6C). Only GSH levels were significantly increased in patients with poorly differentiated tumors compared to the well-differentiated group (Fig. 6B). Lipid peroxidation levels between the groups did not show significant differences (Fig. 6D, 6E), as did the levels of IL-6, IL-10 and IL-4 (Fig. 7).

Discussion

Unfortunately, the incidence of HNSCC has increased over the years. It is well known that HNSCC is a type of cancer that greatly reduces the patient's quality of life, as it can affect the ability to breathe, speak, and eat (NAYAK, PAI, GEORGE, 2018). In addition, HNSCC is also responsible for approximately 5% of cancer deaths (AUPÉRIN, 2020).

Among the risk factors for HNSCC, HPV infection has received considerable attention (SCOTT-WITTENBORN, FAKHRY, 2021), and the identification of the virus in the tumor tissue has been recognized as one of the factors that increased the survival expectancy of patients (RETTIG, 2015). The influence of HPV on tumor tissue is well known (DUCATMAN, 2018; PAVER *et al.*, 2019), however little is known about the influence of HPV on HNSCC at the systemic level in the peripheral blood of patients.

In our study, we observed a predominance of HNSCC in males, in agreement with previous data reported by other research groups such as Boscolo-Rizzo *et al.*, (2018), Liao *et al.*, (2019) and Vito *et al.*, (2020).

Statistical data on HPV infection in HNSCC cases vary greatly according to the geographic location and sexual behavior of the sample group studied (TUMBAN *et al.*, 2019). In our sample group we observed 30% of HPV positivity among the patients, which has been reported in the scientific literature (DE MARTEL, *et al.*, 2017). We also observed that HPV positivity was predominant in male patients, this result differs from data of Boscolo-Rizzo *et al.*, (2018) which reported predominance of HPV(+) cases among female patients. Sexual behavior characterized by multiple partners was associated to HPV positivity in patients with HNSCC (Osazuwa-Peters *et al.*, 2015), but this association was not observed in our study.

According to Spence *et al.*, (2016) HPV(+) tumors represents a distinct HNSCC group, once HPV(+) patients are generally younger, and have a better prognosis (O'SULLIVAN *et al.*, 2013). HPV(+) patients have a higher survival rate, and also presents a better response to chemoradiotherapy due to the absence of TP53 mutations (FARAH, 2021; QIN *et al.*, 2021). Fakhry *et al.*, (2008) and Syrjanen (2021) associated HPV infection with poorly differentiated

tumor tissues, but in our sample group HPV(+) patients presented well-differentiated or moderately differentiated tumor tissues. We did not find subsidies in the scientific literature that allow us to discuss this observed difference, but apparently the characteristics of the tumor tissue in HPV(+) patients are more variable.

In our study the majority of the patients presented HPV(-) tumor tissues, this information corroborates the observed predominance of patients with a history of smoking and alcohol intake. Both risk factors are well established in HNSCC carcinogenesis (ARGIRIS *et al.*, 2008), specially for HPV (-) patients (O'SULLIVAN *et al.*, 2013). The risk of HNSCC development in smokers is 7 to 8 times higher than in no smokers (COHEN, FEDEWA, CHEN, 2018). The increase of this risk is dose-dependent and is related with the frequency, duration, and intensity of the smoking (BERTHILLER, *et al.*, 2016). Hashibe *et al.*, (2007) also demonstrated this increase in the number of HNSCC cases in smokers and alcoholics

Local oxidative stress has been associated in the pathogenesis of many types of cancer, and systemic oxidative stress status has been investigated in disease evolution (ARMANI, CECCHINI, 2014; CHOE *et al.*, 2021). The oxidative stress and HPV infection are two powerful cancer initiators and promoters that can act synergistically. For example, HPV infected adapts to oxidative stress by increasing the intracellular antioxidant defenses (DE MARCO, 2013).

GSH is the most important non enzymatic antioxidant, acting as a reactive oxygen species scavenger (BAKADIA *et al.*, 2021). Our HNSCC patients presented lower levels of GSH compared to healthy volunteers. Srivastava *et al.*, (2012) and Shivashankara *et al.*, (2021) previously reported decreased GSH levels in HNSCC patients, possibly due to the use of GSH in the neutralization of reactive species produced in cancer. Stratifying our patients according to the histological pattern, we observed that patients with poorly differentiated tumors had higher GSH levels compared to patients with well and moderately differentiated tumors. Our results demonstrate that poorly differentiated tumor tissues produce greater amounts of oxidative species, requiring a greater systemic antioxidant response (ARGIRIS, 2008; LEEMANS, BRAAKHUIS, BRANKENHOFF, 2011; JOHNSON, 2020).

Catalase and Superoxide dismutase are very important antioxidant defenses that participate in the detoxification of reactive oxygen species (MOLONEY & COTTER, 2018). Catalase is responsible to convert H_2O_2 into H_2O and O_2 (KIRKMAN, GAETANI, 2007), while SOD is responsible to convert superoxide anion into hydrogen peroxide. Here, we observed increased SOD and catalase activities in HNSCC patients compared to the control group.

The increase in the activity of these enzymes highlight the presence of systemic oxidative stress in HNSCC patients, which promotes increased expression of antioxidant defenses (PISOSCHI, POP, 2015). In our work, the systemic oxidative stress is also revealed by increased levels of early and late lipid peroxidation (CL and MDA results, respectively) in HNSCC patients. Together, these results demonstrate that even to compensate the production of reactive species in tumor tissue, these molecules are still capable of promoting systemic oxidative damage. Other authors had reported reduced SOD and catalase activities in patients with HNSCC (GUPTA, BHATT, MISRA, 2009; MILONSKI *et al.*, 2015), laryngeal (BOZAN *et al.*, 2018), and oral cancer (SRIVASTAVA *et al.*, 2012). These variations may be related to several factors such as patient age, timing of blood sample collection (early or late stages) (YANG, *et al.*, 2002, CECERKA-HERYĆ, *et al.*, 2021), treatment status (RHOMDHONI, KURKIAWAN, HIDAYATI, 2019; TUNCER *et al.*, 2022).

For the first time our work evaluated the systemic oxidative levels in HNSCC patients taking account the HPV infection and tumor histological pattern. For the oxidative stress biomarkers used we did not observe significant differences between HPV(+) and HPV(-) patients, that is, the systemic level of oxidative stress is similarly in both cases. For histological pattern, only GSH levels demonstrated that patients with low grade tumors present higher oxidative stress status

Interleukins are immune response mediators produced by numerous cells and are extremely important in innate and adaptive immune responses. Among the interleukin-producing cells we can highlight $CD4^+$ lymphocytes that can differentiate into many types, such as Th1, Th2, Th17, Treg, among other. These helper lymphocytes, in turn, secrete specific mediators that determine numerous

distinct functions. In our work, we evaluated the profile of Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF- α) and Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) response mediators (SELIGER, RUIZ-CABELLO, GARRIDO, 2008).

Interferon-gamma (IFN- γ) is an important mediator involved in tumor surveillance (KAPLAN *et al.*, 1998) mostly through major histocompatibility complex (MHC) class I genes upregulation and promotes the differentiation of CD4+ T cells to the Th1 profile. (WEBER, ROSENBERG, 1988; YONEYAMA, KAWASAKI, MATSUSHIMA, 2000). In our studies, IFN- γ levels in HNSCC patients, regardless of HPV infection or histological pattern, were so low that they were not detected. Low levels of IFN- γ had already been described by Kaskas *et al* (2014) and Lathers and Young (2004) in HNSCC. The IFN- γ downregulation in this disease may be linked to the increased expression of PD-L1 and PD-1. The interaction of these two proteins leads to inactivation of T cells, an important immune scape mechanism from the tumor (ZAID, 2019). Malaspina *et al* (2011) had already remonstrated a significant increase in PD-1 in patients with oral squamous cell carcinoma.

TNF- α is involved in several signaling, especially pro-inflammatory events and induction of apoptosis in tumor cells (SETHI, SUNG, AGGARWAL, 2008). IL-2 plays dual role in immune system, on the one hand, participates on growth as well in differentiation of T and B cells, on the other hand inducing Tregs cells activation (CHOUDHRY *et al.*, 2018). Previously, Andersson *et al.*, (2014) observed significantly elevated systemic levels of TNF- α in patients with HNSCC and IL-2 levels were lower than controls, in contrast, the patients evaluated in our research had such low levels of TNF- α and IL-2 that they could not be detected.

Cytokines produced by Th2 lymphocytes have an important role on cancer development and its complications by increasing cell survival and proliferation, as well as a metastatic phenotype, facilitating migration and invasion (LI *et al.*, 2008; DENARDO *et al.*, 2009; HALLETT *et al.*, 2012; VENMAR *et al.*, 2015). Lathers *et al.* (2003); Lathers and Young (2004), pointed out that patients with HNSCC present a response polarization to Th2 profile.

The cytokines IL-4 and IL-10 modulate negatively the production of profile Th1 cytokines and positively antibodies production by B cells. IL-4 particularly

induces the differentiation of T naïve cells into Th2, whereas IL-10 inhibit the synthesis of other cytokines (e.g., IFN- γ , IL-2). (SARAIVA, O'GARRA, 2010; SILVA-FILHO, CARUSO-NEVES, PINHEIROS, 2014). Studies that investigated the cytokines serum levels of HNSCC patients showed controverse results. Sotirovic *et al* (2017) observed that HNSCC have IL-4 levels similar to the control group, while Lathers *et al* (2004) showed significant increase regarding the control. Zhao *et al* (2015) observed increased levels of IL-10 in the HNSCC and Hoffman *et al* (2007) did not found significative difference. In our work, we observed a decrease in IL-4 and IL-10 levels in patients with HNSCC, corroborating with the idea that IL-4 and IL-10 cytokine levels do not represent a specific marker of the disease (MOJTAHEDI *et al.*, 2012).

