

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE
FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

MARCELO MARCOS OPOLSKI

**CONCENTRAÇÕES SALIVARES E PLASMÁTICAS DO FATOR
TUMORAL DE NECROSE ALFA E SUA CORRELAÇÃO COM AS
CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA**

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO/2020)

MARCELO MARCOS OPOLSKI

**CONCENTRAÇÕES SALIVARES E PLASMÁTICAS DO FATOR TUMORAL DE
NECROSE ALFA E SUA CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS
CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde – nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Sabrina Grassioli

Co-orientadora: Dra. Carolina Panis

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO/2020)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Opolski, Marcelo Marcos

Concentrações salivares e plasmáticas do fator tumoral de necrose alfa e sua correlação com as características clínico-patológicas de pacientes com câncer de mama / Marcelo Marcos Opolski; orientador(a), Sabrina Grassioli; coorientador(a), Carolina Panis, 2020.
59 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2020.

1. Fator de Necrose Tumoral Alfa. 2. Câncer de Mama. 3. Saliva. 4. Plasma. I. Grassioli, Sabrina. II. Panis, Carolina. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELO MARCOS OPOLSKI

**CONCENTRAÇÕES SALIVARES E PLASMÁTICAS DO FATOR
TUMORAL DE NECROSE ALFA E SUA CORRELAÇÃO COM AS
CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Membro da banca: Profa. Dra. Sabrina Grassioli
UNIOESTE – Campus Cascavel

Membro da banca: Prof. Dr. João Paulo Amorim
UNIOESTE – Campus Cascavel

Membro da banca: Prof. Dr. Leonardo Garcia Velasquez
UNIPAR - Universidade Paranaense

FRANCISCO BELTRÃO, PR
Março/2020

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas graças, bênçãos e oportunidades.

A minha família, esposa Carla e filha Leticia, pelo apoio, incentivo e compreensão.

Ao programa de mestrado em Ciências Aplicadas à saúde, docentes, coordenadora do programa Dra. Léia C. Lucio, assistente de coordenação Andréia A. de Rosso, pela excelente qualidade de ensino.

A minha orientadora, professora Dra. Sabrina Grassioli, pelo auxílio, prestatividade e direcionamento seguro com seus conhecimentos para elaboração e conclusão deste trabalho.

A minha co-orientadora, professora Dra. Carolina Panis, por ter me recebido e proporcionar a delineação e realização desta pesquisa em seu laboratório, acreditado, apoiado, incentivado, com disponibilidade sempre presente em ensinar.

Ao Dr. Daniel Rech, ao Hospital do Câncer de Francisco Beltrão, pacientes envolvidos na pesquisa, por possibilitarem a realização deste trabalho.

A todos que fazem parte do Laboratório de Biologia de Tumores da Unioeste, por todo auxílio disponibilizado.

Aos meus colegas de turma do mestrado, pelo companheirismo e amizade.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Composição acinar.....	16
Figura 2 – Desenho do estudo.....	31
Figura 3 – Linearidade das duas metodologias.....	33
Figura 4 – Concordância entre os métodos.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Percentual

BC – Breast Cancer

Ca – Cálcio

CCEO – Carcinoma de Células Escamosas Oral

Cl – Cloreto

DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Danos

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

H – Hidrogênio

HCO₃ – Bicarbonato

HER – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IgA – Imunoglobulina A

IL – Interleucinas

IMC – Índice de Massa Corporal

K – Potássio

Kg – Quilogramas

KHCO₃ – Hidrogenocarbonato de Potássio

KI67% – Índice de Proliferação Celular

m – Metros

Mg – Magnésio

miRNAs – MicroRNAs

mL – Mililitros

mRNA – RNA mensageiro

Na – Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NFκB – Fator Nuclear κB

NIH – National Institutes of Health

NLRs – Domínio de Oligomerização Ligante de Nucleotídeo

nm – Nanômetro

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

pg/mL – Picograma por Mililitro

pH – Potencial Hidrogeniônico

PR – Receptor de Progesterona

RE – Receptor de Estrógeno

RNA – Ácido Ribonucleico

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNP – Sistema Nervoso Parassimpático

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLRs – Receptores Semelhantes a Toll

CONCENTRAÇÕES SALIVARES E PLASMÁTICAS DO FATOR TUMORAL DE NECROSE ALFA E SUA CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Resumo

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) caracteriza-se como um dos mediadores mais importantes da resposta inflamatória contra tumores, incluindo o câncer de mama. Estudos recentes têm indicado que as concentrações sanguíneas de TNF- α em diferentes estados patológicos podem ser refletidas também na secreção salivar. Apesar de ser conhecido pelo seu efeito antitumoral, o TNF- α pode atuar promovendo características de pior prognóstico no câncer de mama. Já a saliva é um fluido biológico complexo que contém uma variedade de enzimas e anticorpos, o que a torna fonte alternativa para a busca de novos biomarcadores para tumores, e portanto, um fluido clinicamente informativo e útil para abordagens de diagnóstico e de prognóstico clínico. Ainda não está claro se existe correlação clínica entre os níveis de TNF- α circulante, níveis salivares e parâmetros determinantes de prognóstico no câncer de mama. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre as concentrações plasmáticas e salivares do TNF- α em pacientes com câncer de mama e a relação destas concentrações com os aspectos clinico-patológicos de pacientes com câncer de mama. Trata-se de um estudo piloto exploratório, no qual inicialmente foram incluídas 82 mulheres com suspeitas para neoplasia mamária (BIRADIS IV ou V) atendidas na rede pública no âmbito da 8ª Regional de Saúde do Paraná e encaminhadas ao Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc) entre novembro de 2017 a outubro de 2018. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 49 mulheres as quais apresentavam coleta pareada de sangue e saliva, foram alocadas nos grupos. Mulheres com tumores benignos formaram o grupo Controle (n=29) e aquelas com tumores malignos formaram o grupo Câncer (BC) (n=20). Para ambos os grupos as amostras salivares e de sangue periférico foram coletadas após 12h de jejum, sendo a dosagem de TNF- α realizada por Enzimaimunoensaio Sanduíche Humano. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIOESTE sob o CAAE N° 35524814.4.0000.0107. Como

resultados, o grupo BC (61,3 + 2,9 anos) apresentaram maior média de idade em relação às mulheres do grupo Controle (32,6 + 2,9 anos; $p < 0,0001$). O peso corporal, a estatura e o IMC foram semelhantes entre os grupos ($p > 0,05$). Os níveis salivares de TNF- α foram significativamente maiores em relação à concentração plasmática nos dois grupos. No entanto, quando comparados os grupos Controle versus BC, nem os níveis plasmáticos ($p = 0,8017$) nem salivar ($p = 0,1664$) de TNF- α foram estatisticamente diferentes. Não foi possível identificar associação significativa com os níveis salivares ou plasmáticos de TNF- α e idade, peso corporal, altura ou IMC em pacientes com BC. Além disso, também demonstramos que os níveis plasmáticos salivar e TNF- α não estavam associados aos biomarcadores ER; PR nem Ki-67. Também foi utilizado teste ANOVA para avaliar as variáveis qualitativas, como presença de êmbolos linfáticos, HER, grau histológico e subtipo molecular de câncer de mama em relação aos níveis salivares ou plasmáticos de TNF- α no grupo controle e BC. Entretanto, não foram encontradas associações ($p > 0,05$). Em conclusão, os níveis plasmáticos ou salivares de TNF- α não foram alterados em pacientes com BC, bem como, em ambos os locais, o TNF- α não tem correlação com os biomarcadores clássicos de tumores em pacientes com BC.

Palavras-chave: Fator de Necrose Tumoral Alfa; Câncer de Mama; Saliva; Plasma.

SALIVARY AND PLASMATIC CONCENTRATIONS OF THE TUMOR FACTOR OF ALPHA NECROSIS AND THEIR CORRELATION WITH THE CLINICAL-PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

Abstract

The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is characterized as one of the most important mediators of the inflammatory response against tumors, including breast cancer. Recent studies have indicated that blood concentrations of TNF- α in different pathological states can also be reflected in salivary secretion. Despite being known for its antitumor effect, TNF- α can act by promoting characteristics of a worse prognosis in breast cancer. Saliva, on the other hand, is a complex biological fluid that contains a variety of enzymes and antibodies, which makes it an alternative source for the search for new biomarkers for tumors, and therefore, a clinically informative and useful fluid for diagnostic approaches and clinical prognosis. It is still unclear whether there is a clinical correlation between circulating TNF- α levels, salivary levels and prognostic parameters in breast cancer. Thus, the objective of this work was to evaluate the relationship between plasma and salivary concentrations of TNF- α in patients with breast cancer and the relationship of these concentrations with the clinical and pathological aspects of patients with breast cancer. This is an exploratory pilot study, which initially included 82 women with suspected breast cancer (BIRADIS IV or V) seen in the public health system within the scope of the 8th Regional Health of Paraná and referred to the Francisco Beltrão Cancer Hospital (Ceonc) between November 2017 and October 2018. After applying the inclusion and exclusion criteria, 49 women who had paired blood and saliva collection were allocated to the groups. Women with benign tumors formed the Control group (n = 29) and those with malignant tumors formed the Cancer (BC) group (n = 20). For both groups, salivary and peripheral blood samples were collected after 12 hours of fasting, and TNF- α was measured by the Human Sandwich Enzyme Immunoassay. The research was approved by the Research Ethics Committee of UNIOESTE under CAAE No. 35524814.4.0000.0107. As a result, the BC group (61.3 + 2.9 years) had a higher average age compared to women in the Control group (32.6 + 2.9 years; p

<0.0001). Body weight, height and BMI were similar between groups ($p > 0.05$). The salivary levels of TNF- α were significantly higher in relation to the plasma concentration in both groups. However, when comparing the Control versus BC groups, neither the plasma levels ($p = 0.8017$) nor salivary ($p = 0.1664$) of TNF- α were statistically different. It was not possible to identify a significant association with salivary or plasma levels of TNF- α and age, body weight, height or BMI in patients with BC. In addition, we also demonstrated that plasma salivary and TNF- α levels were not associated with ER biomarkers; PR nor Ki-67. ANOVA test was also used to assess qualitative variables, such as the presence of lymphatic emboli, HER, histological grade and molecular subtype of breast cancer in relation to salivary or plasma levels of TNF- α in the control and BC group. However, no associations were found ($p > 0.05$). In conclusion, plasmatic or salivary levels of TNF- α were no altered in BC patients, as well as, in both sites the TNF- α no have correlation with classical tumor biomarkers in BC patients.

keywords: Tumor Necrosis Factor Alpha; Breast Cancer; Saliva; Plasma.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Fisiologia da saliva	15
1.2 A saliva e o diagnóstico de doenças	18
1.3 Importância da saliva como fonte de marcadores no câncer.....	21
1.4 Vias ou rotas para adição de substâncias do plasma para a saliva	24
1.5 TNF salivar e sua relação com o câncer de mama	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Geral.....	30
2.2 Específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 Tipo de Estudo e Delineamento Experimental	31
3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	31
3.3 Obtenção das amostras e dosagem de TNF- α	32
3.4 Prontuário médico	34
3.5 Análise Estatística.....	34
4. REFERÊNCIAS	35
5. ARTIGO CIENTÍFICO	42
6. ANEXOS	48
ANEXO I – Normas da Revista Brazilian Oral Research	48
ANEXO II – Comprovante de Submissão Brazilian Oral Research.....	54
ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	56
ANEXO IV – Comprovante do Comitê de Ética.....	57

1. INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido biológico dinâmico produzido por secreções das três principais glândulas salivares (parótida, submandibular, sublingual) e pelas glândulas salivares menores. Na sua constituição, a saliva contém 99% de água, 0,3% de proteínas e 0,2% de substâncias inorgânicas e orgânicas (LIU; DUAN, 2012), além de fluido gengival, detritos celulares, placas, bactérias, secreções nasais e bronquiais, células do epitélio bucal e substâncias exógenas, tendo potencial Hidrogeniônico (pH) na faixa de 6,8 a 7,2 (GARCÍA-GODOY; HICKS, 2008). Em um indivíduo saudável, a secreção salivar diária pode variar de 0,5 a 1,5 litros (MESE; MATSUO, 2007).

Os componentes inorgânicos mais prevalentes na saliva são o sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cloreto (Cl^-) e carbonatos; enquanto os componentes orgânicos compreendem amilases, peroxidase, lipase, mucinas, lisozima, lactoferrinas, calicreínas, cistatinas, hormônios e fatores de crescimento (CHIAPPIN et al., 2007).

A saliva desempenha um papel importante em muitas funções biológicas, tais como a percepção das sensações orais, sabor, temperatura e toque; a lubrificação da cavidade oral; favorece a mastigação e a deglutição; e participa da digestão de carboidratos (alfa-amilase salivar) e lipídios (lipase lingual). Além disso, melhora a remineralização do esmalte dos dentes e previne a desmineralização, devido à sua capacidade de tamponamento (HICKS et al., 2003).

