

EDUARDO MORATO DE OLIVEIRA

**BIOMARCADORES SALIVARES DE REMODELAÇÃO ÓSSEA E
REPARO TECIDUAL EM PACIENTES IRRADIADOS EM REGIÃO DE
CABEÇA E PESCOÇO**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2019**

Eduardo Morato de Oliveira

**BIOMARCADORES SALIVARES DE REMODELAÇÃO ÓSSEA E
REPARO TECIDUAL EM PACIENTES IRRADIADOS EM REGIÃO DE
CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – Área de concentração Estomatologia

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Coorientador: Prof^a Dr^a Patrícia Carlos Caldeira

Belo Horizonte
2019

Ficha Catalográfica

048b Oliveira, Eduardo Morato de.
2019 Biomarcadores salivares de remodelação óssea e reparo
D tecidual em pacientes irradiados em região de cabeça e
pescoço / Eduardo Morato de Oliveira. -- 2019.

57 f. : il.

Orientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar.
Coorientadora: Patrícia Carlos Caldeira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Saliva. 2. Proteínas salivares. 3. Radioterapia. 4.
Remodelação óssea. I. Aguiar, Maria Cássia Ferreira de. II.
Caldeira, Patrícia Carlos. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



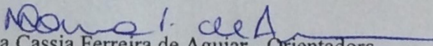
FOLHA DE APROVAÇÃO


**BIOMARCADORES SALIVARES DE REMODELAÇÃO ÓSSEA E REPARO
TECIDUAL EM PACIENTES IRRADIADOS EM REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO**

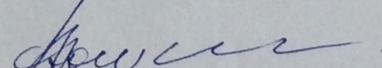
EDUARDO MORATO DE OLIVEIRA

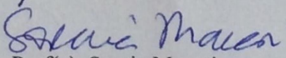
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Estomatologia.

Aprovada em 03 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar - Orientadora
FO-UFMG


Prof(a). Patricia Carlos Caldeira
FO-UFMG


Prof(a). Vladimir Reimar Augusto de Souza Noronha
Centro Universitário-Newton Paiva


Prof(a). Soraia Macari
FO/UFMG

Belo Horizonte, 3 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a toda minha família, minha mãe, meu pai e meu irmão pelo constante incentivo em busca do conhecimento e, em especial, minha esposa Polyane pela constante motivação e apoio incondicionais, estando sempre ao meu lado nos momentos difíceis.

Agradeço as minhas orientadoras Prof^a Dr^a Maria Cássia Ferreira de Aguiar e Prof^a Dr^a Patrícia Carlos Caldeira, mentoras e idealizadoras deste projeto, pela confiança depositada e por toda orientação necessária ao longo do curso.

Meu agradecimento a todos os mestres e funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais que de alguma forma fizeram parte de minha formação.

Agradeço aos pacientes e participantes do estudo pela confiança e disponibilidade, tornando possível a realização desta pesquisa.

Aos alunos de Iniciação científica Rafael e Bárbara, o meu muito obrigado pela contribuição tanto nas coletas quanto no processamento das amostras e agradeço à Prof^a. Dr^a. Janine pela paciência e ensinamentos laboratoriais proporcionados durante a pesquisa. À Prof^a Dr^a Tarcília Aparecida Silva pela parceria e viabilização dos experimentos.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas de mestrado pela amizade construída e por compartilhar conhecimentos durante esta caminhada, em especial André, Maria Fernanda, Priscila e Sicília.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

“O mais competente não discute, domina a ciência e cala-se.”