Interleukin- 6 plays a important role in many biological process like immune modulation, hematopoiesis, inflammation and oncogenesis. It is a powerful inducer of epithelial to mesenchymal transition, besides of promote malignant growth of squamous cell in HNSCC (CHOUDHARYMOAZ *et al.*, 2016). The IL-6 increased levels compared with healthy individuals are associated with a poor oncological outcome in HNSCC, metastasis (SPARANO *et al.*, 2004, RIEDEL, *et al.*, 2005, SCHIEGNITZ, 2018) recurrence and poor survival (SKRINJAR, 2014). The association with clinical parameters has been studied by many authors which showed an increase in these cytokines serum levels in HNSCC patients (UZ, ESKIIZMIR, 2021). John *et al* (2004) and Cottin (2018) reported increased levels of IL-6 in HNSCC patients compared with healthy individuals. Riedel *et al* (2005) showed a significant relation between increased serum IL-6 concentrations and with higher tumor stage. Shinagawa *et al.*, 2017 suggested that increased IL-6 is associated with vascular invasion in these patients. On the other hand, we did not observe significantly different serum levels of IL-6 in our patients when compared with the healthy individuals, showing that IL-6 level in HNSCC are also controverse.

Although our results regarding serum cytokine levels in HNSCC patients differ from other authors, it has already been reported in the lecture that in this disease there is immune suppression exemplified by the number of T cells and decreased T cell function (HOFFMANN, BIER, WHITESIDE, 2004; BOSE *et al.*, 2008), what could explain the cytokine low levels in our patients.

This study has limitations and strengths. Study limitations include a small sample group and the main reason for this was the difficulty in obtaining patients during the Covid-19 pandemic. Due to the size of the tumor fragment that was obtained, it was not possible to evaluate the oxidative stress and inflammatory profile in the tumor environment. Also, the clinical staging of HNSCC patients was not available for us to include them as variables. The strengths include the stratifications of the disease according to the positivity to HPV. Besides, for the first time it was evaluated the presence of oxidative stress in HPV(+) and HPV(-) patients in the HNSCC, furthermore, until now, the blood levels of superoxide dismutase and catalase in HNSCC HPV patients were not described in the literature. Moreover, our patients were not submitted to chemotherapy, radiotherapy and/or immunotherapy until the moment of the sample collection.

Conclusion

In conclusion, our study contributes to a better understanding that HNSCC is a heterogeneous disease. Our results demonstrate that HPV infection does not affect the stress and inflammatory parameters, and that apparently occurs a systemic adaptation against oxidative stress in poorly differentiated tumors. Further studies with other biological markers and increased sample size will be needed to better understand the behavior of oxidative stress and interleukin levels in HNSCC.

References

- AEBI H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 1984;105:121-6.
- ALFOUZAN, A. F. Head and neck cancer pathology: Old world versus new world disease. **Nigerian journal of clinical practice**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2019.
- ALLEN, C. T., RICKER, J. L., CHEN, Z., et al. Role of activated nuclear factor- κ B in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v. 29, n. 10, p. 959-971, 2007.
- ARMANI, A.; CECCHINI, A.; BERNARDES, S. Oxidative Stress in Head and Neck Cancer. **Role of Oxidative Stress in Chronic Diseases**, p. 657–667, 2014.
- ARGIRIS, A. et al. Head and neck cancer Athanassios. **Lancet**, v. 371, n. 9625, p. 1695–1709, 2008.
- ANDERSSON, B. et al. Plasma tumor necrosis factor- α and C-reactive protein as biomarker for survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 140, n. 3, p. 515-519, 2014.
- AUPÉRIN, A. Epidemiology of head and neck cancers: An update. **Current Opinion in Oncology**, v. 32, n. 3, p. 178–186, 2020.
- BAKADIA, B. M. et al. The impact of oxidative stress damage induced by the environmental stressors on COVID-19, *Life Sci.* 264 (2021) 118653.
- BERTHILLER, J. et al. Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 45, n. 3, p. 835–845, 2016.
- BOSCOLO-RIZZO, P. et al. The evolution of the epidemiological landscape of head and neck cancer in Italy: Is there evidence for an increase in the incidence of potentially HPV-related carcinomas? **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–13, 2018.
- BOSE, A. et al. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. **Cancer Immunity Archive**, v. 8, n. 1, 2008.
- BOZAN, N. et al. Alterations in oxidative stress markers in laryngeal carcinoma

patients. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 9, p. 811–815, 2018.

CECERSKA-HERYĆ, E. et al. Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients – A review. **Clinical Biochemistry**, v. 93, n. November 2020, p. 1–8, 2021.

CHOE, J. H. et al. Oxidative stress and the intersection of oncogenic signaling and metabolism in squamous cell carcinomas. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 1–25, 2021.

COELHO, K. R. Challenges of the oral cancer burden in India. **Journal of Cancer Epidemiology**, v. 2012, 2012.

COHEN, N.; FEDEWA, S; CHEN, A. Y. Epidemiology and demographics of the head and neck cancer population. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics**, v. 30, n. 4, p. 381-395, 2018.

CHOUDHRY, H. et al. Prospects of IL-2 in cancer immunotherapy. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

CHOUDHARYMOAZ, M. et al. Interleukin-6 role in head and neck squamous cell carcinoma progression. **World journal of otorhinolaryngology-head and neck surgery**, 2016. CONLON, K. C.; MILJKOVIC, M. D.; WALDMANN, T. A. Cytokines in the treatment of cancer. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 39, n. 1, p. 6-21, 2019.

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

DE MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 664–670, 2017.

DENARDO DG, BARRETO JB, ANDREU P, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer Cell**. 2009; 16:91–102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.018.

DE MARCO, F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. **Viruses**, v. 5, n. 2, p.

708-731, 2013.

DUCATMAN, Barbara S. The role of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 142, n. 6, p. 715-718, 2018.

FAKHRY, C. et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 4, p. 261–269, 2008.

FARAH, C. S. Molecular landscape of head and neck cancer and implications for therapy. **Annals of Translational Medicine**, v. 9, n. 10, 2021.

Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). Cancer tomorrow. Disponivel : <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?types=0_1&sexes=1_2&mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=3_1_2_5_4_14&populations=900&apc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5&group_cancers=1> Acess: december 2021.

GONZALEZ FLECHA B, LLESUY S, BOVERIS A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med*. 1991;10(2):93-100

GUPTA, A.; BHATT, M. L. B.; MISRA, M. K. Lipid peroxidation and antioxidant status in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 2, p. 68–72, 2009.

HALLET MA, VENMAR KT, FINGLETON B. Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13. **Cancer Res**. 2012; 72:6338–6343. doi: 10.1158/0008-5472.

HASHIBE, M. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 10, p. 777–789, 2007.

HOFFMANN, K. et al. Aberrant cytokine expression in serum of patients with adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head & Neck:**

Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck, v. 29, n. 5, p. 472-478, 2007.

HOFFMANN, T K.; BIER, H; WHITESIDE, T. L. Targeting the immune system: novel therapeutic approaches in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 12, p. 1055-1067, 2004.

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

JOHNSON, D. E. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, 2020.

KAPLAN, D. H. et al. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 13, p. 7556–7561, 1998.

KASKAS, N. M. et al. Serum biomarkers in head and neck squamous cell cancer. **JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 140, n. 1, p. 5–11, 2014.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, v.32, n.1, p.44–50, 2007.

LATHERS, D. M. R; ACHILLE, N. J.; YOUNG, M. R. Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Human immunology**, v. 64, n. 12, p. 1160-1166, 2003.

LATHERS, D. M. R.; YOUNG, M. R. I. Increased aberrance of cytokine expression in plasma of patients with more advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cytokine**, v. 25, n. 5, p. 220–228, 2004.

LAURA, Q. M., CHOW, M. D. Head and neck cancer. **The new english journal of medicine**, v.382, n. 1, p. 60–72, 2020

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9–22, 2011.

LI BH, et al. IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2008; 369:554–560. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.052.

LIAO, L. J. et al. Health-related quality of life and utility in head and neck cancer survivors. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019.

MAHAJAN, A. Practical issues in the application of p16 immunohistochemistry in diagnostic pathology. **Human Pathology**, v. 51, p. 64–74, 2016.

MALASPINA TS, et al. Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(7):965-974.

MARKLUND, S., & MARKLUND, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469–474.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MILONSKI, J. et al. DNA damage and oxidant-antioxidant status in blood of patients with head and neck cancer. **DNA and Cell Biology**, v. 34, n. 3, p. 213–219, 2015.

MOJTAHEDI, Z. et al. Serum levels of interleukins 4 and 10 in head and neck squamous cell carcinoma. **The Journal of Laryngology & Otology**, v. 126, n. 2, p. 175-179, 2012.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 2018.

NAYAK, S. G. et al. Quality of life of patients with head and neck cancer: A mixed method study. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 15, n. 3, p. 638, 2019.

O’SULLIVAN, B. et al. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 5, p. 543–550, 2013.

OSAZUWA-PETERS, N. et al. Sexual behavior, HPV knowledge, and association with head and neck cancer among a high-risk group. **Oral Oncology**, v. 51, n. 5, p. 452–456, 2015.

PAVER, E. C. et al. Human papilloma virus related squamous cell carcinomas of the head and neck: diagnosis, clinical implications and detection of HPV. **Pathology**, v. 52, n. 2, p. 179-191, 2020.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PRIES, R.; WOLLENBERG, B. Cytokines in head and neck cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 17, n. 3, p. 141–146, 2006.