A composição salivar parece refletir a condição de saúde do indivíduo, assim seus elementos podem expressar tanto o estado de saúde como o de doença. Por esta razão, a saliva tem sido utilizada como ferramenta laboratorial para monitorar pacientes em diversas patologias bucais e sistêmicas. Um largo espectro de substâncias é encontrado na saliva, desde moléculas e íons de ocorrência natural, resultantes da atividade metabólica, hormonal, neurológica ou imunológica, até compostos introduzidos no organismo para fins terapêuticos ou recreativos (LEE et al., 2009).

O diagnóstico salivar torna-se promissor frente às várias abordagens diagnósticas tradicionais por ser menos invasivo, apresentar menos complicações metodológicas, consumir menos tempo, além de ser menos dispendioso. No entanto, a saliva prescinde ainda da padronização dos elementos de interesse clínico com valores de referência estáveis, da mesma forma como já ocorre com o soro, cujas substâncias testadas têm concentração maior que na saliva (APS; MARTENS, 2005).

Considera-se assim que a saliva é um fluido biológico complexo que contém uma variedade de hormônios, proteínas, enzimas, anticorpos, constituintes antimicrobianos e citocinas (MALATHI; MYTHILI; VASANTHI, 2014). Assim, a saliva torna-se um fluido clinicamente informativo e útil para abordagens de diagnóstico e prognóstico clínico.

Segundo o *National Institutes of Health* (NIH), um biomarcador é um indicador avaliado e quantificado, presente em mecanismos biológicos normais, estando presente também em processos patológicos ou através da resposta farmacológica a uma terapêutica instituída. Através destas, é possível obter informação sobre o estado fisiológico de um organismo vivo. Desta forma, os biomarcadores são considerados ferramentas valiosas na detecção, avaliação do risco, diagnóstico, prognóstico e monitorização de uma doença. Um biomarcador pode apresentar-se de diversas formas tais como anticorpos, microrganismos, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), lipídeos, metabólitos ou proteínas (YOSHIZAWA et al., 2013).

Neste sentido, a busca de potenciais biomarcadores em saliva tem se mostrado promissora para várias doenças incluindo o câncer, doenças auto-imunes, doenças virais, doenças bacterianas, doenças cardiovasculares, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e doenças metabólicas, permitindo que os doentes sejam monitorados e acompanhados (SEGAL; WONG, 2009; LEE; WONG, 2010; MALAMUD; ISAAC, 2012; MALATHI; MYTHILI; VASANTHI, 2014).

A maior parte dos estudos com saliva têm sido realizada em pacientes com câncer, e demonstram que os principais marcadores com utilidade clínica estão associadas à resposta inflamatória. Desta forma, a pesquisa de novos marcadores que possam ter sua presença ou níveis salivares associados ao diagnóstico ou evolução clínica de patologias, como reflexo das alterações sistêmicas é de extrema

importância para o seguimento destes pacientes (PORTO-MASCARENHAS et al., 2017).

Nesse sentido, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) caracteriza-se como um dos mediadores mais importantes da resposta inflamatória contra tumores, especialmente no câncer de mama. Apesar de ser conhecido pelo seu efeito antitumoral, o TNF- α pode atuar promovendo características de pior prognóstico no câncer de mama (MARTINEZ-REZA et al., 2017). Um estudo recente demonstrou a existência de TNF- α na saliva de mulheres portadoras de câncer de mama em conjunto com outras proteínas da resposta inflamatória crônica (STRECKFUS; BIGLER, 2016). Entretanto, não está claro se esta citocina está presente no fluido salivar devido à sua filtração a partir do sangue ou como consequência da possível síntese dentro das glândulas salivares ou na cavidade oral, bem como não se sabe se existe alguma correlação clínica entre os níveis de TNF- α circulantes, com os níveis salivares e parâmetros determinantes de prognóstico no câncer de mama.

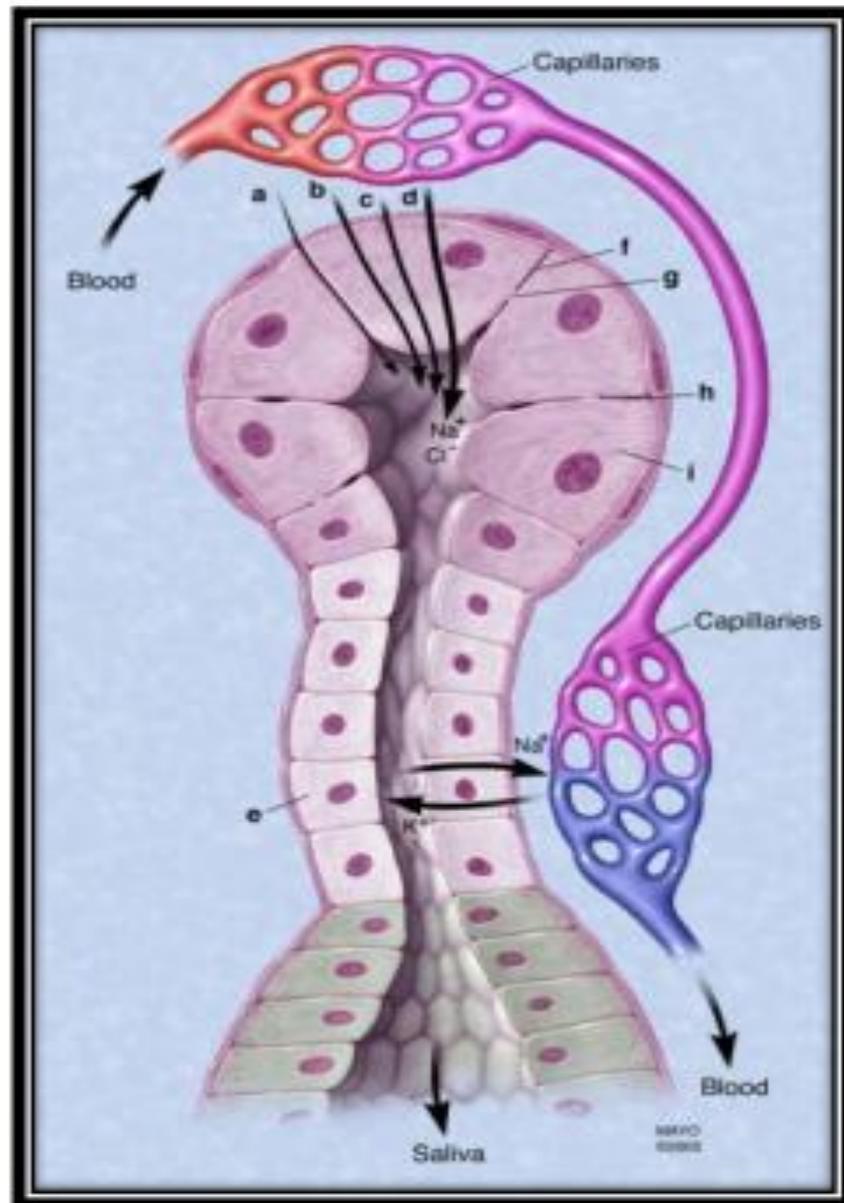
Diante desse contexto, propõe-se o estudo da fisiologia salivar, do uso da saliva como meio de diagnóstico de doenças, da plausibilidade teórica da adição de substâncias plasmáticas à saliva, e da relação do TNF salivar com o câncer de mama.

1.1 Fisiologia da saliva

Nos seres humanos, a secreção salivar é oriunda, em especial de três pares de glândulas salivares, denominadas de glândulas salivares maiores, sendo elas: glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais. Adicionalmente, aproximadamente 600 a 1000 glândulas salivares menores, localizadas na região labial, bucal, palatina, lingual e retromolar da mucosa oral contribuem para o volume de saliva final na cavidade oral (PEDERSEN et al., 2018).

As glândulas salivares são constituídas pela região do parênquima e do estroma. O parênquima é composto por unidades secretoras, denominados ácinos, os quais produzem a saliva. O estroma se conecta a um sistema de ductos os quais contribuem na modificação da constituição bioquímica salivar. Cada ácino é constituído de células serosas ou mucosas, e cada glândula salivar apresenta

proporções particulares desses tipos acinares, fator que influencia diretamente na composição das secreções (LIGTENBERG; VEERMAN, 2014).



A- Transporte Ativo. B- Difusão Passiva. C- Filtração Simples. D- Bombeamento ativo de Na^+ para dentro do ducto pelas células acinares. E- Bombeamento de Na^+ pelas células ductais de volta para o sangue. F- Membrana celular. G- Poro membranar. H- Espaço intracelular. I- Célula acinar.

Figura 1 – Composição acinar (YOSHIZAWA et al., 2013).

A contribuição das glândulas maiores para o volume total de saliva varia de acordo com o nível da estimulação. Em condições basais (sem estímulos), aproximadamente 25% do volume provém das glândulas parótidas, 60% das

glândulas submandibulares, 7 a 8% das glândulas sublinguais. Neste estado, cerca de 7 a 8% do volume de saliva é produzido pelas glândulas salivares menores. Durante o sono, a velocidade do fluxo é desprezível. Por sua vez, para a saliva altamente estimulada a contribuição das parótidas aumenta a, aproximadamente, 50%, as submandibulares contribuem com 35%, as sublinguais com 7 a 8%, enquanto outros 7 a 8% vêm das glândulas mucosas menores (EDGAR et al., 2010).

A saliva tem um componente aquoso representando 99% do volume e um componente proteico e aproximadamente 1% do volume. Deste modo, a saliva é composta por água, eletrólitos, α -amilase, lipase lingual, calicreína e muco. Quando comparado ao plasma, a saliva é hipotônica (tem a menor osmolaridade), tem maiores concentrações de K^+ e bicarbonato (HCO_3^-), e menores concentrações de Na^+ e Cl^- . A saliva é formada por duas etapas que envolvem diversos mecanismos de transporte existentes nos ácinos e ductos glandulares. A primeira etapa ocorre nas células acinares e envolve a formação de solução isotônica semelhante ao plasma em termos de osmolaridade. Deste modo, as células acinares secretam a saliva inicial, que é isotônica e têm a mesma composição eletrolítica do plasma, dessa forma, a osmolaridade e a concentração de Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- da saliva inicial são similares às do plasma. Posteriormente, as células ductais, modificam a saliva inicial, através de complexos os mecanismos de transporte. Resumidamente, nas membranas luminiais das células ductais existem três transportadores: o trocador cloro/bicarbonato (Cl^-/HCO_3^-) e o trocador hidrogênio/potássio (H^+/K^+). A membrana basolateral contém a $Na^+ -K^+$ ATPase e canais de Cl^- , a ação combinada desses transportadores, operando juntos, é a absorção de Na^+ e Cl^- e secreção de K^+ e HCO_3^- . Em consequência, a saliva liberada na cavidade oral é isotônica em relação ao plasma, tendo, portanto menores concentrações de NaCl e maiores concentrações de K^+ e HCO_3^- (COSTANZO, 2014).

A secreção salivar é regulada pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA), em seus ramos parassimpático e simpático. Entretanto, o Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) exerce mais notáveis efeitos sobre a secreção salivar, assim como, sobre a proliferação de ácinos e de ductos salivares. A inervação parassimpática das glândulas salivares é via nervo facial e nervo glossofaríngeo, sendo a atividade parassimpática aumentada por diversos estímulos, como: presença do alimento na cavidade oral e cheiro de alimentos; por outro lado, a

atividade parassimpática é reduzida pelo fobias, sonolência ou desidratação (PROCTOR; CARPENTER, 2007).

Por outro lado, os neurônios simpáticos pós-ganglionares liberam norepinefrina, que interage com receptores β -adrenérgicos nas células acinares e ductais; a estimulação simpática também ativa os receptores α -adrenérgicos nas células acinares embora a ativação dos receptores β -adrenérgicos seja considerada mais importante (COSTANZO, 2014).

A secreção salivar está sob controle do SNA e, portanto, regulada pelo SNS e SNP. Os impulsos que surgem da ativação dos quimiorreceptores nas papilas gustativas são transportados para os núcleos salivatórios na medula através dos nervos trigêmeo (V), facial (VII), glossofaríngeo (IX) e vagal (X), enquanto impulsos da ativação de mecanorreceptores no ligamento periodontal e tecido gengival são transportados pelo nervo trigêmeo. A ativação de nociceptores na mucosa oral, receptores no esôfago e estômago e através da olfação transferidos para o tronco cerebral, que podem provocar salivação, pode surgir de impulsos aferentes que são transmitidos para centros cerebrais superiores, que por sua vez, conduz impulsos aos núcleos salivatórios, que facilitam ou inibem a secreção salivar. Impulsos eferentes do núcleo sensorial ou centros cerebrais superiores são transmitidos para os centros salivares simpático e parassimpático no segmento torácico superior da medula espinhal e medula oblonga do tronco cerebral, respectivamente. O núcleo salivatório superior transmite secreção parassimpática, impulsos através do nervo facial para as glândulas submandibular e sublingual, enquanto o núcleo salivatório inferior transmite impulsos via nervo glossofaríngeo para as glândulas parótidas. Os impulsos simpáticos são transmitidos ao longo dos nervos simpáticos, que correm do tronco simpático, sinapse no gânglio cervical superior e liga os vasos sanguíneos para as glândulas salivares (GUYTON; HALL, 2006; PEDERSEN et al, 2018).