QIN, T. et al. Molecular tumor subtypes of hpv-positive head and neck cancers: Biological characteristics and implications for clinical outcomes. **Cancers**, v. 13, n. 11, p. 1–21, 2021.

RALLI, M. GRASSO, M., GILARDI, A., et al. The role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma: a review. **Clin. Ter**, v. 171, p. e268-e274, 2020.

RETTIG, E. M.; D'SOUZA, G. Epidemiology of Head and Neck Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 379–396, 2015.

RHOMDHONI, A.; KURNIAWAN, P.; HIDAYATI, T. Correlation Between Superoxide Dismutase Serum Level Alteration with Neck Metastatic Tumor Post Cisplatin–Paclitaxel Chemotherapy Response in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. **Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery**, v. 71, n. 1, p. 643-646, 2019.

RIEDEL, F., ZAISS, I., HERZOG, D., et al. Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. **Anticancer research**, v. 25, n. 4, p. 2761-2765, 2005.

SARAIVA, M; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature reviews immunology**, v. 10, n. 3, p. 170-181, 2010.

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

SCOTT-WITTENBORN, N.; FAKHRY, C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 31, n. 4, p. 286–296, 2021.

SELIGER, B.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. Chapter 7 IFN Inducibility of Major Histocompatibility Antigens in Tumors. **Advances in Cancer Research**, v. 101, n. January, p. 249–276, 2008.

SERRA, S.; CHETTY, R. J Clin Pathol. 2018 Oct;71(10):853-858. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205216. Epub 2018 Aug 3. p. 1–6, 2018.

SETHI, G., SUNG, B., AGGARWAL, B. B. et al. TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Front biosci**, v. 13, n. 2, p. 5094-107, 2008.

SHINAGAWA, K. et al. Clinical Roles of Interleukin-6 and STAT3 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Pathology and Oncology Research**, v. 23, n. 2, p. 425–431, 2017.

SHIVASHANKARA, A. R. et al. Salivary enzymes and oxidant-antioxidant parameters as biomarkers of head and neck cancer: Correlation between blood and saliva. **Hamdan Medical Journal**, v. 14, n. 3, p. 124, 2021.

SKRINJAR, I., et al. Evaluation of pretreatment serum interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha as a potential biomarker for recurrence in patients with oral squamous cell carcinoma. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 20, n. 4, p. e402, 2015.

SILVA-FILHO, J. L.; CARUSO-NEVES, C.; PINHEIRO, A. A. S. IL-4: an important cytokine in determining the fate of T cells. **Biophysical reviews**, v. 6, n. 1, p. 111-118, 2014.

SOTIROVIĆ, J. et al. Serum cytokine profile of laryngeal squamous cell carcinoma patients. **Journal of Laryngology and Otology**, v. 131, n. 5, p. 455–461, 2017.

SPARANO, A. et al. Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their

association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaryngology—Head and Neck Surgery**, v. 131, n. 5, p. 573-576, 2004.

SPENCE, T. et al. HPV associated head and neck cancer. **Cancers**, v. 8, n. 8, p. 1–12, 2016.

SRIVASTAVA, K. C. et al. A Case control study to evaluate oxidative stress in plasma samples of oral malignancy. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 3, n. 3, p. 271–276, 2012.

SUBAPRIYA, R. et al. Oxidant-antioxidant status in patients with oral squamous cell carcinomas at different intraoral sites. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 489–493, 2002.

SUBBARAYAN, R. S. et al. The role of the innate and adaptive immune response in HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Laryngoscope Investigative Otolaryngology**, v. 4, n. 5, p. 508–512, 2019.

SYRJÄNEN, S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. **Annals of Oncology**, v. 21, n. SUPPL. 7, p. 243–245, 2010.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**. v. 27, p. 502-522, 1969.

TUMBAN, E. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. **Viruses**, v. 11, n. 10, 2019.

TUNCER, G. S. et al. Effect of radiotherapy on erythrocyte catalase, and carbonic anhydrase activities, serum levels of some trace elements and heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd, Mn, Fe, Mg and Co) in cancer patients. **International Journal of Radiation Research**, v. 20, n. 1, p. 97-102, 2022.

UZ, U; ESKIIZMIR, G. Association Between Interleukin-6 and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 14, n. 1, p. 50, 2021.

VENMAR KT, CARTER KJ, HWANG DG, et al. IL-4 receptor ILR4 α regulates

metastatic colonization by mammary tumors through multiple signaling pathways. **Cancer Res.** 2014 doi: 10.1158/0008-5472.

VICTORINO, V.J. et al. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. **Age**, v. 35, n.4, p.1411-1421, 2013.

VITO, R. DE et al. HHS Public Access. v. 30, n. 1, p. 93–102, 2020.

WEBER, J. S.; ROSENBERG, S. A. Modulation of murine tumor major histocompatibility antigens by cytokines in vivo and in vitro. **Cancer Res**, v. 48, n. 20, p. 5818-5824, 15 1988.

WITTEKINDT, C. et al. HPV - A different view on Head and Neck Cancer. **Laryngo-Rhino-Otologie**, v. 97, n. S 01, p. S48–S113, 2018.

YANG, J. et al. Antioxidant enzyme levels in oral squamous cell carcinoma and normal human oral epithelium. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 71–77, 2002.

YONEYAMA, H.; KAWASAKI, S.; MATSUSHIMA, K. Regulation of Th1 and Th2 immune responses by chemokines. **Springer seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2000. p. 329-344.

ZAIDI, M. Raza. The interferon-gamma paradox in cancer. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 39, n. 1, p. 30-38, 2019.

ZHAO, S. et al. Serum IL-10 predicts worse outcome in cancer patients: A meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2015.

CONCLUSÃO

Nosso trabalho contribui com a compreensão de que o CCECP é uma doença heterogênea. Nossos resultados demonstram que a infecção pelo HPV não afeta os parâmetros de estresse e inflamatórios, e que aparentemente ocorre uma adaptação sistêmica contra o estresse oxidativo em tumores pouco diferenciados. Mais estudos com outros marcadores biológicos e aumento do grupo amostral serão necessários para melhor compreender o comportamento do estresse oxidativo e dos níveis de interleucinas no CCECP.

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J. et al. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian journal of andrology**, v. 16, n. 1, p. 31, 2014.

ALFOUZAN, A. F. Head and neck cancer pathology: Old world versus new world disease. **Nigerian journal of clinical practice**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2019.

ALLEN, C. T., RICKER, J. L., CHEN, Z., et al. Role of activated nuclear factor- κ B in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v. 29, n. 10, p. 959-971, 2007.

ARALDI, R. P. et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. April, p. 1537–1556, 2018.

ARGIRIS, A. et al. Head and neck cancer Athanassios. **Lancet**, v. 371, n. 9625, p. 1695–1709, 2008.

ARMANI, A.; CECCHINI, A.; BERNARDES, S. Oxidative Stress in Head and Neck Cancer. **Role of Oxidative Stress in Chronic Diseases**, p. 657–667, 2014.

AUPÉRIN, A. Epidemiology of head and neck cancers: An update. **Current Opinion in Oncology**, v. 32, n. 3, p. 178–186, 2020.

BAGNARDI, V. et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: A comprehensive dose-response meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 3, p. 580–593, 2015.

BARTSCH, H., NAIR, J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 391, n. 5, p. 499-510, 2006.

BARREIROS, A. L., DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BATISTA, J. C. Clínica cirurgica- Cabeça e pescoço. SJT editora, São Paulo- SP. 2015.

BERTHILLER, J. et al. Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 45, n. 3, p. 835–845, 2016.

BOFFETTA, P., HECHT, S., GRAY, N., et al. Smokeless tobacco and cancer. **The lancet oncology**, v. 9, n. 7, p. 667-675, 2008.

BONOMI, M., PATSIAS, A., POSNER, M., et al. The role of inflammation in head and neck cancer. **Inflammation and cancer**, p. 107-127, 2014.

BZHALAVA, D.; EKLUND, C.; DILLNER, J. International standardization and classification of human papillomavirus types. **Virology**, v. 476, p. 341–344, 2015.

CALIRI, A. W.; TOMASSI, S.; BESARATINIA, A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. **Mutation research**, v.787, 2021.

CECERSKA-HERYĆ, E., SUROWSKA, O., HERYĆ, R., et al. Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients—a review. **Clinical Biochemistry**, v. 93, p. 1-8, 2021.

CHANG, M. H., JEANG, K. (Ed.). **Viruses and human cancer: From basic science to clinical prevention**. Springer Science & Business Media, 2013.

CHOE, J. H. et al. Oxidative stress and the intersection of oncogenic signaling and metabolism in squamous cell carcinomas. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 1–25, 2021.

CHIKARA, S. et al. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. **Cancer letters**, v. 413, p. 122-134, 2018

CHUN-HUI; Y. ZHAI, Q.; WANG, B. Y. Updates on immunohistochemical and molecular markers in selected head and neck diagnostic problems. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 9, p. 1214-1235, 2017.

COELHO, K. R. Challenges of the oral cancer burden in India. **Journal of Cancer Epidemiology**, v. 2012, 2012.

COHEN, N.; FEDEWA, S.; CHEN, A. Y. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 381–395, 2018.

COOPER, J. S. et al. Postoperative ccrt rtog 9501. **N Engl J Med**, v. 350, p. 1937–1981, 2004.

CONLON, K. C.; MILJKOVIC, M. D.; WALDMANN, T. A. Cytokines in the treatment of cancer. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 39, n. 1, p. 6-21, 2019.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

CUNNINGHAM, L. L. et al. Overexpression of p16INK4 is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 102, n. 1, p. 77–81, 2006.

DING, Y. et al. Papillary squamous cell carcinoma of the oral mucosa: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 12 cases and literature review. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 17, n. 1, p. 18–21, 2013.

DUPREZ, F., BERWOUTS, D., DE NEVE, W., et al. Distant metastases in head and neck cancer. **Head & neck**, v. 39, n. 9, p. 1733-1743, 2017.

ECHANIQUE, K. A. et al. Laryngeal Verrucous Carcinoma: A Systematic Review. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)**, v. 156, n. 1, p. 38–45, 2017.

EYIGOR, M. et al. Analysis of serum cytokine levels in larynx squamous cell carcinoma and dysplasia patients. **Iranian Journal of Immunology**, v. 11, n. 4, p. 259–268, 2014.

FARAJI, F. et al. Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 9–10, p. 464–475, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLETCHER, C. D. **Diagnostic histopathology of tumors: 2-volume set with CD-ROMs**. Elsevier Health Sciences, 2013.

FROHWITTER, G. et al. Oxidative and Nitrosative Stress in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cells Tissues Organs**, v. 209, n. 2–3, p. 120–127, 2020.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Redox signaling, vascular function and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

GAMBINO, V. et al. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. **Aging cell**, v. 12, n. 3, p. 435-445, 2013.

GILLISON, M. L. et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 9, p. 709–720, 2000.

Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). Cancer tomorrow. Disponível <
: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?types=0_1&sexes=1_2&mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=3_1_2_5_4_14&populations=900&apc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5&group_cancers=1> Acessado em 12 Dezembro de 2021.

HALLIWELL, B. JMC. **Free radicals in biology and medicine**, 1999.

HASHMI, A. A. et al. p16 Immunohistochemical Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Association With Prognostic Parameters. **Cureus**, v. 12, n. 6, 2020.

HICKS, M. D.; LIN, D.; BUCZEK, E. P. Revisiting a rare disease: Oral cavity basaloid squamous cell carcinoma at a high-volume tertiary center. **American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery**, v. 41, n. 6, p. 102645, 2020.

HOPPE-SEYLER, K. et al. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for

Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 158–168, 2018.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **EMBO Journal**, v. 10, n. 13, p. 4129–4135, 1991.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde (INCA). Estimativa 2020 – Incidência de cancer no Brasil. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> > Acessado em 01 de Dezembro de 2021.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–123. 2019. Acessado em <https://monographs.iarc.fr/agentsclassified-by-the-iarc/> 05 de Janeiro de 2022.

JETHWA, A. R.; KHARIWALA, S. S. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 3, p. 411-423, 2017.

JOHNSON, D. E. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, 2020.

JUMAILY, M. et al. Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Larynx: A National Cancer Database Analysis. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)**, v. 160, n. 5, p. 847–854, 2019.

KAJITANI, N. et al. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 152, 2012.

KAWAKITA, D.; MATSUO, K. Alcohol and head and neck cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 3, p. 425–434, 2017.

KUMAR, V., et al. Robbins & Cotran bases patológicas das doenças. In: **Robbins & Cotran bases patológicas das doenças**, 2010.

LAURA, Q. M., CHOW, M. D. Head and neck cancer. **The new english journal of medicine**, v.382, n. 1, p. 60–72, 2020

LEE, N. C. J. et al. Patterns of failure in high-metastatic node number human papillomavirus-positive oropharyngeal carcinoma. **Oral Oncology**, v. 85, n. July, p. 35–39, 2018.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9–22, 2011.

LICITRA, L. et al. Cancer of the oropharynx. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 41, n. 1, p. 107–122, 2002.

LIGGETT, W. H.; SIDRANSKY, D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 3, p. 1197–1206, 1998.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?. **Critical care**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2006.

MAHAJAN, A. Practical issues in the application of p16 immunohistochemistry in diagnostic pathology. **Human Pathology**, v. 51, p. 64–74, 2016.

MARZILIANO, A.; TECKIE, S.; DIEFENBACH, M. A. Alcohol-related head and neck cancer: Summary of the literature. **Head and Neck**, v. 42, n. 4, p. 732–738, 2020.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T.G. ROS signalling in the biology of cancer. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2018. p. 50-64.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.

OESTREICHER, J.; MORGAN, B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 97, n. 3, p. 270-289, 2018.

O'GARRA, A., BARRAT, F. J., CASTRO, A. G., et al. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunological reviews**, v. 223, n. 1, p. 114-131, 2008.

PARSONS, R. J.; KIDD, J. G., ROUSS, P. A Virus Causing Oral Papillomatosis in Rabbits. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 35, n. 3, p. 441–443, 1936.

PAVER, E. C. et al. Human papilloma virus related squamous cell carcinomas of the head and neck: diagnosis, clinical implications and detection of HPV. **Pathology**, v. 52, n. 2, p. 179–191, 2020.

PRIES, R.; NITSCH, S.; WOLLENBERG, B. Role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 6, n. 9, p. 1195–1203, 2006.

QIANG MA. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401-426, 2013.

RAGIN, C. C. R.; TAIOLI, E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1813–1820, 2007.

RALLI, M. GRASSO, M., GILARDI, A., et al. The role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma: a review. **Clin. Ter**, v. 171, p. e268-e274, 2020.

RETTIG, E. M.; D'SOUZA, G. Epidemiology of Head and Neck Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 379–396, 2015.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free radical biology and medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

SABATINI, M. E.; CHIOCCA, S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 3, p. 306–314, 2020.

SANJOSE, S., BROTONS, M., PAVON, M. A. The natural history of human papillomavirus infection. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 47, p. 2-13, 2018.

SANTOS, C, S. **Oxidação quimiluminescente do luminol em meios micelares**: Desenvolvimento de um ensaio para determinação da capacidade anti-radicalar. Dissertação (Mestrado em química orgânica) – Instituto de química, Universidade de São Paulo, São paulo, 2008.

SCOTT-WITTENBORN, N.; FAKHRY, C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 31, n. 4, p. 286–296, 2021.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. **Biological chemistry**, v. 387, n. 4, p. 349–360, 2006.

SERRA, S.; CHETTY, R. J Clin Pathol. 2018 Oct;71(10):853-858. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205216. Epub 2018 Aug 3. p. 1–6, 2018.

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 311, n. 1152, p. 617-631, 1985.

SOUZA, G. DA C. S. et al. Papilomavírus humano: biologia viral e carcinogênese. **Femina**, p. 189–192, 2015.

SPENCE, T. et al. HPV associated head and neck cancer. **Cancers**, v. 8, n. 8, p. 1–12, 2016.

SRIVASTAVA, K. C. et al. A Case control study to evaluate oxidative stress in plasma samples of oral malignancy. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 3, n. 3, p. 271–276, 2012.

STEPHEN, J. K. et al. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer and clinical oncology**, v. 2, n. 1, p. 51–61, 2013.

STEUER, C. E. et al. An update on larynx cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 31–50, 2017.

SUBAPRIYA, R. et al. Oxidant-antioxidant status in patients with oral squamous cell carcinomas at different intraoral sites. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 489–493, 2002.

SUBBARAYAN, R. S. et al. The role of the innate and adaptive immune response in HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma.

Laryngoscope Investigative Otolaryngology, v. 4, n. 5, p. 508–512, 2019.

SZYMONOWICZ, K. A.; CHEN, J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. **Cancer Biology and Medicine**, v. 17, n. 4, p. 864–878, 2020.

TABERNA, M. et al. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 10, p. 2386–2398, 2017.

TURNBULL, N. Squamous cell carcinoma pathology. DermNet NZ. Disponível em: < [https://dermnetnz.org/topics/squamous-cell-carcinoma-pathology#:~:text=Histology%20of%20SCC,is%20present%20\(figure%2022\)](https://dermnetnz.org/topics/squamous-cell-carcinoma-pathology#:~:text=Histology%20of%20SCC,is%20present%20(figure%2022)) > Acessado 26 janeiro 2022 às 10 horas.

VALDEZ, J. A.; BRENNAN, M. T. Impact of Oral Cancer on Quality of Life. **Dental Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 143–154, 2018.

VASCONCELOS, S. M. L., et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIDAL, L., GILLISON, M. L. Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a distinct disease type. *Hematol Oncol Clin North Am.* v.22(6), p.1125-1142, 2008.

WESTRA, W. H. et al. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. 366–369, 2008.

WINER, R. L.; KOUTSKY, L. A.; PH, D. The Epidemiology of Human Papilloma virus Infections. **Cervical Cancer: From Etiology to Prevention**, p. 143–187, 2002.

WITTEKINDT, C. et al. HPV - A different view on Head and Neck Cancer. **Laryngo-Rhino-Otologie**, v. 97, n. S 01, p. S48–S113, 2018.

WOODS, R. S. et al. Role of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A review. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n. 6, p. 172, 2014.

WU, J. H.; BATIST, G. Glutathione and glutathione analogues: therapeutic potentials. **Biochimica and Biophysica Acta (BBA)**, v. 1830, n. 5, p. 3350-3353, 2013.

YANG, J., LAM, E. W. N., HAMMAD, H. M., et al. Antioxidant enzyme levels in oral squamous cell carcinoma and normal human oral epithelium. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 31, n. 2, p. 71-77, 2002.

YONEYAMA, H.; KAWASAKI, S.; MATSUSHIMA, K. Regulation of Th1 and Th2 immune responses by chemokines. **Springer seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2000. p. 329-344.

Table 1- Clinical pathological and demographic characteristics of patients with head and neck squamous cell carcinoma HPV(+) and HPV(-) (n=43).