1.2 A saliva e o diagnóstico de doenças

Mesmo que outras amostras biológicas sejam obtidas de forma rotineira para diagnóstico, o sangue total ou plasma continuam a ser a fonte tradicionalmente mais frequente para obtenção de biomarcadores do estado de saúde dos pacientes. Em muitos casos, os procedimentos de coleta de sangue podem ser invasivos e traumáticos para os pacientes (YOSHIZAWA et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Neste

cenário, a padronização de testes laboratoriais em amostras menos convencionais e de fácil obtenção, como a saliva, parece uma alternativa viável.

A saliva possui vantagens quando comparada ao sangue, tais como:

I) A saliva é um fluido de “tempo-real”, indicando o estado fisiológico do paciente no momento da coleta, enquanto que as proteínas na circulação sanguínea podem sofrer alterações durante a passagem por diversos órgãos (BIGLER et al 2009);

II) A saliva pode ser coletada sem dificuldade, permitindo que o próprio paciente ou um indivíduo sem formação técnica ou qualificação consiga coletar a sua própria saliva (YOSHIZAWA et al., 2013);

III) Não é invasiva, enquanto que a coleta de sangue é um procedimento invasivo que pode causar dor ou desconforto aos pacientes, sendo por vezes complicado quando se faz necessário lidar com indivíduos pouco colaboradores, como pessoas com deficiências, recém-nascidos, crianças, idosos e hemofílicos. A coleta salivar é considerada um método pouco invasivo permitindo superar estas desvantagens, e possivelmente encorajar os pacientes a cumprir com a monitorização das suas doenças, podendo ser coletada repetidamente sem desconforto ao paciente em controles periódicos (BALAN et al., 2014);

IV) É segura, visto que a coleta de amostras de saliva confere segurança aos profissionais. A coleta de sangue torna-se mais arriscada em pacientes com hepatite e HIV, enquanto que a colheita de saliva não coloca o profissional em risco devido a fatores existentes na saliva que inibem a infecção por vírus como o HIV (ESSER et al., 2008);

V) Facilidade de armazenamento e transporte em comparação ao sangue, uma vez que a saliva possui a vantagem de não formar coágulos (SEGAL; WONG, 2008);

VI) Diagnóstico mais barato em comparação ao sangue, sendo mais econômico tanto para os doentes como para os profissionais de saúde, visto que é facilmente coletada, armazenada e transportada em temperatura ambiente até o início dos exames laboratoriais (YOSHIZAWA et al., 2013);

VII) A autorização do uso da saliva como amostra de diagnóstico é mais facilmente conseguido, por questões culturais, quando comparada a coleta do sangue, que por vezes, apresenta-se difícil ou desgastante (MALON et al. 2014).

Os componentes encontrados na saliva podem fornecer informações relevantes para o diagnóstico clínico. O fluxo salivar e a composição da saliva podem variar devido à influência de diversos fatores como sexo, idade, ritmo circadiano, estado emocional, doenças agudas, disfunção mastigatória, grau de hidratação do corpo, posição do corpo, dieta, má nutrição, ação de drogas, radioterapia, estímulo mecânico, gustatório e psicológico e duração do estímulo, e influências hormonais (BIRKHED, 1989).

Para a realização da coleta salivar, é importante que o paciente seja informado sobre o protocolo, da importância do tempo preciso para a coleta da amostra salivar, seja informado de que antes da coleta não pode escovar os dentes e deve evitar a ingestão de alimentos ou pastilhas elásticas durante 30 minutos, e por fim bochechar com água para evitar contaminação da saliva (CHIAPPIN et al., 2007; PTAFPE et al., 2011).

Apesar das vantagens mencionadas anteriormente, segundo Yoshizawa e colaboradores (2013), ainda são necessários mais estudos para comprovar o valor do diagnóstico salivar e potenciais biomarcadores, pois apesar de haver constituintes do sangue presentes na saliva, estes estão em baixas concentrações (SEGAL; WONG, 2009). Assim, a ideia da saliva se tornar uma amostra alternativa para o diagnóstico sanguíneo deve ser explorada, pois existe uma forte correlação entre a composição da saliva e os constituintes do sangue (YOSHIZAWA et al., 2013).

Mesmo com a aceitação científica sobre biomarcadores salivares para a detecção de doenças humanas, a ausência de uma lógica mecanicista em relação à comunicação entre o tumor distal e a cavidade oral compromete a credibilidade científica da saliva quanto à utilidade clínica. Atualmente, as microvesículas derivadas de tumores, denominadas de exossomos são de grande interesse para os pesquisadores, pois podem ser a chave para entender a comunicação entre o câncer e a cavidade oral, levando ao desenvolvimento de biomarcadores salivares específicos para tumores. Utilizando um modelo de câncer de pâncreas de roedores, demonstrou-se que os marcadores de RNA mensageiro (mRNA) específicos do tumor são eliminados das células tumorais pancreáticas, empacotadas no exossomo e transportadas para a glândula salivar (KACZOR-URBANOWICZ et al., 2017).

1.3 Importância da saliva como fonte de marcadores no câncer

A atividade imunológica sintetiza e libera uma infinidade de moléculas que agem local ou sistemicamente, de modo que a saliva contém compostos do sistema imunológico do sítio oral como de outros sítios distantes (OLIVEIRA; GUERRA, 2010)

Um largo espectro de substâncias é encontrado na saliva, desde moléculas e íons de ocorrência natural, resultantes da atividade metabólica, hormonal, neurológica ou imunológica, até compostos introduzidos no organismo para fins terapêuticos ou recreativos (LEE; WONG, 2009). Considera-se assim que a saliva é um fluido biológico complexo que contém uma variedade de hormônios, proteínas, enzimas, anticorpos, constituintes antimicrobianos e citocinas (MALATHI; MYTHILI; VASANTHI, 2014). Assim, a saliva torna-se um fluido clinicamente informativo e útil para abordagens de diagnóstico e prognóstico clínico.

O diagnóstico salivar torna-se promissor frente às várias abordagens diagnósticas tradicionais por ser menos invasivo, apresentar menos complicações metodológicas, consumir menos tempo, além de ser menos dispendioso. Neste sentido, a busca de potenciais biomarcadores em saliva tem se mostrado promissora para o diagnóstico de várias doenças incluindo o câncer, doenças auto imunes, doenças virais, doenças bacterianas, doenças cardiovasculares, HIV e doenças metabólicas, permitindo que os doentes sejam monitorizados e controlados (SEGAL; WONG, 2008; LEE; WONG, 2009). No que se refere ao diagnóstico de câncer, muitos marcadores biológicos já foram relatados na literatura ou atualmente estão em desenvolvimento, incluindo o uso de biomarcadores salivares (PATTON; EPSTEIN; KERR, 2008; LISA CHENG; WRIGHT, 2011). No entanto, a saliva prescinde ainda da padronização dos elementos de interesse clínico com valores de referência estáveis, da mesma forma como já ocorre com o soro, cujas substâncias testadas têm concentração maior que na saliva (APS; DELANGHE; MARTENS, 2002). Diversos artigos foram publicados sobre a base para o diagnóstico salivar, a história e evolução da pesquisa com análise proteômica e genômica para detecção de câncer (WU et al., 2010; ZHANG; SUN; WANG, 2012).

Até hoje, mais de 2.300 proteínas e peptídeos foram descritas na saliva humana (BANDHAKAVI et al., 2009). As proteínas mais abundantes em pacientes

saudáveis são: α -amilase, albumina, cistatinas, histatinas, imunoglobulina A (IgA), lactoferrina, mucinas, lisozimas, proteínas ricas em prolina, estatina e transferrina, as quais juntas respondem por mais de 98% das proteínas salivares totais (CHIAPPIN et al., 2007; MESSANA et al., 2008). Entretanto, no que se refere ao diagnóstico de câncer, as proteínas relatadas como possíveis biomarcadores salivares ainda constituem um grupo muito heterogêneo.

Nos últimos 5 anos vários marcadores da resposta inflamatória crônica tem sido investigados, com foco principal em pacientes portadores de câncer oral. A relação de mediadores da resposta imune, como as interleucinas (IL), com o câncer oral foi relatada no trabalho desenvolvido por Gleber-Netto e colaboradores (GLEBER-NETTO et al., 2016) e de Csősz e colaboradores (CSŐSZ et al., 2017). Gleber-Netto e colaboradores (2016) encontraram que as concentrações salivares de IL-8 ou IL-1 β estavam aumentadas em pacientes com Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO), quando comparado ao grupo controle. Do mesmo modo, mais estudos identificaram a IL-8 como potencial biomarcador para CCEO (KOROSTOFF et al., 2011). Por outro lado, Csősz e colaboradores (2017), ao investigarem a possível correlação de IL (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) com o CCEO, identificaram apenas a IL-6 em níveis elevados com diferença estatística significativa para o grupo controle.

Mediadores da inflamação como a proteína C reativa, proteínas C3 e C4, α -2-macroglobulina do sistema complemento, TNF- α , proteína 1 α inibitória do macrófago (MIP-1 α), IL-1 β são passíveis de serem encontrados na saliva (FINE et al., 2009). Desta forma, fica clara a necessidade de se estudar outros componentes da resposta inflamatória além destas IL, bem como expandir estes estudos para outros pacientes que possuam cânceres além do carcinoma oral.

Considerando que o perfil proteico salivar sofre modificações secundariamente à presença de um tumor distante da cavidade oral, pode fornecer informações sobre o processo metastático, que é a principal causa de morte para pacientes com câncer de mama (STRECKFUS; BIGLER, 2016). Para Porto-Macarenhas e colaboradores (2017), o padrão-ouro para rastreamento e diagnóstico do câncer de mama, mamografia e biópsia mamária, respectivamente, acarreta limitações como alto custo e morbidade, portanto, existe a necessidade de desenvolver novos procedimentos menos inconvenientes que garantam uma técnica que poderia ser usada em todos os estágios do câncer de mama, que envolve

triagem, diagnóstico, tratamento e monitoramento para previsão de metástase. Biomarcadores são projetados para objetivos variados, compreendendo diagnosticar, rastrear e prever doenças, bem como orientar as decisões individuais de tratamento. Existem cinco etapas distintas para conceituar o desenvolvimento de um biomarcador tumoral. São eles:

- Fase 1: Pré-clínico exploratório, com estudos que possuem o objetivo de identificar potenciais biomarcadores;
- Fase 2: Desenvolvimento de testes capazes de identificar/quantificar o biomarcador (genes ou proteínas) em amostras clínicas, testando sua especificidade e reprodutibilidade interlaboratorial;
- Fase 3: Estudo retrospectivo longitudinal, o qual possui o intuito de avaliar capacidade de correlação;
- Fase 4: Estudos prospectivos de triagem;
- Fase 5: Estudos de Controle, que visam avaliar impacto clínico (PORTO-MASCARENHAS et al., 2017).

Pode ser identificado e medido por um ou mais ensaios ou testes. Não há consenso sobre quais biomarcadores possuem o melhor valor diagnóstico, bem como que os ensaios constituem o tipo mais preciso de biomarcador (isto é, proteínas, ácidos nucleicos ou metabólitos), ou é o melhor método de detecção a ser usado. CA15-3 é uma grande glicoproteína transmembrana, que é frequentemente superexpressa, glicosilada de forma aberrante no câncer, e parece desempenhar um papel na adesão celular. É o marcador sérico mais utilizado para detectar câncer de mama recorrente e monitorar o tratamento de pacientes com doença avançada. Avaliando-se a associação entre soro e níveis de saliva de CA15-3 e os comparando entre mulheres com e sem câncer de mama descobriu-se que os níveis salivares séricos de CA15-3 foram significativamente maiores em pacientes com câncer de mama com correlação positiva significativa entre as concentrações séricas e salivares de CA15-3, permitindo potencial uso de CA15-3 salivar na detecção inicial do câncer de mama em mulheres (PORTO-MASCARENHAS et al., 2017).

1.4 Vias ou rotas para adição de substâncias do plasma para a saliva

Uma questão pertinente é como os tumores que estão distantes da cavidade oral podem influenciar os perfis de proteína salivar, nesta linha de questionamento, uma explicação para este evento é que os exossomos que são eliminados e escapam da quebra extracelular difundem-se por todo o corpo e aparecem em fluidos biológicos, como sangue, urina, sêmen, leite materno, aspirado de mamilo e efusões malignas. Por conseguinte, inicia-se a comunicação célula-a-célula mediada por exossomos através da fusão com as membranas de suas células alvo. Ao entrar no citoplasma celular, seu conteúdo é liberado e ativa eventos a jusante em células receptoras. É também possível que as proteases extracelulares degradem os exossomos e seus conteúdos se tornem ligantes solúveis que se ligam aos receptores da superfície celular (STRECKFUS; BIGLER, 2016).

Os exossomos são vesículas de membranas nanométricas liberadas por uma variedade de tipos de células, e acredita-se que desempenhem papéis importantes nas comunicações intercelulares. No câncer de mama, através da transferência horizontal de várias moléculas bioativas, tais como proteínas e mRNAs, estas vesículas estão emergindo como mediadores locais e sistêmicos de célula para célula da informação oncogênica e desempenham um papel importante na progressão do câncer. Os exossomos são vesículas de membrana de origem endocítica, que se formam a partir de brotamento interno da membrana de corpos multivesiculares (MVB) e liberados da célula para o ambiente extracelular com a membrana plasmática (JIA et al., 2017).