Characteristics	HPV(+) (n=13)		HPV(-) (n=30)		p value
Age Mean±SD	56.5±9.5		65.5±11.1		0.016*
Sex	N	%	N	%	
Men (%)	13	100.0	23	76.7	0.057
Women(%)	0	0.0	7	23.3	
Ethnic					
Caucasian	10	76.9	23	76.7	0.313
Brown	0	0.0	4	13.3	
Black	3	23.1	3	10.0	
Smoking					
Yes	6	46.2	13	43.3	0.566
No	1	7.7	7	23.3	
Ex-smoker	6	46.2	10	33.3	
Alcohol intake					
Abstinent	2	15.4	11	36.7	0.211
Rarely	0	0.0	2	6.7	
Casual	3	23.1	6	20.0	
Frequent	0	0.0	3	10.0	
Very frequent	8	61.5	8	26.7	
Hypertension					
Yes	3	23.1	12	40.0	0.487
No	10	76.9	18	60.0	
Type 2 Diabetes					
Yes	1	7.7	5	16.7	0.649
No	12	92.3	25	83.3	
HIV					
Yes	2	15.4	0	0.0	0.086
No	11	84.6	30	100.0	
Sexual exposition					
0-5	3	23.1	6	20.0	0.094
5 to 10	3	23.1	17	56.7	
>10	7	53.8	7	23.3	
Histologic graduation					
Well differentiated	4	30.8	11	36.7	0.100
Moderately differentiated	9	69.2	12	40.0	
Poorly differentiated	0	0.0	7	23.3	

HPV: Human Papilloma Virus. Sexual exposition: 0-5 sexual partners in life; 5 to 10 sexual partners; >10: more than 10 sexual partners. Abstinent (1x/year or never drink); Rarely (1x/month); Casual (1-3x/month); Frequent (1-4x/week); Very frequent (every day). Categorical data were presented as number and percentage, and continuous as mean standard deviation. It was considered statistically significant p value <0,05*.

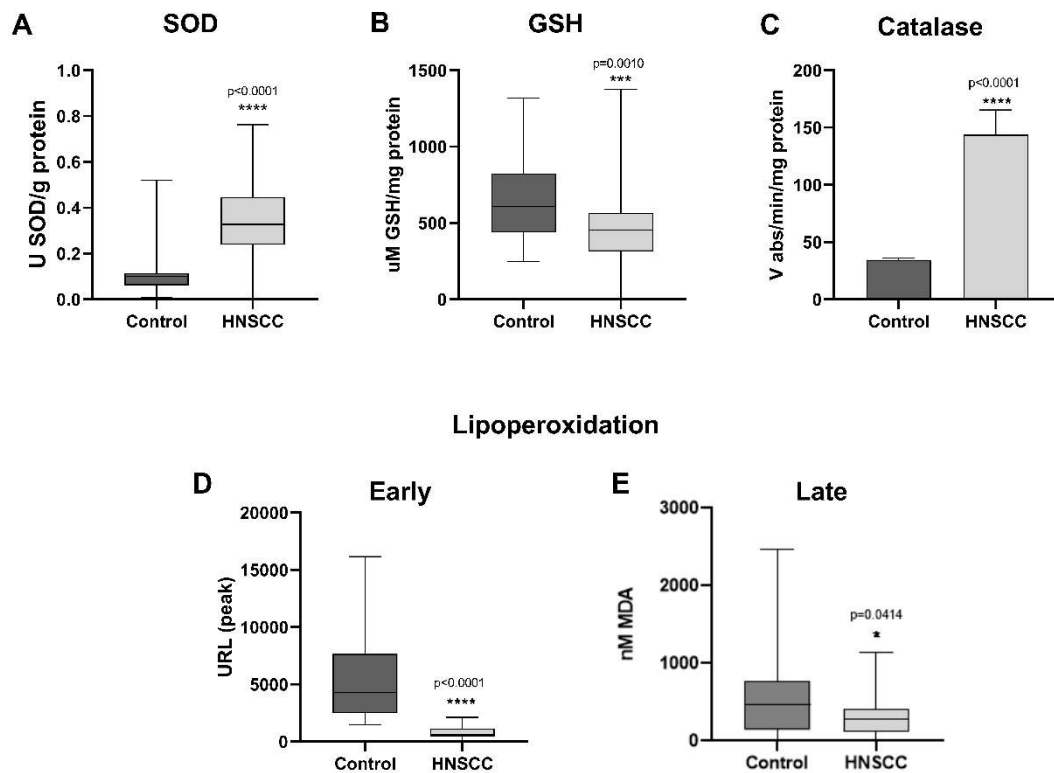


Figure 1- Systemic oxidative stress parameters in erythrocytes. (A) Comparison of Superoxide dismutase (SOD) activity in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and control group. (B) Comparison of reduced glutathione (GSH) in HNSCC and control group. (C) Comparison of catalase enzyme activity in HNSCC and control group. (D) Comparison of maximum emission peak of early lipid peroxidation in HNSCC and control group. (E) Comparison of nM MDA late lipid peroxidation in HNSCC and control group. ns: not significant; * indicates significant difference ($p < 0.05$). A, B, D and E data were expressed as median with interquartile range; C were expressed as mean \pm standard error.

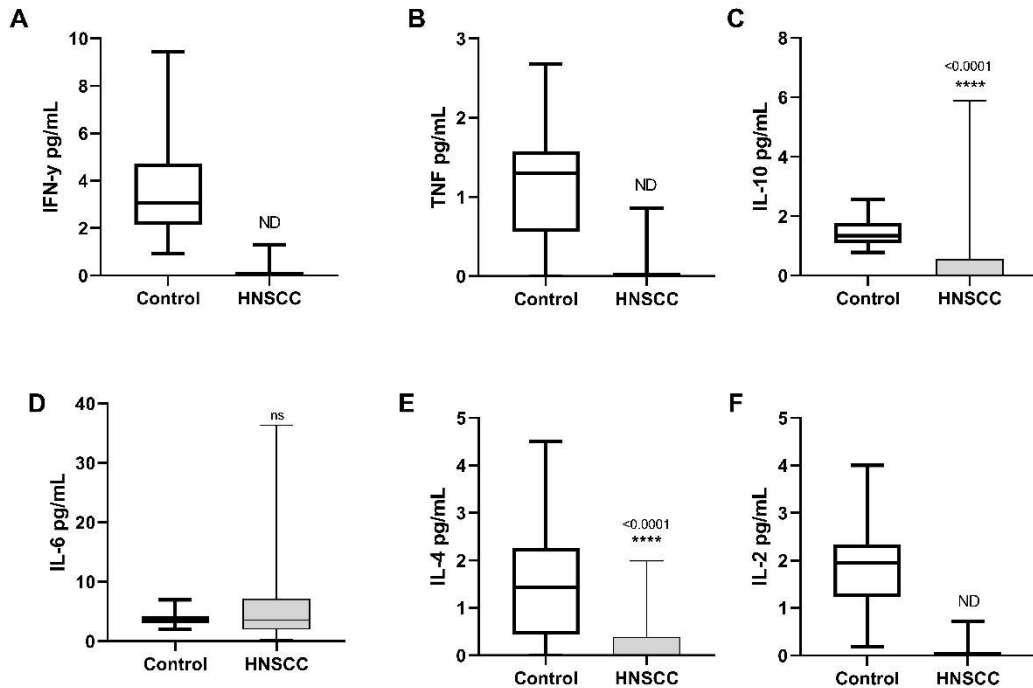


Figure 2- Serum systemic inflammatory profile. (A) Comparison of IFN- γ concentrations in serum of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and control group. (B) Comparison of TNF- α in serum of HNSCC and control group. (C) Comparison of IL-10 in serum of HNSCC and control group. (D) Comparison of IL-6 in HNSCC and control group. (E) Comparison of IL-4 in HNSCC and control group. (F) Comparison of IL-2 in HNSCC and control group. ND: undetectable; ns: not significant; * indicates significant difference ($p < 0.05$). A, B, C, D, E and F data were expressed as median with interquartile range.

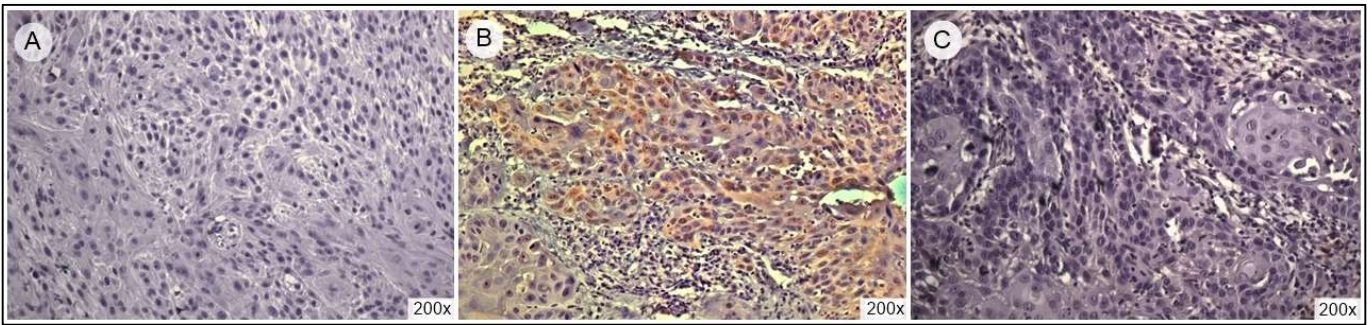


Figure 3 – p16INK4a Immunohistochemistry. (A) Negative Control. (B) A p16- positive expression in tumor cells. (C) A p16-negative case with no detectable p16 expression. Images taken with a 20x objective lens.