Os exossomos também exercem um mecanismo de retroalimentação que regula a liberação da mama normal, o que significa que exossomos liberados de células de câncer de mama e células epiteliais mamárias humanas normais são regulados por exossomos derivados de suas próprias células (RICHES et al., 2014). Outras investigações revelaram que os exossomos são internalizados via fagocitose ou domínios lipídicos (CALZOLARI et al, 2006; FENG et al., 2010). Em células de tumor de mama, o descolamento de células é um estímulo intenso para a secreção de exossomos (KOUANGOYE, 2011).

Espera-se que os exossomos também contribuam para a comunicação célula-célula, ativando-os diretamente por ligantes expressos na superfície ou transmitindo moléculas sinalizadoras entre as células. Para ser específico, os

exossomos interagem com células-alvo por meio de receptores, endocitose, fusão com membrana plasmática ou liberação de sua carga (OGOREVC et al., 2013; LEE et al., 2014).

No câncer de mama, além de participar da transformação maligna inicial, os exossomos podem transferir moléculas sinalizadoras para as células cancerosas dentro do microambiente tumoral e ajudar as células tumorais a evitar a resposta imune, promover a invasão e metástase do tumor, remodelar o microambiente tumoral e estimular a angiogênese (JIA et al., 2017).

O RNA funcional do paciente foi detectado em exossomos de todos os três fluidos corporais humanos: a saliva, o plasma e o leite. O resultado amplia a caracterização de exossomos em humanos saudáveis e confirma a presença de RNA em exossomos na saliva humana, bem como, relata pela primeira vez a presença de RNA em exossomos de leite materno. Os resultados, deste estudo, mostram que os exossomos de saliva e leite materno podem ser absorvidos por macrófagos humanos, apoiando a noção de que o RNA exossômico pode ser transportado entre as células, fornecendo sinais genéticos funcionais para outras células. Os exossomos em saliva, plasma e leite materno contêm RNA, confirmando achados anteriores, que exossomos podem entregar o seu RNA para células receptoras (LASSER et al., 2011).

Segundo Zhang e Grizzle (2011), os fibroblastos de pacientes com artrite reumatóide produzem exossomos contendo TNF- α , que podem matar células sensíveis ao TNF- α e induzir nas células T a fosforilação de Akt e aumentar o fator nuclear κ B (NF κ B), afetando potencialmente a gravidade da artrite reumatóide. Os exossomos também estão envolvidos em outras doenças, incluindo inflamação do fígado, causada por dietas gordurosas, e diabetes *mellitus* tipo 2. Os tumores relatados para liberar exossomos incluem câncer de mama, cavidade oral, colorretal, cérebro, ovário, bexiga, próstata e melanomas. Os exossomos funcionam como uma via de comunicação intercelular recentemente descrita, que pode ser um fator importante na supressão da vigilância imune em pacientes com tumores específicos. Além disso, os exossomos provavelmente estão envolvidos na resistência de alguns tumores a vários agentes quimioterapêuticos. Assim, a liberação de exossomos de tumores ou exossomos em circulação podem ser novos alvos para terapia. Além disso, os exossomos podem representar um veículo para entrega seletiva a tumores, pequenas moléculas terapêuticas ou agentes para

terapia genética, assim como, as moléculas nos exossomos podem servir como biomarcadores para a detecção e o diagnóstico precoce de doenças, para determinar o prognóstico e para prever a eficácia terapêutica por meio de um padrão molecular de exossomos.

Para Jang e colaboradores (2013), um corpo crescente de evidências indica que os exossomos desempenham um papel central na comunicação célula a célula e, em particular, as células tumorais liberam grandes quantidades de exossomos. A concentração de exossomos circulantes é maior no soro ou plasma de pacientes com câncer e prediz um prognóstico ruim. A liberação de exossomos pode proteger as células tumorais da apoptose por extrusão seletiva de proteínas indutoras de apoptose. Além disso, os exossomos podem ajudar as células tumorais a escapar da vigilância imunológica e realizar sinais pró-angiogênicos que aumentam a vascularização do tumor; bem como podem transferir informações genéticas, como microRNAs (miRNAs) das células tumorais para as células vizinhas.

Os macrófagos povoam o microambiente da maioria dos tumores, em certos casos, essas células podem representar mais da metade da massa tumoral e desempenhar um papel importante na imunidade tumoral, o que é particularmente verdadeiro para o câncer de mama. Estudos clínicos procuraram correlacionar a densidade de macrófagos e o prognóstico do câncer. Uma metanálise mostrou que, em 80% dos casos, o aumento da densidade de macrófagos estava associado a um mau prognóstico e que, nos 20% restantes, havia uma divisão entre valor prognóstico nulo e bom valor prognóstico (LÄSSER et al., 2011).

O transporte através da membrana celular pode ser dividido em ativo, passivo e tipos vesiculares (exossomos), que são vesículas de tamanho nano liberadas por uma variedade de células. Evidências emergentes mostram que os exossomos desempenham um papel crítico nos cânceres, visto que mediam a comunicação entre estroma e células cancerígenas através da transferência de ácido nucleico e proteínas. Está demonstrado que o conteúdo e a quantidade de exossomos sofrerão alterações após a ocorrência de cânceres. Durante a última década, foi dada crescente atenção ao papel dos exossomos no desenvolvimento do câncer de mama, o câncer com maior risco de vida em mulheres, visto que pode induzir glândulas salivares a produzir exossomos específicos, que poderiam ser usados como biomarcadores no diagnóstico de câncer de mama precoce. O ácido nucleico e as proteínas entregues aos exossomos facilitam parcialmente a tumorigênese,

metástase e resistência ao câncer de mama. Os exossomos também podem transmitir medicamentos anticâncer células externas ao câncer de mama, levando, portanto, à resistência aos medicamentos. Entretanto, os exossomos são ferramentas eficazes para o transporte de medicamentos anticâncer com menor imunogenicidade e toxicidade, evidenciando que esta é uma maneira promissora de estabelecer uma entrega de medicamentos no sistema (YU et al., 2015).

1.5 TNF salivar e sua relação com o câncer de mama

O TNF- α é um mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias e outros microrganismos infecciosos, que recebe essa denominação para ser distinguido do Fator de Necrose Tumoral Beta (TNF- β) intimamente relacionado, sendo também denominado linfo toxina. O TNF- α é produzido por macrófagos, células dendríticas e outros tipos celulares. Em macrófagos, ele é sintetizado como uma proteína de membrana não glicosilada do tipo II e é expresso como um homotrímero, que é capaz de se ligar a uma forma do receptor do TNF- α (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O TNF- α é uma citocina que pertence a superfamília TNF consistindo de 19 proteínas, apresentando várias funções biológicas, como fornecer sinais para ativação, diferenciação, sobrevivência e morte celular (MARTINEZ-REZA et al., 2017). E modula a resposta imune e a inflamação em vários tecidos e órgãos (DESPLAT-JEGO; BURKLY; PUTTERMAN, 2014).

Segundo Parameswaran e Patial (2010) o TNF- α é uma citocina pleiotrópica produzida por muitos tipos diferentes de células no corpo. No entanto, as células da linhagem monocítica como macrófagos, astroglia, microglia, células de Langerhans, células de Kupffer e macrófagos alveolares são os sintetizadores primários do TNF- α , que age através de receptores transmembranares, tais como o receptor de TNF 1 (TNFR1), também conhecido como p55 ou p60 e TNF receptor 2 (TNFR2), também conhecido como p75 ou p80.

A produção de TNF- α pelos macrófagos é estimulada pelos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs), Receptores Semelhantes a Toll (TLRs), Domínio de Oligomerização Ligante de Nucleotídeo (NLRs) e RLRs podem induzir a expressão

do gene do TNF- α , em parte pela ativação do fator de transcrição NF- κ B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A habilidade desta citocina em causar necrose de tumores, que é a base do seu nome, é principalmente resultado da trombose dos vasos sanguíneos tumorais. O TNF- α tem um importante implicação no curso do desenvolvimento do câncer de mama, que pode ser o resultado de sua capacidade de regular a sinalização das vias envolvidas na regulação da expressão gênica, de modo que o TNF- α está presente em tecido tumoral de pacientes com câncer de mama. (BIGLER; STRECKFUS, 2004; WU et al., 2003).

O TNF- α foi clonado há mais de 2 décadas e sua identificação levou em parte à descoberta de uma superfamília de fatores de necrose tumoral (TNFs) e seus receptores. Sinais TNF- α agem através de dois receptores transmembrana, TNFR1 e TNFR2, e regulam um número de funções celulares críticas, incluindo proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e apoptose. Os macrófagos são os principais produtores de TNF- α e curiosamente, também são altamente responsivos ao TNF- α . A produção aberrante de TNF α e a sinalização do receptor de TNF foram associadas à patogênese de várias doenças, incluindo artrite reumatóide, doença de Crohn, aterosclerose, psoríase, sepse, diabetes e obesidade. Demonstrou-se que o TNF α desempenha um papel crucial na orquestração da citocina cascata em muitas doenças inflamatórias e por causa deste papel como um "mestre-regulador" da produção de citocina inflamatória, foi proposto como um alvo terapêutico para uma série de doenças. De fato, as drogas anti-TNF α são agora licenciadas para o tratamento de certas doenças inflamatórias, incluindo artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal. Discute-se a descoberta do TNF α e suas ações especialmente na regulação da biologia de macrófagos. Dado sua importância em várias doenças humanas. (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010).

O câncer de mama distal se comunica com as glândulas salivares por meio da secreção de exossomos. Além disso, os biomarcadores salivares resultam, em parte, das proteínas e do mRNA entregues por exossomos derivados do câncer de mama (exo-BCa). O monitoramento do mRNA e a expressão proteica de biomarcadores salivares entre pessoas com alto risco de câncer de mama serve como uma nova forma eficiente de detecção do câncer de mama (LAU et al., 2013).

Os exo-BCa podem interagir com células glandulares salivares para alterar a composição dos exossomos secretados transcriptomicamente e proteomicamente (LAU; WONG, 2012).

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em mulheres e um problema de saúde pública em todo o mundo, é muitas vezes acompanhado por um processo inflamatório caracterizado pela presença de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- α , que tem importantes implicações no curso da doença. A inflamação tem sido descrita como um ambiente favorável para o desenvolvimento de tumores, embora a aplicação clínica do TNF- α tenha sido limitada pela sua toxicidade e efeitos secundários, e estudos clínicos mostraram que estes efeitos podem ser parcialmente evitados através de estratégias de entrega dirigidas ao tumor. Desta forma, o TNF- α isolado ou combinado com quimioterapia e radioterapia pode funcionar como um adjuvante no tratamento do câncer de mama (MARTINEZ-REZA et al., 2017).

Enquanto no soro de mulheres saudáveis, o TNF- α geralmente não é detectado, estudos clínicos relataram altos níveis de esta citocina em pacientes com câncer de mama. Da mesma forma, altos níveis de expressão de TNF- α foram encontrados em tumores primários de câncer de mama, níveis mais baixos em hiperplasias e níveis indetectáveis em tecido mamário normal. A este respeito, o câncer de mama é uma doença complexa com diferentes estágios e assinaturas moleculares, tornando difícil entender o papel do TNF- α nessa patologia. Até à data, não se sabe se a origem do TNF- α em torno do tumor é produzido e liberado células pelo câncer como uma estratégia de evasão para a resposta imune do hospedeiro ou se é secretado pelas células do sistema imunológico a fim de impulsionar a resposta imune do hospedeiro para parar as células do tumor de crescer e, eventualmente, eliminar o tumor (MARTINEZ-REZA et al., 2017).

Este trabalho teve como objetivo investigar os níveis de TNF- α na saliva, verificar sua correlação com os níveis sistêmicos, bem como, entender se existe associação com os parâmetros clínico-patológicos que são determinantes do prognóstico do câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a relação entre as concentrações plasmáticas e salivares do Fator Tumoral de Necrose alfa (TNF- α) e os aspectos clinico-patológicos de pacientes com câncer de mama.

2.2 Específicos

- Comparar o perfil antropométrico de mulheres com câncer de mama e mulheres sem câncer de mama (Controles).
- Estabelecer as concentrações plasmáticas e salivares de TNF- α em mulheres sem câncer de mama (Controles) e com câncer de mama;
- Avaliar se há relação entre concentrações plasmáticas de TNF- α e as concentrações salivares em pacientes sem câncer de mama (Controles) e com Câncer de Mama.
- Investigar se o peso corporal, idade, estatura e IMC em mulheres com câncer de mama podem ter correlação com as concentrações salivares ou plasmáticas de TNF- α .
- Correlacionar os parâmetros clínico-patológicos, em especial biomarcadores de tumor, das pacientes com câncer de mama com os níveis de TNF- α ou sanguíneos.

3. METODOLOGIA

3.1 Tipo de Estudo e Delineamento Experimental

Trata-se de um estudo piloto exploratório, cujo projeto encontra-se aprovado no Comitê de Ética Institucional (parecer 810.501). Todas as mulheres assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Anexo: CAAE 35524814.4.0000.0107.

3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Inicialmente foram incluídas no estudo 82 mulheres com suspeitas para neoplasia mamária (BIRADIS IV ou V) atendidas na rede pública no âmbito da 8ª Regional de Saúde do Paraná e encaminhadas ao Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc) entre novembro de 2017 a outubro de 2018. As suspeitas de neoplasias eram baseadas em imagens de mamografia ou ultrassom, sendo posteriormente submetidas a biópsia. Após realização de biópsia, 20 mulheres confirmaram o diagnóstico de câncer de mama e 29 eram portadoras de condições benignas mamárias (cistos epiteliais, corpo estranho, granuloma, nódulos benignos e fibroadenoma), totalizando 49 pacientes que tinham amostras pareadas de saliva e sangue periférico. Foram excluídas aquelas sem pareamento (n=33). Posteriormente, mulheres sem diagnóstico de câncer foram categorizadas como grupo Controle, e as demais como grupo câncer de mama. O delineamento experimental do estudo está esquematizado na Figura 2.

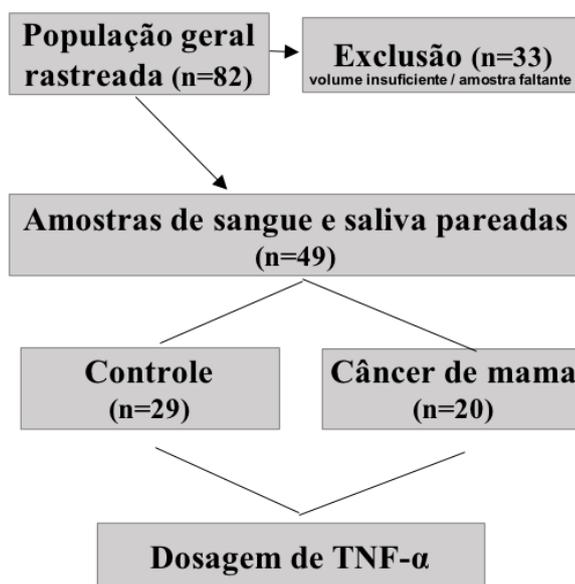


Figura 2. Desenho do estudo.

3.3 Obtenção das amostras e dosagem de TNF- α

Todas as pacientes estavam em jejum prévio de aproximadamente 12h, sendo as coletas realizadas entre às 8 e 10 horas da manhã. As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa e transferidas para tubos heparinizados (10 mililitros-mL). Os tubos das pacientes que encontravam-se em jejum pré-operatório foram encaminhados ao Laboratório de Biologia de Tumores da Unioeste para centrifugação (4000rpm por 5 minutos) e obtenção do plasma para armazenamento a -20°C. A saliva foi obtida por eliminação espontânea, antes da coleta de sangue, em volumes variáveis (0,2 a 2 mL) em microtubos e armazenada a -20°C até o momento das análises.

A dosagem de TNF- α (salivar e plasmáticas) foi realizada utilizando-se kit comercial de enzimaensaio sanduíche humano (eBioscience, USA, lote E12414-1630) seguindo a recomendação do fabricante. Brevemente, as alíquotas de saliva ou sangue (100 microlitros - μ L) foram incubadas em placa sensibilizada com anticorpo de captura anti-TNF- α por 4 horas, lavadas e incubadas com anticorpo de detecção marcado com peroxidase por 2 horas. Após adição de substrato, as reações foram lidas a 450 nanômetros (nm) em leitora de microplacas (Celler, Brasil). Uma curva padrão foi utilizada como referência para cálculo. Os resultados foram expressos em picograma por mililitro (pg/mL).

Observa-se a linearidade entre as duas metodologias, com um desvio proporcional significativo (Intercepto A=-26961,6790 to 722,5718; Inclinação B=7,1200 to 83,5942; p=0,01), mas com correlação baixa entre as variáveis (r=-0,157, p=0,28). Contudo, na análise de Bland & Altman, o resultado observado mostrou não haver viés na amostra, com valor da média resultante das diferenças entre os resultados pareados das metodologias igual a 2781,2, com valor da diferença dentro do intervalo de tolerância – ou seja, dentro do limite da média mais dois desvios-padrão –, sendo considerada uma amostra não viciada (Figura 6).

Por meio do método de regressão de Passing & Bablok foi possível definir uma equação de regressão, que demonstra a relação entre as duas variáveis, conforme apresentado na equação 1:

$$\text{Eq.1) TNF salivar} = -3008,200699 + 18,636406 * \text{TNF sanguínea.}$$

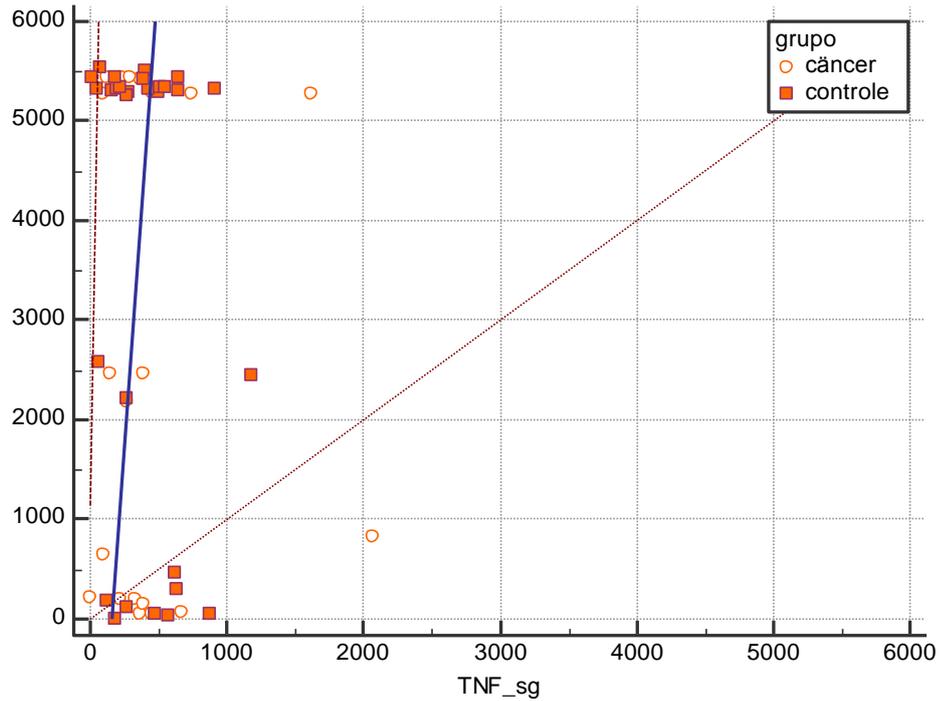


Figura 3. Retas de regressão demonstrando a linearidade das duas metodologias para avaliação de TNF (Saliva e Sangue Total) com desvio da linearidade apresentando valor de $p=0,01$ (Técnica de Passing-Bablok).

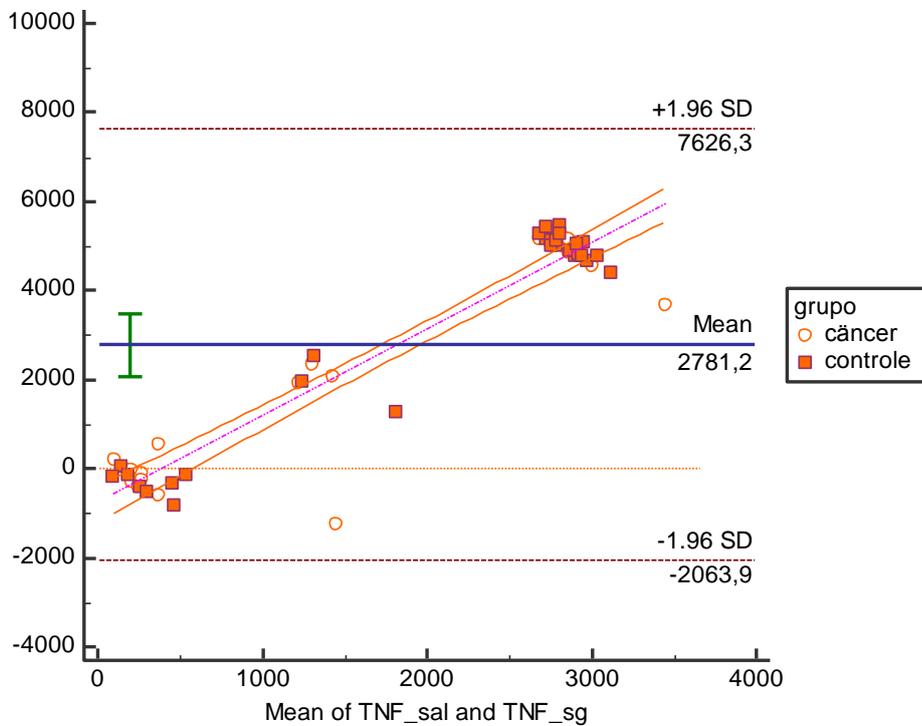


Figura 4. Diagrama de Band-Altman demonstrativo da concordância entre os métodos com saliva e sangue total, com 95% de intervalo de confiança.

3.4 Prontuário Médico

Dados sociodemográficos e Clínico-Patológicos foram obtidos através de consulta aos registros dos prontuários médicos de cada paciente, sendo coletado valores das variáveis: idade ao diagnóstico (anos), peso (quilogramas - Kg), altura (metros - m). Com dados de altura e peso foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC) e categorizado conforme recomendação da OMS (1998). Adicionalmente, foram anotadas variáveis clínico-patológicas: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER), índice de proliferação (KI67%). Também foram registrados o subtipo molecular, o grau de agressividade, o grau histológico e a presença de êmbolos angiolímfáticos.

3.5 Análise Estatística

Foi realizada a descrição do perfil dos 49 indivíduos participantes deste estudo. Para o grupo controle foram consideradas as variáveis antropométricas: peso corporal, estatura e IMC, enquanto que para o grupo de pacientes com câncer foram consideradas as variáveis: idade ao diagnóstico, peso corporal, estatura e IMC. Correlação linear de Pearson's foi feita para avaliar a relação entre as variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e valores salivares e plasmáticos de TNF- α . Correlação linear de similaridade foi aplicada entre os valores plasmáticos e salivares de TNF- α e as variáveis clínico-patológicas: RE, PR, HER, KI67%, subtipo molecular, agressividade e grau histológico. Por fim, os valores de TNF- α plasmáticos e salivares foram comparados entre os pacientes com câncer. Nesse grupo, as pacientes foram comparados quanto a presença ou ausência de embolos angiolímfáticos e quanto a agressividade da doença, segundo o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Em todos os testes estatísticos o nível de significância utilizado foi de 0.05, sendo realizados com os programas computacionais XLSTAT® (ADDINSOFT, 2017) e R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019).

4. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2008.

ADDINSOFT: Xlstat supplement. Versão 19.4 para Excel 2010. Reino Unido: Addinsoft 2017.

APS, J.K.M.; DELANGHE, J.; MARTENS, L.C. Salivary electrolyte concentrations are associated with cystic fibrosis transmembrane regulator genotypes. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v.40, n.4, p.345-350, 2002.

APS, J.K.M.; MARTENS, L.C. The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**, v.150, n. 2-3, p. 119-131, 2005.

BALAN, P. et al. Can saliva offer an advantage in monitoring of diabetes mellitus? – A case control study. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v.6, n.4, p.335, 2014.

BANDHAKAVI, S. et al. A dynamic range compression and three-dimensional peptide fractionation analysis platform expands proteome coverage and the diagnostic potential of whole saliva. **Journal of proteome research**, v.8, n.12, p.5590-5600, 2009.

BIGLER, L.; STRECKFUS, C. Unique protein screening analysis of stimulated whole saliva from healthy individuals and breast cancer patients. **Preclinica**, v.2, p.52-56, 2004.

BIGLER, L.R.; STRECKFUS, C.F.; DUBINSKY, W.P. Salivary biomarkers for the detection of malignant tumors that are remote from the oral cavity. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.29, n.1, p.71-85, 2009.

BIRKHED, D. Salivary secretion rate, buffer capacity, and pH, in Human Saliva. **Clinical Chemistry and Microbiology**, v.1, p.50-52, 1989.

CALZOLARI, A. et al. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. **Journal of cell science**, v.119, n.21, p.4486-4498, 2006.

CHIAPPIN, S. et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica chimica acta**, v.383, n.1-2, p.30-40, 2007.

COSTANZO, L.S. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

CSŐSZ, É. et al. Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers. **PloS One**, v.12, n.5, p.e0177282, 2017.

DONEPUDI, M.S. et al. Breast cancer statistics and markers. **Journal of cancer research and therapeutics**, v.10, n.3, p.506, 2014.

DESPLAT-JEGO, S.; BURKLY, L.; PUTTERMAN, C. Targeting TNF and Its Family Members in Autoimmune/Inflammatory Disease. **Mediators of Inflammation**, v.2014, p.1-2, 2014.