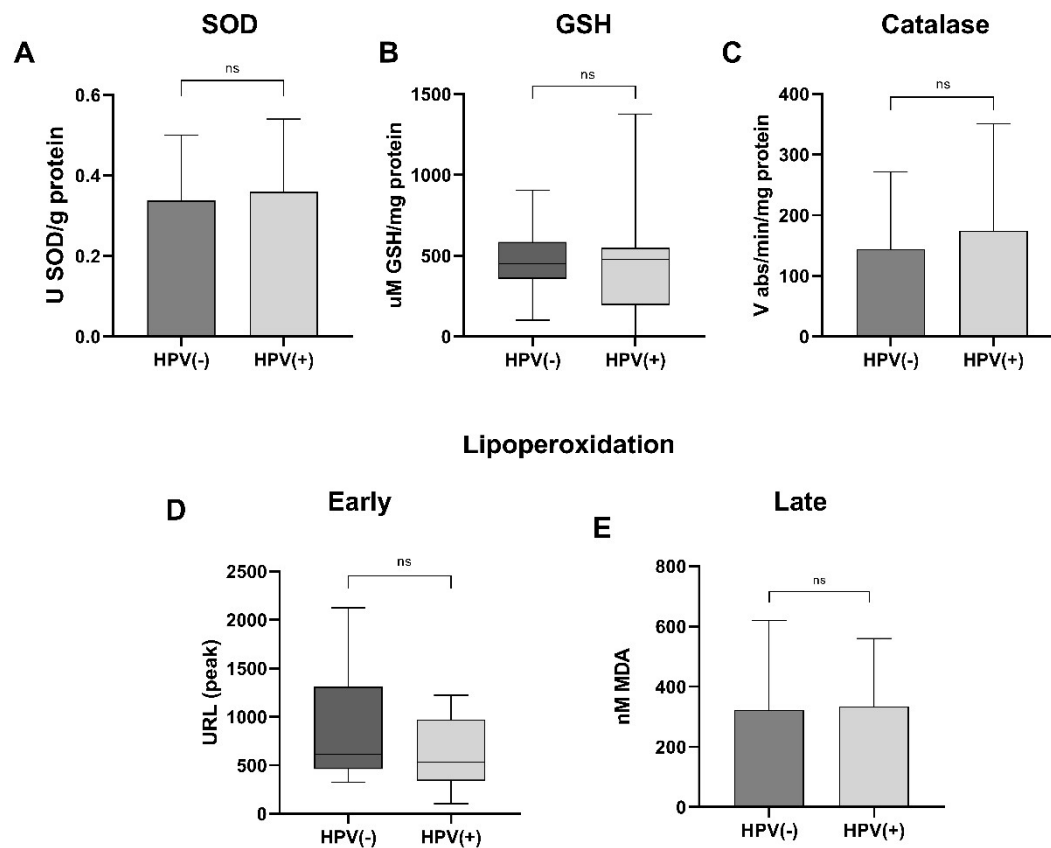


Figure 4- Systemic oxidative stress parameters in erythrocytes from patients HPV(+) and HPV(-). (A) Comparison of Superoxide dismutase (SOD) activity in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) HPV(+) and HPV(-). (B) Comparison of reduced glutathione (GSH) in HNSCC HPV(+) and HPV(-). (C) Comparison of catalase enzyme activity in HNSCC HPV(+) and HPV(-). (D) Comparison of maximum emission peak early of lipid peroxidation in HNSCC HPV(+) and HPV(-). (E) Comparison of nM MDA late lipid peroxidation in HPV(+) and HPV(-). ns: not significant. B and D data were expressed as median with interquartile range; A, C and E were expressed as mean \pm standard error.

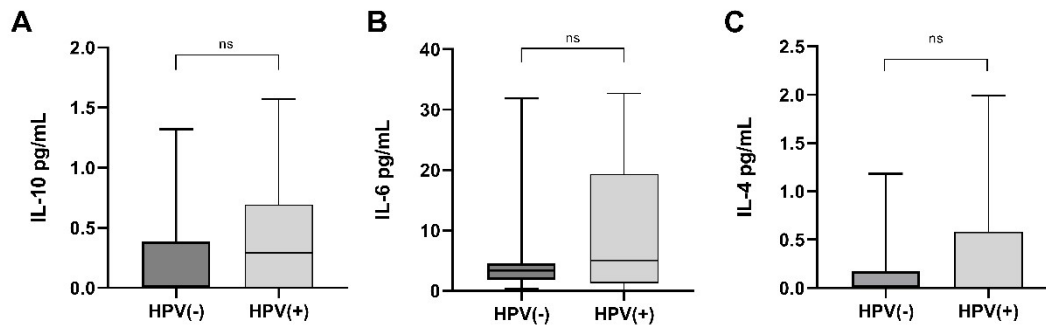


Figure 5- Serum systemic inflammatory profile HPV(+) and HPV(-). (A) Comparison of IL-10 in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) HPV(+), HPV(-) (B) Comparison of IL-6 in serum of HNSCC HPV(+) and HPV(-). (C) Comparison of IL-4 in serum of HNSCC HPV(+) and HPV(-) . ns: not significant. A, B and C data were expressed as median with interquartile range.

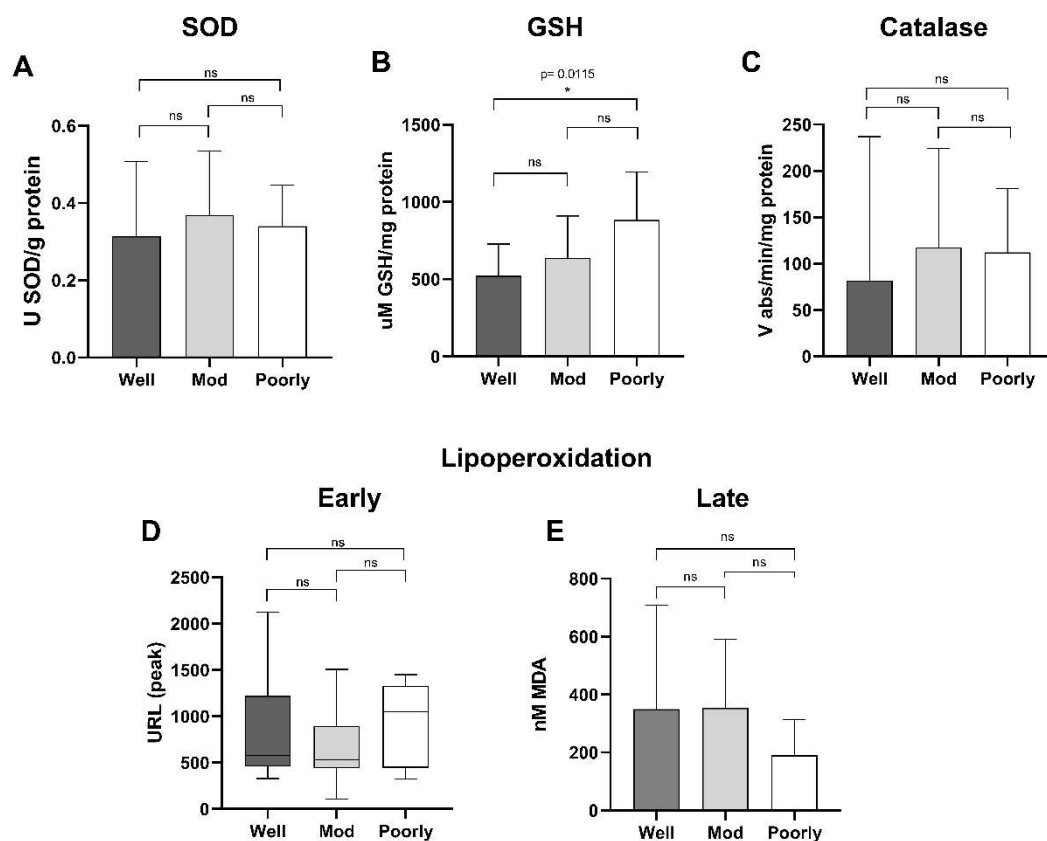


Figure 6- Systemic oxidative stress parameters in erythrocytes from patients with Head and neck squamous cell carcinoma in different histological gradations. (A) Comparison of Superoxide dismutase (SOD) activity in patients with well, moderately and poorly differentiated histological gradations. (B) Comparison of reduced glutathione (GSH) in patients with well, moderately and poorly histological gradations. (C) Comparison of catalase enzyme activity in patients with well, moderately and poorly histological gradations. (D) Comparison of maximum emission peak early of lipid peroxidation in patients with well, moderately and poorly histological gradations. (E) Comparison of nM MDA late lipid peroxidation in histological gradations. Mod: moderately; ns: not significant; * indicates significant difference ($p < 0.05$). A data were expressed as mean \pm standard error. B, C, D and E data were expressed as median with interquartile range.