EDGAR, W.M.; O'MULLANE, D.M.; DAWES, C. **Saliva and oral health**. London: British Dental Association, 2004.

ESSER, D. et al. Sample stability and protein composition of saliva: implications for its use as a diagnostic fluid. **Biomarker Insights**, v 3, p.607, 2008.

FENG, D. et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. **Traffic**, v.11, n.5, p.675-687, 2010.

FINE, D.H. et al. Macrophage inflammatory protein-1 α : a salivary biomarker of bone loss in a longitudinal cohort study of children at risk for aggressive periodontal disease? **Journal of periodontology**, v.80, n.1, p.106-113, 2009.

GARCÍA-GODOY, F.; HICKS, M. J. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. **The Journal of the American Dental Association**, v.139, p.25-34, 2008.

GLEBER-NETTO, F.O. et al. Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma in a Taiwanese population. **Clinical Cancer Research**, v.22, n.13, p.3340-3347, 2016.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006.

HICKS, J. et al. Fluoride-releasing restorative materials and secondary caries. **CDA**, v.31, n.3, p.229-246, 2003.

JANG, J. et al. Exosome derived from epigallocatechin gallate treated breast cancer cells suppresses tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage infiltration and M2 polarization. **BMC Cancer**, v.13, n.1, p.421, 2013.

JIA, Y. et al. Exosome: biomarcador emergente em câncer de mama. **Oncotarget**, v.8, n.25, p.41717-41733, 2017.

KACZOR-URBANOWICZ, K.E. et al. Saliva diagnostics—Current views and directions. **Experimental Biology and Medicine**, v.242, n.5, p.459-472, 2017.

KOROSTOFF, A. et al. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. **Oral oncology**, v.47, n.4, p.282-287, 2011.

KOUMANGOYE, R.B. et al. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. **PLoS One**, v.6, n.9, p.24234, 2011.

LÄSSER, C. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. **Journal of Translational Medicine**, v.9, n.1, p.9, 2011.

LAU, C. et al. Role of pancreatic cancer-derived exosomes in salivary biomarker development. **Journal of Biological Chemistry**, v.288, n.37, p.26888-26897, 2013.

LAU, C.S.; WONG, D.T.W. Breast cancer exosome-like microvesicles and salivary gland cells interplay alters salivary gland cell-derived exosome-like microvesicles in vitro. **PloS One**, v.7, n.3, p.33037, 2012.

LEE, J.K. et al. Extracellular vesicles as an emerging paradigm of cell-to-cell communication in stem cell biology. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, v.4, n.206, p.2, 2014.

LEE, Y.; WONG, D.T. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. **American journal of dentistry**, v.22, n.4, p. 241, 2009.

LISA CHENG, Y.; WRIGHT, J. Advances in diagnostic adjuncts for oral squamous cell carcinoma. **The open pathology Journal**, v.5, n.1, 2011.

LIGTENBERG, A.J.M.; VEERMAN, E.C.I. Saliva secretion and functions. **Monographs in Oral Science**, v.24 n.1, p. 14-24, 2014.

LIU, J.; DUAN, Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. **Oral oncology**, v.48, n.7, p.569-577, 2012.

MALATHI, N.; MYTHILI, S.; VASANTHI, H.R. Salivary diagnostics: a brief review. **ISRN dentistry**, v. 2014, 2014.

MALI, S.B. Proteomics for oral cancer. **Oral Oncology**, v.50, n.11, p.67, 2014.

MALON, R.S.P. et al. Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

MARTÍNEZ-REZA, I.; DÍAZ, L.; GARCÍA-BECERRA, R. Preclinical and clinical aspects of TNF- α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer. **Journal of Biomedical Science**, v.24, n.1, p.90, 2017.

MESSANA, I. et al. Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us? **Journal of separation science**, v.31, n.11, p.1948-1963, 2008.

MESE, H.; MATSUO, R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. **Journal of oral rehabilitation**, v.34, n.10, p.711-723, 2007.

OGOREVC, E.; KRALJ-IGLIC, V.; VERANIC, P. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation. **Radiology and oncology**, v.47, n.3, p.197-205, 2013.

OKUMURA, Y. et al. Change in estrogen receptor, HER2, and Ki-67 status between primary breast cancer and ipsilateral breast cancer tumor recurrence. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v.41, n.4, p.548-552, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, J.J.; GUERRA, R. N. M. Biomarcadores imunológicos da saliva. **Revista de Ciências da Saúde**, p.136, 2010.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 20, n.2, 2010.

PATTON, L.L.; EPSTEIN, J.B.; KERR, A. R. Adjunctive techniques for oral cancer examination and lesion diagnosis: a systematic review of the literature. **The Journal of the American Dental Association**, v.139, n.7, p.896-905, 2008.

PEDERSEN, A.M.L. et al. Salivary secretion in health and disease. **Journal of oral rehabilitation**, v.45, n.9, p.730-746, 2018.

PFÄFFE, T. et al. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. **Clinical Chemistry**, v.57, n.5, p.675-687, 2011.

PORTO-MASCARENHAS, E. C. et al. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.110, p.62-73, 2017.

PROCTOR, G.B.; CARPENTER, G.H. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. **Autonomic Neuroscience**. v. 30 n.133, p.3-18. 2007

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing** R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 15 out. 2019.

RICHES, A. et al. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells—a new regulatory pathway. **European journal of cancer**, v.50, n.5, p.1025-1034, 2014.

ROSS, J.S. et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. **The Oncologist**, v.8, n.4, p.307-325, 2003.

SEGAL, A.; WONG, D.T. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. **European journal of dental education: official journal of the Association for Dental Education in Europe**, v.12, n.1, p.22, 2008.

STRECKFUS, C.F.; BIGLER, L. A catalogue of altered salivary proteins secondary to invasive ductal carcinoma: a novel in vivo paradigm to assess breast cancer progression. **Scientific Reports**, v.6, p.30800, 2016.

WU, J. et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.46, n.4, p.226-231, 2010.

WU, S. et al. An approach to the proteomic analysis of a breast cancer cell line (SKBR-3). **Proteomics**, v.3, n.6, p.1037-1046, 2003.

YOSHIZAWA, J.M. et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.4, p.781-791, 2013.

YU, D. et al. Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer. **Cancer Science**, v.106, n.8, p.959-964, 2015.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, X. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.168, n.6, p.1718-1727, 2012.

ZHANG, H.; GRIZZLE, W.E. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. **Clinical Cancer Research**, v.17, n.5, p.959-964, 2011.

ZHANG, L. et al. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. **PloS One**, v.5, n.12, p.15573, 2010.

ZHANG, Y. et al. The emerging landscape of salivary diagnostics. **Oral Health and Dental Management**, v.13, n.2, p.200-210, 2014.

Este artigo foi submetido a revista *Brazilian Oral Research* – BOR no formato de Resumo de Pesquisa Original (*Short Communication*).

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Title:

Salivary TNF- α in breast cancer: clinical-pathological correlations

Marcelo Marcos Opolski¹, Vitor Teixeira Maito¹, Aedra Carla Bufalo Kawassaki¹, Janaína Carla da Silva¹, Rodrigo Kern¹, Daniel Rech¹, Carolina Panis¹ and Sabrina Grassioli².

¹ State University of Western Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil.

² State University of Western Paraná, Cascavel, Paraná, Brazil.

Correspondent Author:

Marcelo Marcos Opolski

E-mail: marceloopolski@hotmail.com

Abstract: Herein, we evaluated the salivary and plasmatic levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in women diagnosed with breast cancer (BC; n=20) versus women with benign breast (Control; n=29) conditions and correlated TNF- α findings with BC clinical-pathological parameters. TNF- α was higher in saliva samples from both groups when comparing to plasma levels. BC and Control patients have similar plasmatic and salivar values of TNF- α . Salivar and plasmatic values of TNF- α were no correlated with tumor biomarkers (Estrogen Receptor; Progestogen Receptor; Ki67 and HER2) indicating that its measures are no adequate biomarkers to evaluate disease prognosis in BC.

Descriptors: breast cancer, TNF- α , saliva, plasma

Introduction

Breast cancer (BC) is mostly commonly occurring cancer in women.¹ The saliva could be an alternative biological fluid in the non-invasive diagnostics or prognostics to patients with BC.^{2,3} Unstimulated saliva from women with BC present changes in the pH, oxidative agents and cytokines concentrations.⁴ The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is an important cytokine in BC and high levels of TNF- α are correlated with increased risk of mortality in cancer patients. Moreover, the increased salivary concentrations of TNF- α seems to reflect its local production in cancer tissue.⁶ Thus, in the present study we compared the plasmatic and salivary levels of TNF- α between women with benign breast conditions and women with BC and related plasmatic and salivary levels of TNF- α in BC patients with anthropometric and clinical-pathological parameters associated with disease prognosis of BC.

Methodology

This is an exploratory pilot study, approved by the Institutional Ethics Committee (number: 810.501). All women signed a Free and Informed Consent Form (CAAE 35524814.4.0000.0107). From November 2017 to October 2018 82 women with suspected of BC (BIRADIS IV or V) were attended in the specialized cancer Center Hospital in south Brazilian region. Suspected neoplasms were based on mammography or ultrasound images and were subsequently submitted to biopsy. After biopsy, 20 women confirmed the diagnosis of BC (BC group) and 29 had benign breast conditions (Control group). Women with insufficient amount of saliva were excluded (n=33). From the medical records were collected at the time of diagnosis: age (years), body weight (Kg), height (m) and Body Mass Index (BMI) besides clinical-pathological variables (estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), proliferation index (KI67%), molecular subtype, histological grade and the presence of angiolymphatic embolus). All patients were undergoing operative fasting and samples were collected at the same period of the day (between 11 am to 16 pm). The peripheral blood collection was done by venipuncture, the samples were transferred to heparinized tubes and the plasma was stored at -20°C. The saliva was obtained by spontaneous elimination, being stored at -20°. The saliva and plasma aliquots were subjected to TNF- α measurement by enzyme immunoassay using a commercial human sandwich kit

(eBioscience, USA, E12414-1630) following the manufacturer's recommendation. The reactions were read at 450 nanometers (nm) in a microplate reader (Celler, Brazil) and results expressed in picogram per milliliter (pg / mL).

Statistical analysis

Data were submitted to t test or Mann-Whitney-U non-parametric test according previous analysis of normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (Test F). Linear Pearson´s correlation was applied to evaluate relationships between, age, anthropometric variables (body weight, height and BMI); tumor biomarkers (RE; PR; HER2, KI67%), molecular subtype and histological grade with plasmatic and salivary TNF- α values. All tests were performed using the R (R Core Team, 2019) with $p < 0.05$.

Results

The women in BC group presented higher age in relation those in Control group without differences in body weight, height and BMI (Table 1).

Table 1. Age, Body Weight, Height and BMI in e Control and BC women patients.

	Control (n=29)	BC (n=20)	p-value
Age (years)	32.6 \pm 2.9	61.3 \pm 2.9	<0.0001*
Body Weight (Kg)	64.1 \pm 2.9	68.6 \pm 2.9	0.302
Height (m²)	1.63 \pm 0.02	1.59 \pm 0.02	0.144
BMI (Kg/m²)	24.1 \pm 1.0	27.4 \pm 1.5	0.064

* Mann-Whitney-U test. Student´s t test t to other analysis. BMI: body mass weight

Salivary levels of TNF- α were significantly higher in relation to plasma concentration in BC and Control groups (Fig. 1).

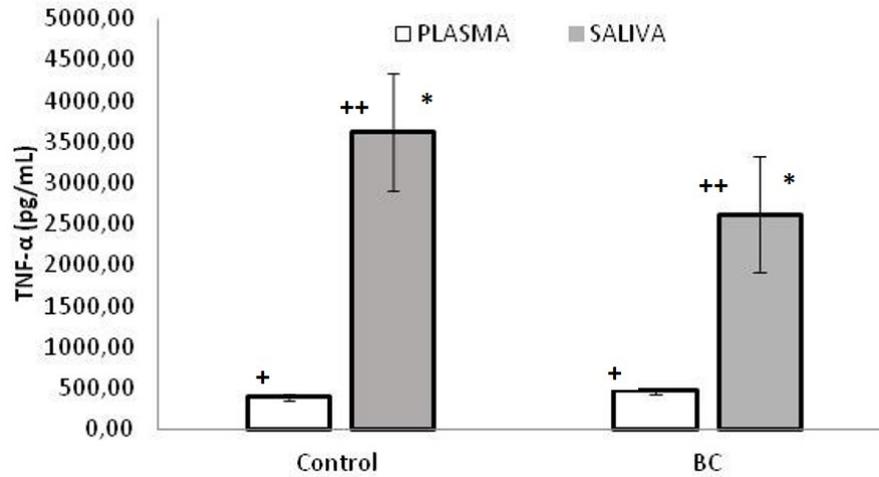


Figure 1. Plasmatic and Salivary levels of TNF- α in Control and BC patients. Data are mean \pm SD. (*) $p < 0.05$ and (+; ++) no-difference. Mann-Whitney test.