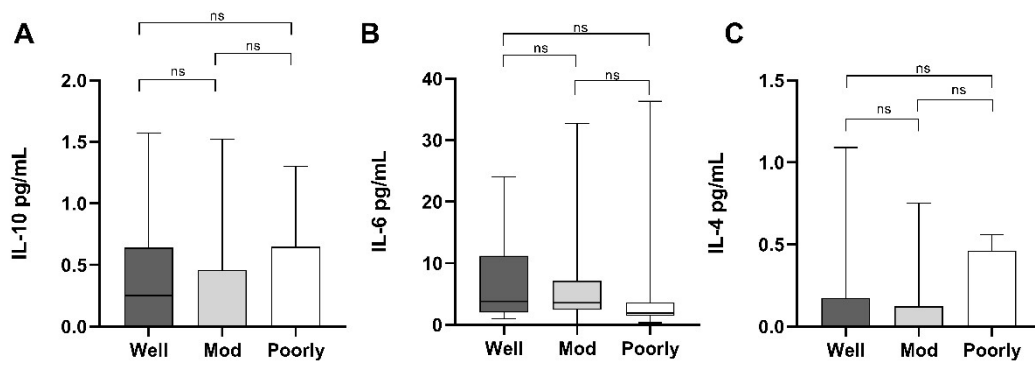


Figure 7- Serum systemic inflammatory profile from patients with Head and neck squamous cell carcinoma in different histological gradations. (A) Comparison of IL-10 in patients with well, moderately and poor histological gradations (B) Comparison of IL-6 in serum of patients with well, moderately and poor histological gradations. (C) Comparison of IL-4 in serum of patients with well, moderately and poor histological gradations. ns: not significant. A, B and C data were expressed as median with interquartile range.

ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes

“Uma nova abordagem do estudo do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: papel do HPV, variantes genéticas de moléculas relacionadas e estresse oxidativo.”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa “Uma nova abordagem do estudo do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: papel do HPV, variantes genéticas de moléculas relacionadas e estresse oxidativo”, a ser realizada nos hospitais relacionados: Hospital do Coração de Londrina; Hospital Norte Paranaense (HONPAR) de Araongas; Hospital Universitário – UEL e Clínica Odontológica – UEL.

O objetivo da pesquisa é avaliar os níveis de radicais livres no seu sangue e na sua lesão (que será retirada na cirurgia) assim como avaliar a presença do vírus HPV e também de uma variação genética que pode influenciar na progressão de sua doença. A análise dessas moléculas indica características de estresse oxidativo e proliferativo e serão comparadas a de indivíduos sem lesões na cavidade oral e orofaríngeas.

Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: você doará uma amostra de sangue e de tecido (retirado durante sua cirurgia) e você ainda responderá um questionário breve sobre aspectos sociodemográficos e de hábitos de higiene bucal, alimentares, tabagistas, etilistas. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa e tratamento. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas para os fins desta pesquisa e para pesquisas futuras e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Após as análises, as amostras serão armazenadas no Laboratório de Genética Molecular e Imunologia e Patologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina para realização de futuras pesquisas (mas o senhor será consultado novamente sobre sua participação nestes estudos futuros).

Esclarecemos ainda, que você não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são indiretos, pois esperamos que este estudo possa fornecer ferramentas necessárias para correlacionar câncer de cabeça e pescoço com

a presença ou a ausência do vírus HPV em relação ao estresse oxidativo e perfil proliferativo.

Quanto aos riscos, estes são mínimos, e são decorrentes da coleta de sangue (que pode trazer algum desconforto, contudo será realizada por profissional altamente capacitado durante a realização de sua cirurgia), e a retirada de um fragmento de tecido, não traz riscos adicionais ao senhor(a), pois a cirurgia já seria realizada independentemente de sua participação neste estudo. Contudo ressaltamos que caso sinta algum desconforto, o senhor(a) será prontamente atendido pelos membros da equipe do projeto.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar Profa. Dra. Alessandra L. Cecchini Armani (3371-4529), Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira (3371-5728), Prof. Dr. Rubens Cecchini (3371-4521), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue à você.

Londrina, ___ de _____ de 2021.

Pesquisador Responsável

RG: 49.842.935-0

Luca Kiichi Suzuki Trancolin

(NOME POR EXTENSO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

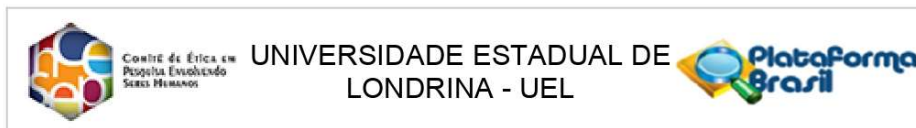
Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.

<p>Faz algum outro tratamento para outra doença?</p> <p>Qual doença?</p> <p>Qual medicamento?</p>
<p>Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço</p> <p>Sim</p> <p>Não</p> <p>Qual?</p>
<p>Já apresentou algum tipo de câncer? Sim () Não ()</p> <p>Qual (is)?</p>
<p>Histórico familiar de Câncer? Qual?</p> <p>Existem casos de CECF em sua família (parentes consanguíneos)?</p> <p>Sim () Não ()</p> <p>Qual grau de parentesco?</p>
<p>Você fuma? Sim () Não () Ex- fumante ()</p> <p>Se sim, Idade de início:</p> <p>Nº de cigarros por dia:</p> <p>Para ex-fumante (abandonou o cigarro há \geq 6meses),</p> <p>Idade de início:</p> <p>Idade de término:</p> <p>Nº de cigarros por dia:</p>
<p>Faz uso de bebida alcoólica?</p> <p>() Abstinente (menos de 1x/ano ou nunca bebeu)</p> <p>() Raramente (menos de 1x/mês)</p> <p>() Ocasional (1-3x/mês)</p> <p>() Frequente (1-4x/semana)</p> <p>() Muito Frequente (todos os dias)</p> <p>Nº de drinks por semana:</p>
<p>Conhece o vírus HPV?</p> <p>() Não, nunca ouvi falar</p> <p>() Ouvi falar, mas não sei o que é</p> <p>() Sim, conheço</p>
<p>Conhece as formas de transmissão do vírus? Sim() Não()</p>

<p>Se sim, qual ou quais as formas de transmissão?</p> <p>() Relação sexual</p> <p>() Sanguínea</p> <p>() Contato roupas e objetos</p> <p>() Outros</p>
Idade da 1ª relação sexual:
Número de parceiros sexuais durante a vida:
Número de parceiros sexuais nos últimos 6 meses:
Já tomou a vacina para HPV? Sim () Não ()
<p>Hábitos de higiene oral</p> <p>Quantas vezes por dia você escova os dentes? Não tem dente</p> <p>Escova a língua? () Sim () Não</p> <p>Usa enxaguante bucal? () Sim () Não</p> <p>Faz gargarejo? () Sim () Não Com que frequência:</p> <p>Faz bochecho? () Sim () Não Com que frequência:</p> <p>Usa fio dental? () Sim () Não Com que frequência:</p> <p>Vai ao dentista com que frequência?</p> <p>Quando foi a última visita ao dentista?</p>



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Uma nova abordagem do estudo do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: papel do HPV, variantes genéticas de moléculas relacionadas e estresse oxidativo.

Pesquisador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 20516119.4.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de PG em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.595.210

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa vinculado ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da UEL. O delineamento é transversal com pacientes com suspeita clínica de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP). O câncer de cabeça e pescoço é um dos mais prevalentes no mundo, sendo a maioria dos casos classificados como carcinoma epidermóide, originado do epitélio estratificado da cavidade oral, faringe e laringe. A incidência anual de CECP é de cerca de 650.000 novos casos no mundo, representando o sexto tipo de câncer que mais acomete a população. No Brasil, aproximadamente 22.370 novos casos são diagnosticados anualmente e 8.481 evoluem para óbito, cometendo mais o sexo masculino. Os primeiros sintomas do CECP geralmente são discretos, os pacientes relatam sentir pouca dor, apresentarem pequenas feridas que frequentemente sangram, ou manchas esbranquiçadas. Quando o paciente se queixa de dores intensas e dificuldade de mastigar e deglutir, a lesão já evoluiu ao ponto de atingir a musculatura e nervos. Nesses casos as consequências são dramáticas ao paciente, já que o tratamento além da quimioterapia e a radioterapia, é a remoção cirúrgica do tumor, prejudicando a fala, a respiração e alimentação. Os pacientes com suspeita clínica de CECP serão recrutados do Hospital do Coração de Londrina, Hospital Norte Paranaense (HONPAR) de Araongas, Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina e da Clínica Universitária Odontológica da Universidade Estadual de Londrina. A análise clínica dos pacientes será realizada pelos especialistas durante as

Endereço: LABESC - Sala 14

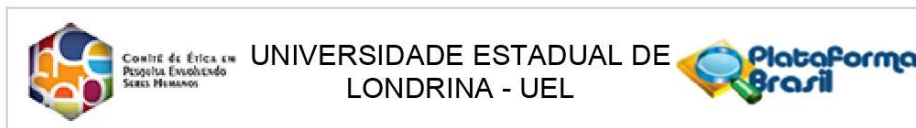
Bairro: Campus Universitário

UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

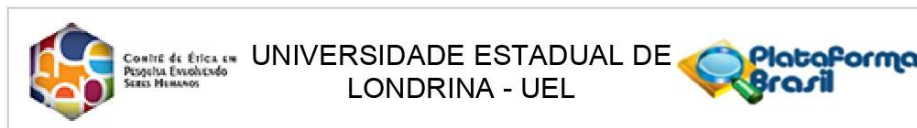
E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 3.595.210