However, when compared Control versus BC groups, plasmatic and salivary levels of TNF- α were similar. In our sample, was no possible identify significant association with salivary or plasmatic levels of TNF- α and age, body weight, height or BMI in BC patients (Fig. 2a). Moreover, we also demonstrated that salivary and TNF- α plasmatic levels were no associated with grade and tumor biomarkers (ER; PR and Ki-67) (Fig. 2b).

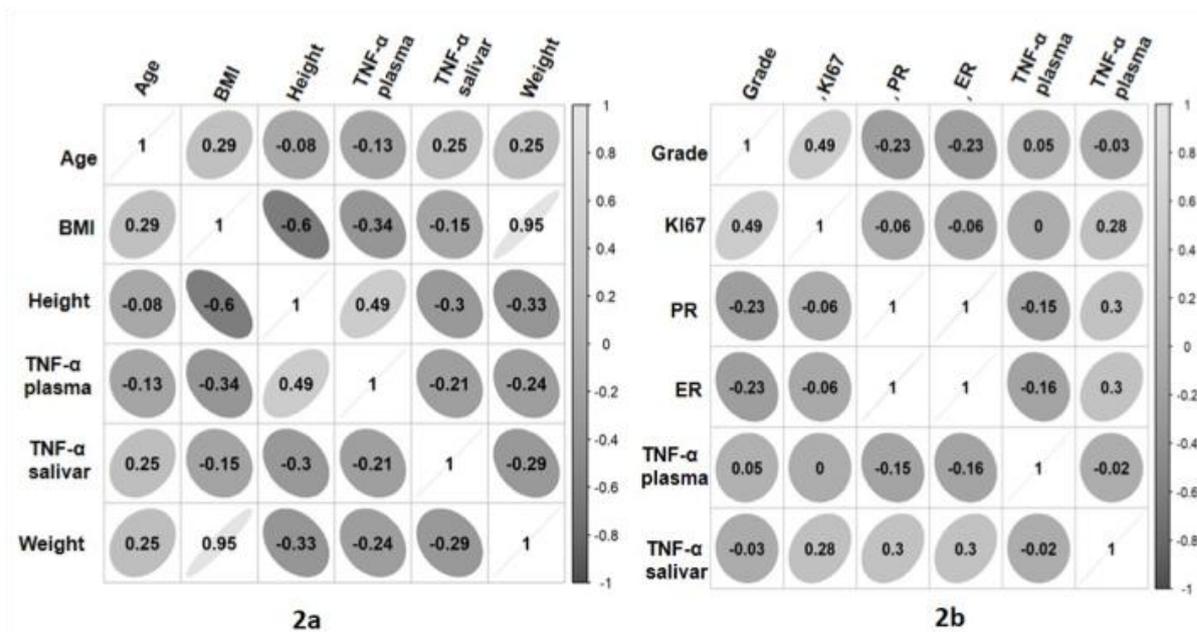


Figure 2. Linear correlation coefficients between plasmatic and salivary levels of TNF- α with Age, Weight, Height and BMI (Fig. 2a) and tumor biomarkers (Fig. 2b) in BC patients. BMI: body mass index; TNF- α : Tumor Necrose Factor alpha; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; and KI67 (index of proliferation)

The presences of lymphatic embolus, HER2 (biomarker), as well as, molecular subtype classification, also no presented relationship with salivary or plasmatic levels of TNF- α in BC women (data not shown).

Discussion

In our sample, women with BC were older and presented a tendency to overweight in relation to Control women. The aging and obesity are well known factor risk to BC.⁷ Cytokines have been investigated in saliva as potential protein biomarkers of several diseases, including cancer.^{5,8} In the present study we no found elevated TNF α concentration in BC patients, neither in saliva and nor in plasma. Moreover, we observed that the levels of TNF α were expressively greater in saliva in relation to plasma, independent of BC. These authors also demonstrated that had no correlation between TNF- α salivary and plasmatic levels in health subjects, as confirmed in the present work. Thus, salivary and plasmatic levels of TNF- α appear did not more adequate biomarker to BC patients, as suggests important review done by Zhong *et al.* and Meleti *et al.*^{9,10} Obesity and aging elevates TNF- α in saliva.⁷ However, in the present work, body weight, BMI, height and age were no correlates with salivary and plasmatic levels of TNF- α in BC women. The ER, PR, HER2 and Ki-67 (indicator of cell proliferation), are routinely used for prognosis and identification of tumors in BC.⁸ None these tumor biomarkers evaluated in the present study was significantly associated, neither with salivary nor with plasmatic levels of TNF- α in BC patients. Taken together, these results reinforce our hypothesis that TNF- α is not more appropriated biomarker in saliva or plasma to BC women patients. Weak correlation of TNF- α salivary in oral squamous cell carcinoma patients tumor also was found by SahebJamee *et al.*¹². In conclusion, plasmatic or salivary levels of TNF- α were no altered in BC patients, as well as, in both sites the TNF- α no have correlation with classical tumor biomarkers in BC patients.

Acknowledgments

We thanks at Hospital do Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc) and Tumors Biology Laboratory at the State University of Western Paraná for technical support.

References:

1. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;151:1-32. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.07.002.
2. Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent.* 2009 Aug;22(4):241-8.
3. Söder B, Yakob M, Meurman JH, Andersson LC, Klinge B, Söder PÖ. Periodontal disease may associate with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jun;127(2):497-502. doi: 10.1007/s10549-010-1221-4.
4. Sawczuk B, Maciejczyk M, Sawczuk-Siemieniuk M, Posmyk R, Zalewska A, Car H. Salivary Gland Function, Antioxidant Defence and Oxidative Damage in the Saliva of Patients with Breast Cancer: Does the *BRCA1* Mutation Disturb the Salivary Redox Profile? *Cancers (Basel).* 2019 Oct 8;11(10):1501. doi: 10.3390/cancers11101501.
5. Porto-Mascarenhas EC, Assad DX, Chardin H, Gozal D, De Luca Canto G, Acevedo AC, Guerra EN. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017 Feb;110:62-73. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.12.009.
6. Juretić M, Cerović R, Belušić-Gobić M, Brekalo Pršo I, Kqiku L, Špalj S, Pezelj-Ribarić S. Salivary levels of TNF- α and IL-6 in patients with oral premalignant and malignant lesions. *Folia Biol (Praha).* 2013;59:99-102.
7. Rinaldi S, Key TJ, Peeters PH, Lahmann PH, Lukanova A, Dossus L, Biessy C, Vineis P, Sacerdote C, Berrino F, Panico S, Tumino R, Palli D, Nagel G, Linseisen J, Boeing H, Roddam A, Bingham S, Khaw KT, Chloptios J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tehard B, Clavel-Chapelon F, Gonzalez CA, Larrañaga N, Barricarte A, Quirós JR, Chirlaque MD, Martinez C, Monninkhof E, Grobbee DE, Bueno-de-Mesquita HB, Ferrari P, Slimani N, Riboli E, Kaaks R. Anthropometric measures, endogenous sex steroids and breast cancer risk in postmenopausal women: a study within the EPIC cohort. *Int J Cancer.* 2006 Jun 1;118(11):2832-9.
8. Kos Z, Dabbs DJ. Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. *Histopathology.* 2016 Jan;68(1):70-85. doi: 10.1111/his.12795.
9. Meleti M, Cassi D, Vescovi P, Setti G, Pertinhez TA, Pezzi ME. Salivary biomarkers for diagnosis of systemic diseases and malignant tumors. A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2020 Feb 10. pii: 23355. doi: 10.4317/medoral.23355.
10. Zhong L, Cheng F, Lu X, Duan Y, Wang X. Untargeted saliva metabonomics study of breast cancer based on ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Talanta.* 2016 Sep; 158:351-360. doi: 10.1016/j.talanta.2016.04.049.
11. Principe S, Dikova V, Bagán J. Salivary Cytokines in patients with Head and Neck Cancer (HNC) treated with Radiotherapy. *J Clin Exp Dent.* 2019 Nov 1;11(11):e1072-e1077. doi: 10.4317/jced.56318 .
- 12 . SahebJamee M, Eslami M, Atarbashimoghadam F, Sarafnejad A. Salivary concentration of TNFalpha, IL1 alpha, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 May 1;13(5):E292-5.

6. ANEXOS

ANEXO I – Normas da Revista Brazilian Oral Research

Normas da Revista *Brazilian Oral Research* (BOR):

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Missão, escopo e política de submissão
- Apresentação do manuscrito
- Características e formatação dos tipos de manuscritos
- Termo de transferência de direitos autorais e declarações de responsabilidade
- Custo para publicação
- Exemplos de referências

MISSÃO, ESCOPO E POLÍTICA DE SUBMISSÃO

A *Brazilian Oral Research* - BOR (versão online ISSN 1807-3107) é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO (Divisão brasileira da *International Association for Dental Research* - IADR). A revista tem classificação B1 Qualis Capes (Odontologia), Fator de Impacto™ 0,937 (Institute for Scientific Information - ISI), é revisada por pares (sistema duplo-cego) e tem como missão disseminar e promover o intercâmbio de informações sobre as diversas áreas da pesquisa odontológica e com acesso aberto, modalidade dourada, sem embargo.

A **BOR** convida à submissão os seguintes tipos de artigos originais e de revisão, nas seguintes tipologias: Pesquisa Original (artigo completo ou *Short Communication*), Revisão Crítica da Literatura, Revisão Sistemática (e Meta-Análise), além de Cartas ao Editor. Todas as submissões deverão ser exclusivas à **BOR**.

A submissão dos manuscritos, e de toda documentação relacionada, deve ser realizada exclusivamente pelo ScholarOne Manuscripts™, através do link de submissão online (<http://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>).

O processo de avaliação do conteúdo científico do manuscrito será iniciado somente após o atendimento dos requisitos descritos nestas Instruções aos Autores. O manuscrito em desacordo com estes requisitos será devolvido ao autor de correspondência para adequações. **Importante:** Após ser aceito por seu mérito científico, todo manuscrito deverá ser submetido a uma revisão gramatical e estilística do idioma inglês. Para conhecer as empresas recomendadas, entre em contato com bor@sbpgo.org.br. Os autores deverão encaminhar

o texto revisado juntamente com o certificado de revisão fornecido pela empresa de edição escolhida.

Não serão aceitas revisões linguísticas realizadas por empresas que não forneçam o certificado. Exceção a esta regra é feita quando o autor de correspondência é *native English speaker*.

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

O texto do manuscrito deverá estar redigido em inglês e fornecido em arquivo digital compatível com o programa "Microsoft Word" (em formato DOC, DOCX ou RTF).

Cada uma das figuras (inclusive as que compõem esquemas/compos) deverá ser fornecida em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Fotografias, micrografias e radiografias deverão ser fornecidas em formato TIFF, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais deverão ser fornecidos em formato PDF, em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Arquivos de vídeo poderão ser submetidos, respeitando as demais especificidades, inclusive o anonimato dos autores (para fins de avaliação) e respeito aos direitos dos pacientes.

Importante: o ScholarOne™ permite que o conjunto dos arquivos somem no máximo 10 MB. No caso de a inclusão do arquivo de vídeo acarretar em tamanho superior, é possível informar o link de acesso ao vídeo. Na reprodução de documentação clínica, o uso de iniciais, nomes e/ou números de registro de pacientes são proibidos. A identificação de pacientes não é permitida. Um termo de consentimento esclarecido, assinado pelo paciente, quanto ao uso de sua imagem deverá ser fornecido pelo(s) autor(es) quando solicitado pela **BOR**. Ao reproduzir no manuscrito algum material previamente publicado (incluindo textos, gráficos, tabelas, figuras ou quaisquer outros materiais), a legislação cabível de Direitos Autorais deverá ser respeitada e a fonte citada.

As seções do manuscrito devem ser apresentadas observando-se as características específicas de cada tipo de manuscrito: folha de rosto (*Title Page*), introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos e referências.

Folha de rosto (*Title Page*; dados obrigatórios)

- Indicação da especialidade*, ou área de pesquisa, enfocada no manuscrito.

*Anatomia; Biologia Craniofacial; Biologia Pulpar; Bioquímica; Cariologia; Ciências do Comportamento; Cirurgia Bucomaxilo; Controle de Infecção; Dentística; Disfunção Temporomandibular; Estomatologia; Farmacologia; Fisiologia; Imaginologia; Implantodontia - Clínica Cirúrgica; Implantodontia - Clínica Protética; Implantodontia Básica e Biomateriais; Imunologia; Materiais Dentários; Microbiologia; Oclusão; Odontogeriatrics; Odontologia Legal; Odontologia Social; Odontopediatria; Ortodontia; Ortopedia; Patologia Oral; Periodontia; Prótese; Saúde Coletiva; Terapia Endodôntica.

- Título informativo e conciso, limitado a um máximo de 110 caracteres incluindo espaços.
- Nomes completos e por extenso de todos os autores, incluindo os respectivos números de telefone e endereços eletrônicos (email). Recomenda-se aos autores confrontar seus nomes anotados na Folha de Rosto (*Title Page*) com o perfil criado no ScholarOne™, de modo a evitar incompatibilidades.
- A participação de cada um dos autores deverá ser justificada por escrito em folha separada, observando-se os critérios de autoria e co-autoria adotados pelo *International Committee of Medical Journal Editors*, disponíveis em <http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html>
- Dados de afiliação institucional/profissional de todos os autores, incluindo universidade (ou outra instituição), faculdade/curso, departamento, cidade, estado e país, apresentados de acordo com as normas internas de citação estabelecidas pela instituição de cada um dos autores. Verificar se as afiliações foram inseridas corretamente no ScholarOne™.

Resumo: deve ser apresentado na forma de um parágrafo único estruturado (mas sem sub-divisões em seções), contendo proposição do trabalho, metodologia, resultados e conclusões. No Sistema, utilizar a ferramenta *Special characters* para caracteres especiais, se aplicável.

Descritores: devem ser fornecidos de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais, escolhidos dentre os descritores cadastrados em <http://decs.bvs.br/> ou <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> (não serão aceitos sinônimos).

Texto Principal

Introdução: deve apresentar o estado da arte do assunto pesquisado, a relevância do estudo e sua relação com outros trabalhos publicados na mesma linha de pesquisa ou área, identificando suas limitações e possíveis vieses. O objetivo do estudo deve ser apresentado concisamente ao final dessa seção.

Metodologia: devem ser fornecidas todas as características do material pertinente ao assunto da pesquisa (ex.: amostras de tecido, sujeitos da pesquisa). Os métodos experimentais, analíticos e estatísticos devem ser descritos de forma concisa, porém suficientemente detalhada para permitir que outros possam repetir o trabalho. Os dados de fabricantes ou fornecedores de produtos, equipamentos, ou softwares devem ser explicitados na primeira menção feita nesta seção, como segue: nome do fabricante, cidade e país. Os programas de computador e métodos estatísticos também devem ser especificados. A menos que o objetivo do trabalho seja comparar produtos ou sistemas específicos, os nomes comerciais de técnicas, bem como de produtos ou equipamentos científicos ou clínicos só devem ser citados nas seções de "Metodologia" e "Agradecimentos", de acordo com o caso. No restante do manuscrito, inclusive no título, devem ser utilizados os nomes genéricos. Nos manuscritos que envolvam radiografias, microrradiografias ou imagens de MEV, devem ser incluídas as seguintes informações: fonte de radiação, filtros e níveis de kV utilizados. Os manuscritos que relatem estudos em

humanos devem incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki (*World Medical Association*, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). O número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Estudos observacionais devem seguir as diretrizes STROBE (<http://strobe-statement.org/>) e o check list deve ser submetido. Ensaio clínico devem ser relatados de acordo com o protocolo padronizado da *CONSORT Statement* (<http://www.consort-statement.org/>), revisões sistemáticas e meta-análises devem seguir o PRISMA (<http://www.prisma-statement.org/>), ou Cochrane (<http://www.cochrane.org/>).

Ensaio Clínico

Os ensaios clínicos segundo as diretrizes CONSORT disponíveis em www.consort-statement.org. O número de registro do ensaio clínico e o nome do registro da pesquisa serão publicados com o artigo.

Manuscritos que relatem a realização de estudos em animais devem também incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida de maneira ética, e o número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Caso a pesquisa envolva um registro genético, antes da submissão, as novas sequências genéticas devem ser incluídas num banco de dados público, e o número de acesso deve ser fornecido à **BOR**. Os autores poderão utilizar as seguintes bases de dados:

- GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit>
- EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>
- DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

As submissões de manuscritos que incluam dados de *microarray* devem incluir a informação recomendada pelas diretrizes MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment* - <http://www.mged.org/index.html>) e/ou descrever, na forma de itens, como os detalhes experimentais foram submetidos a uma das bases de dados publicamente disponíveis, tais como:

- ArrayExpress: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>
- GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Resultados: devem ser apresentados na mesma ordem em que o experimento foi realizado, conforme descrito na seção "Metodologia". Os resultados mais significativos devem ser descritos. Texto, tabelas e figuras não devem ser repetitivos. Os resultados com significância estatística devem vir acompanhados dos respectivos valores de p.

Tabelas: devem ser numeradas e citadas consecutivamente no texto principal, em algarismos arábicos. As tabelas devem ser submetidas separadamente do texto em formato DOC, DOCX ou RTF.

Discussão: deve discutir os resultados do estudo em relação à hipótese de trabalho e à literatura pertinente. Deve descrever as semelhanças e as diferenças do estudo em relação aos outros estudos correlatos encontrados na literatura, e fornecer explicações para as possíveis diferenças encontradas. Deve também identificar as limitações do estudo e fazer sugestões para pesquisas futuras.

Conclusões: devem ser apresentadas concisamente e estar estritamente fundamentadas nos resultados obtidos na pesquisa. O detalhamento dos resultados, incluindo valores numéricos etc., não deve ser repetido.

Agradecimentos: as contribuições de colegas (por assistência técnica, comentários críticos etc.) devem ser informadas, e qualquer vinculação de autores com firmas comerciais deve ser revelada. Esta seção deve descrever a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa, incluindo os respectivos números de processo.

Plágio

A **BOR** emprega um sistema de detecção de plágio. Ao enviar o seu manuscrito para a Revista, este manuscrito poderá ser rastreado. Isto não tem relação com a simples repetição de nomes / filiações, mas envolve frases ou textos utilizados.

Referências: só serão aceitas como referências as publicações em periódicos revisados por pares. Não serão aceitos como referências manuscritos em processo de redação, dissertações, teses, ou resumos apresentados em congressos. Devem ser evitadas referências a livros.

As citações de referências devem ser identificadas no texto por meio de números arábicos sobrescritos. A lista completa de referências deve vir após a seção de "Agradecimentos", e as referências devem ser numeradas e apresentadas de acordo com o Estilo Vancouver, em conformidade com as diretrizes fornecidas pelo *International Committee of Medical Journal Editors*, conforme apresentadas em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>). Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). A correta apresentação das referências é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Grafia de termos científicos: nomes científicos (binômios de nomenclatura microbiológica, zoológica e botânica) devem ser escritos por extenso, bem como os nomes de compostos e elementos químicos, na primeira menção no texto principal.

Unidades de medida: devem ser apresentadas de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (<http://www.bipm.org> ou <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>).

Notas de rodapé no texto principal: devem ser indicadas por meio de asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Figuras: fotografias, micrografias e radiografias devem ter uma largura mínima de 10 cm, resolução mínima de 500 dpi, e devem ser fornecidas em formato TIFF. Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais devem ser fornecidos em formato PDF. Todas as figuras devem ser submetidas, individualmente, em arquivos separados (não inseridas no arquivo de texto). As figuras devem ser numeradas e citadas consecutivamente no corpo do texto, em algarismos arábicos. As legendas das figuras devem ser inseridas todas juntas no final do texto, após as referências.

Resumo de Pesquisa Original (Short Communication)

Devem ser limitados a 10.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). É permitido um máximo de 2 (duas) figuras e 12 (doze) referências. O resumo deve conter, no máximo, 100 palavras.

Formatação - Arquivos de texto

- Folha de rosto
- Texto principal (10.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 100 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Tabelas
- Referências - máximo de 12 referências
- Legendas de figuras

Formatação - Arquivos de figuras

- Figuras - máximo de 2 (duas) figuras, conforme descrito acima.

ANEXO II – Comprovante de Submissão Brazilian Oral Research

26/02/2020

ScholarOne Manuscripts

 Brazilian Oral Research

 Home

 Author

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Brazilian Oral Research

Manuscript ID

BOR-2020-0160

Title

Salivary TNF- α in breast cancer: clinical-pathological correlations

Authors

Opolski, Marcelo

malto, vitor

Carla Bufalo Kawassaki, Aedra

carla, janaina

Kern, Rodrigo

Rech, Daniel

Paris, Carolina

Grassioli, Sabrina

Date Submitted

26-Feb-2020

Author Dashboard

Pesquisa Oral Brasileira - Manuscrito ID BOR-2020-0160

Cristina Leitão <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Qua, 26/02/2020 01:47

Para:

marceloopolski@hotmail.com

Cc:

marceloopolski@hotmail.com;
vitormaito@hotmail.com;
aedrab@gmail.com;
janainacarla91@gmail.com;
rodrigokern1@gmail.com;
dr.rech@gmail.com;
carolpanis@hotmail.com;
sgrassiolli@gmail.com

26-Fev-2020

Caro Dr. Opolski:

Seu manuscrito intitulado "Salivary TNF- α no câncer de mama: correlações clínico-patológicas" foi submetido com sucesso online e está sendo considerado integral para publicação na Pesquisa Oral Brasileira.

Seu iD manuscrito é BOR-2020-0160.

Por favor, mencione a iD do manuscrito acima em todas as correspondências futuras ou ao chamar o escritório para perguntas. Se houver alguma alteração no endereço ou endereço de e-mail da rua, entre em contato com os Manuscritos ScholarOne em <https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo> e edite as informações do usuário conforme apropriado.

Você também pode visualizar o status do seu manuscrito a qualquer momento verificando seu Centro autor depois de fazer login em <https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>.

Obrigado por submeter seu manuscrito à Pesquisa Oral Brasileira.

Sinceramente, Editorial brasileiro de
Pesquisa Oral

ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Título do Projeto: Mapeamento do câncer de mama familiar no Sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos.

Pesquisador responsável: Profª Drª CAROLINA PANIS – Telefones (43)99165316 e (46) 30553026

Equipe do projeto: Ms. Aedra Bufalo – Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Dra Rosebel Prates – Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Dra Claudiolia Rizzo Paschetto - Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Dra Lélia Carolina Lúcio - Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Ms. Geraldo Vicentini – Professor do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão.

Convidamos você a participar de nossa pesquisa que tem o objetivo de identificar os casos de câncer de mama em mulheres que tem história da doença na família, que moram na região Sudoeste do Paraná. Para isso será realizada a coleta de um tubo de sangue (10 mL) para fazer os exames necessários para identificar porque alguns tumores de mama levam à doenças tão agressivas.

Durante a execução do projeto também vamos precisar de uma parte do tecido tumoral que o médico irá remover durante a sua cirurgia ou que foi coletado para o diagnóstico da doença (na biópsia). Também precisaremos consultar o prontuário médico, para saber informações sobre sua saúde e sua ocupação de trabalho. Para algum questionamento, dúvida ou relato de algum acontecimento os pesquisadores poderão ser contatados a qualquer momento, pelos telefones (43)99165316 e (46) 30553026. Estamos disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas, a qualquer momento.

Desta forma, você está contribuindo para a identificação de fatores que levam à alta incidência de cânceres agressivos na nossa região.

Este termo será entregue em duas vias, sendo que uma ficará com você. Você não pagará nem receberá para participar do estudo. Seus dados serão mantidos em sigilo, ou seja, ninguém além dos pesquisadores terá acesso ao material ou informações coletadas. Estes dados serão utilizados somente para fins científicos. Você poderá cancelar sua participação a qualquer momento. Se necessitar de maiores informações, o telefone do comitê de ética é 3220-3272 e da pesquisadora responsável é 46 30553026. A coleta de material será feita dentro do Ceonc, portanto qualquer imprevisto será resolvido imediatamente no local. Ao término do projeto, se a pesquisa identificar que a sua doença se classifica como câncer familiar, você será chamado ao Ceonc para receber esclarecimentos sobre como proceder no acompanhamento da doença nos próximos anos.

Declaro estar ciente do exposto e desejo participar do projeto.

Nome do sujeito de pesquisa ou responsável:

Assinatura:

Eu, **Carolina Panis**, declaro que forneci todas as informações do projeto ao participante e/ou responsável.

Data:

ANEXO IV – Comprovante do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
OESTE DO PARANÁ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mapeamento do câncer de mama familiar no sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional a agrotóxicos.

Pesquisador: CAROLINA PANIS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35524814.4.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 810.501

Data da Relatoria: 25/09/2014

Apresentação do Projeto:

Neste estudo pretende-se avaliar todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama, atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc), em um período de 48 meses. A partir da análise de anotações em prontuários serão selecionadas para investigação dos genes de interesse aquelas mulheres com história de câncer de mama familiar com ou sem exposição ocupacional a agrotóxicos. Atende aos requisitos teóricos, metodológicos e éticos.

Objetivo da Pesquisa:

Mapear os casos de câncer de mama familiar na região Sudoeste do Paraná e identificar possível associação a exposição ocupacional a agrotóxicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos diretos aos sujeitos, uma vez que serão estudados materiais coletados durante cirurgias oncológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante para a área de oncologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados.

Endereço: UNIVERSITÁRIA

Bairro: UNIVERSITÁRIO

UF: PR **Município:** CASCAVEL

Telefone: (45)3220-3272

CEP: 85.819-110

E-mail: cep.pppg@unioeste.br

Continuação do Parecer: 810.501

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado. O projeto não necessita adequações.

CASCADEL, 29 de Setembro de 2014

Assinado por:
João Fernando Christofolotti
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITARIA

Bairro: UNIVERSITARIO

CEP: 85.819-110

UF: PR

Município: CASCADEL

Telefone: (45)3220-3272

E-mail: cep.pppg@unioeste.br