consultas encaminhadas a eles: Dr. André Armani, Cirurgião de Cabeça e Pescoço do Departamento de Clínica Cirúrgica e Dr. Ademar Takahama Junior, cirurgião dentista da Clínica Universitária Odontológica - UEL, ambos docentes da Universidade Estadual de Londrina. Se, durante a consulta, houver a suspeita de CECP, estes pacientes serão convidados a participar do estudo e caso aceitem, deverão assinar o TCLE. A cirurgia ou biópsia, as quais o participante da pesquisa deverá ser submetido, ocorrerá participando ou não do estudo. Os participantes serão também submetidos à coleta de sangue antes de iniciar o tratamento. Para a coleta do sangue os participantes da pesquisa serão atendidos por um enfermeiro, biomédico ou farmacêutico certificado para coleta de sangue. Caso o mesmo não se sinta bem durante o procedimento, ele será prontamente atendido. No momento da coleta de sangue será aplicado um questionário aos participantes da pesquisa para obtenção de informações como idade, tabagismo, etilismo, naturalidade, profissão, conhecimento sobre o HPV, presença de doenças crônicas, uso de medicamentos de forma contínua e presença de outros tipos de câncer e outras perguntas. Essas informações serão utilizadas para a caracterização dos participantes do estudo e para que haja a paridade com os controles. Dos participantes controles será obtido apenas amostras de sangue periférico, sendo coletados um tubo de 5mL com anticoagulante EDTA, um com heparina e outro sem anticoagulante. Dos participantes serão obtidos: Um tubo de 5mL de sangue periférico com anticoagulante EDTA para análise dos polimorfismos; Um fragmento do tecido tumoral (que será coletado no ato da biópsia do tumor), separado pelo médico cirurgião para detecção molecular da presença do DNA do vírus HPV; Um tubo de 5mL de sangue periférico com anticoagulante heparina para análise de marcadores de estresse oxidativo; Para os casos que forem submetidos à cirurgia como intenção curativa, amostras do tecido com câncer e do tecido normal adjacente (margem de segurança) serão coletadas. A detecção molecular do HPV, bem como as análises das variantes genéticas serão realizadas no Laboratório de Genética Molecular e Imunologia da Universidade Estadual do Londrina (Coordenado pela professora Karen Brajão de Oliveira). As análises de marcadores de estresse oxidativo, perfil inflamatório e imunohistoquímica serão realizadas no laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres e de Patologia Molecular (Coordenado pela professora Alessandra C. Armani), respectivamente, ambos da Universidade Estadual de Londrina do departamento de Ciências Patológicas. A hipótese do estudo é que acredita-se que o estresse oxidativo, o perfil inflamatório sistêmico e a presença de polimorfismo de moléculas associadas ao sistema imunológico e ao estresse oxidativo influenciam o prognóstico do CECP, de forma diferente entre pacientes positivos e negativos para a presença do HPV.

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA **CEP:** 86.057-970
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 3.595.210

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

. Avaliar o estresse oxidativo, o perfil inflamatório sistêmico e a presença de polimorfismo de moléculas associadas ao sistema imunológico e ao estresse oxidativo, em pacientes com CECP, positivas e negativas para a presença do HPV.

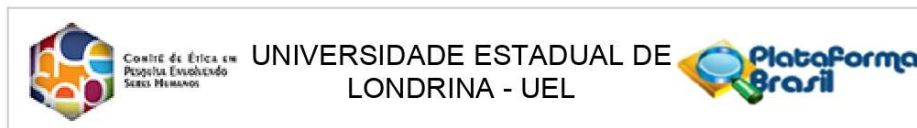
Objetivos Secundários:

- Detectar a presença do vírus HPV em pacientes com CECP;
- Analisar o estresse oxidativo no ambiente tumoral na presença ou ausência do HPV em pacientes com CECP;
- Avaliar o perfil inflamatório no ambiente tumoral na presença ou ausência do HPV em pacientes com CECP;
- Comparar o estresse oxidativo sistêmico de pacientes com CECP infectados ou não com HPV com indivíduos controles;
- Comparar o perfil inflamatório sistêmico de pacientes com CECP infectados ou não com HPV com indivíduos controles;
- Comparar a ocorrência das variantes genéticas de moléculas do sistema imunológico em pacientes com CECP infectados ou não com HPV com indivíduos controle;
- Comparar a ocorrência das variantes genéticas de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo em pacientes com CECP infectados ou não com HPV com indivíduos controle;
- Correlacionar o estresse oxidativo e inflamação com a presença das variantes genéticas em pacientes com CECP infectados ou não com HPV e com indivíduos controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora os riscos desta pesquisa são mínimos, pois os únicos procedimentos extras aos quais serão submetidos são: 1. Realização de questionário sociodemográfico e hábitos, que será aplicado em local reservado, por membros treinados da equipe, a fim de evitar constrangimentos à participante, que poderá se recusar a responder as perguntas caso não se sinta confortável; 2) Realização de coleta de sangue poderá gerar certo desconforto, dor, hematoma no local, e raramente desmaios, contudo serão realizadas por profissionais capacitados a fim de minimizar estes possíveis riscos, e serão realizadas nos hospitais, em local apropriado. Contudo caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado por mim (pesquisadora responsável) e / ou pela equipe de trabalho do projeto. Em relação à coleta de material tumoral, não há riscos diretos da participação nesta pesquisa, tendo

Endereço: LABESC - Sala 14	CEP: 86.057-970
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR	Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 3.595.210

em vista que todos os participantes serão submetidas aos procedimentos de excisão da lesão, para seu diagnóstico e tratamento, independentemente de sua participação neste estudo.

Benefícios: Não há benefícios diretos para os participantes. Contudo como benefícios indiretos espera-se uma maior compreensão acerca da influência da presença do vírus HPV, de marcadores de estresse oxidativo, de variantes genéticas, no prognóstico do paciente, permitindo assim o desenvolvimento de estudos e protocolos clínicos para uma melhor escolha do tratamento, resultando assim em melhorias nas taxas de cura e diminuição de custos para o serviço público de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante.

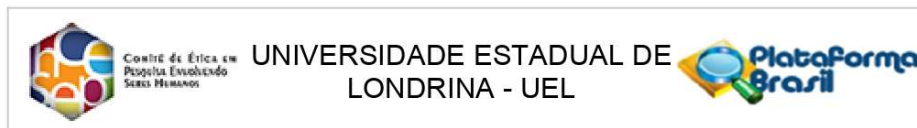
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou folha de rosto assinada pela vice coordenação do PPG em Patologia experimental. O cronograma tem início da coleta de dados prevista para 01/10/19. Declara financiamento próprio e orçamento de R\$ 11.000 e informa que diversos equipamentos e materiais de consumo necessários para a realização da maior parte do projeto já estão disponíveis e esses materiais foram adquiridos através de editais aprovados anteriormente e que uma pequena parte dos materiais de consumo será adquirida com as taxas de bancadas. Apresentou autorização de todas as instituições coparticipantes e os dois TCLE foram apresentados em forma de convite e estão adequados. Declara ainda riscos mínimos relacionados com a aplicação do questionário e a coleta de dados, mas caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pela pesquisadora ou equipe. Informa que não há benefícios diretos aos participantes da pesquisa e que os benefícios indiretos são a maior compreensão da influência do vírus HPV e marcadores de estresse oxidativo no prognóstico dos pacientes. Apresentou também declaração comprometendo-se a seguir todas as recomendações apresentadas na Resolução CEPE/CA nº052/2017 que regulamenta o armazenamento de material biológico humano em biorrepositório para finalidade de pesquisa e informa no TCLE que após as análises, as amostras serão armazenadas no Laboratório de Genética Molecular e Imunologia e Patologia Molecular da UEL para realização de futuras pesquisas e que o mesmo será consultado novamente sobre sua participação nestes estudos futuros.

Recomendações:

No TCLE, esclarecer ao participante de pesquisa que o mesmo tem a opção de não aceitar o armazenamento da amostra para pesquisas futuras.

Endereço: LABESC - Sala 14	CEP: 86.057-970
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR Município: LONDRINA	
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 3.595.210

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado(a) Pesquisador(a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade apresenta-Lo aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Ressaltamos, para início da pesquisa, as seguintes atribuições do pesquisador, conforme Resolução CNS 466/2012 e 510/2016:

A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:

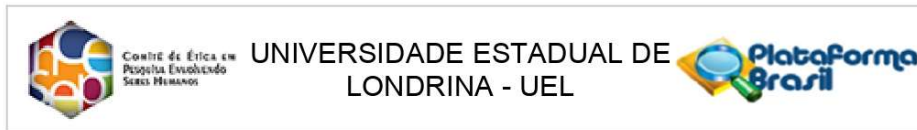
- conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido;
- apresentar dados solicitados pelo sistema CEP/CONEP a qualquer momento;
- desenvolver o projeto conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção;
- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante do projeto;
- justificar fundamentadamente, perante o sistema CEP/CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Coordenação CEP/UEL.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1384786.pdf	05/09/2019 20:34:13		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	19/08/2019 11:23:36	Karen Brajão de Oliveira	Aceito
Declaração de	Declaracao_HRJF_co_participacao.pdf	19/08/2019	Karen Brajão de	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 3.595.210

Instituição e Infraestrutura	Declaracao_HRJF_co_participacao.pdf	11:20:41	Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura / Investigador	12_08_19_Projeto_Cabeca_e_Pescoco.pdf	13/08/2019 11:48:00	Karen Brajão de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES.docx	13/08/2019 11:38:02	Karen Brajão de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLES.docx	13/08/2019 11:37:50	Karen Brajão de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_de_Responsabilidade_para_uso_de_Banco_de_Material_Biologico_Humano_atual.pdf	12/08/2019 15:08:47	Karen Brajão de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_HU.pdf	12/08/2019 14:57:42	Karen Brajão de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Hospital_Coracao.pdf	12/08/2019 14:57:32	Karen Brajão de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Clinica_Odontologica_co_participacao.pdf	12/08/2019 14:57:21	Karen Brajão de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 24 de Setembro de 2019

Assinado por:
Adriana Lourenço Soares Russo
(Coordenador(a))

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR Município: LONDRINA CEP: 86.057-970
Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br