Voltaire

RESUMO

O tratamento do câncer da região de cabeça e pescoço envolve, além da cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. A radioterapia em região de cabeça e pescoço é nociva também para o tecido normal e a cavidade bucal é muito susceptível aos efeitos diretos e indiretos da radiação, que pode afetar o reparo tecidual, especialmente as glândulas salivares e o metabolismo ósseo. Como efeitos adversos podem ocorrer a hipossalivação e xerostomia, disgeusia, infecções orais, cárie dental agressiva, mucosite, trismo e osteoradionecrose. A quimioterapia pode ser associada à radioterapia no tratamento das neoplasias malignas em região de cabeça e pescoço. Tal modalidade terapêutica também pode desencadear alguns efeitos adversos como inflamação intensa na mucosa do sistema digestivo, hipossalivação, dificuldade de deglutição e perda de peso. A possibilidade da investigação de biomarcadores tornou a saliva um importante meio de diagnóstico e monitoramento das doenças por permitir coleta simples e não invasiva, além de fácil manipulação e armazenamento. Este trabalho teve o objetivo de investigar biomarcadores salivares associados à remodelação óssea e reparação tecidual em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço. Trata-se de um estudo transversal. Foram selecionados prospectivamente pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de neoplasias de cabeça e pescoço atendidos no Projeto de Extensão “Atendimento de suporte odontológico ao paciente com câncer em região de cabeça e pescoço”, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais no período de abril a novembro de 2018. Indivíduos sistemicamente saudáveis nunca expostos à radioterapia compuseram o grupo de comparação, pareado por sexo e idade. Critérios de inclusão e exclusão foram empregados. Saliva total não estimulada foi coletada e processada para dosagem de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF e MMP-9, pela técnica de ELISA. Análise estatística foi realizada nos programas SPSS® 19.0 e GraphPad Prism® e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. O volume salivar foi significativamente menor nos pacientes irradiados. A comparação das dosagens entre os pacientes ($n=29$) e os controles não irradiados não revelou diferenças estatisticamente significantes para RANK, OPG e VEGF ($p > 0,05$). Os valores de EGF ($p=0,000$) e MMP-9 ($p=0,014$) foram maiores nos controles que nos pacientes. A dosagem de RANK-L foi maior nos controles, com valor marginal de “p” (0,051). Ao comparar os resultados dos pacientes que receberam apenas RT ($n=13$) com os indivíduos controle não irradiados, não houve diferença estatisticamente significativa para dosagem de RANK, RANKL, OPG e VEGF ($p > 0,05$); já EGF ($p=0,003$) e MMP-9 ($p=0,031$) apresentaram diferença estatisticamente significativa. Ao compararmos pacientes que receberam radioterapia e quimioterapia ($n=16$) com o controle observa-se diferença estatisticamente significativa apenas para dosagem de EGF ($p=0,031$), que foi maior no controle. Conclui-se que a radiação em região de cabeça e pescoço diminui os níveis salivares de EGF e MMP-9, mas não os de RANK, OPG e VEGF. RANKL também apresenta tendência à diminuição pela radioterapia. A deficiência de EGF e MMP-9 na saliva dos pacientes irradiados em cabeça e pescoço pode estar relacionada ao desenvolvimento dos efeitos deletérios tardios da radiação ionizante na cavidade bucal.

Palavras-chave: Saliva. Proteínas salivares. Radioterapia. Remodelação óssea.

ABSTRACT

Salivary biomarkers of bone remodeling and tissue repair in irradiated patients in head and neck

Head and neck cancer treatment involves in addition to surgery, chemotherapy and radiotherapy. Radiotherapy in head and neck region is harmful also to the normal tissue and the oral cavity that is very susceptible by the radiation direct and indirect effects, and it can affect tissue repair, notably in the salivary glands and bone metabolism. As consequences may occur hyposalivation and xerostomia, dysgeusia, oral infections, aggressive dental caries, mucositis, trismus and osteoradionecrosis. Chemotherapy may be associated with radiotherapy in the treatment of head and neck malignant neoplasms. This therapeutic modality can also trigger some adverse effects such as intense inflammation of the digestive system mucosa, hyposalivation, difficulty in swallowing and weight loss. Saliva presents a simple sampling and handling, and can be used for the investigation of biomarkers. The aim of this study was to compare salivary biomarkers related to bone remodelling and tissue repair in head and neck irradiated patients and non-irradiated patients. This is a cross-sectional prospective study. Patients treated by radiotherapy for head and neck cancer from April to November 2018 were selected. Healthy individuals never exposed to radiotherapy composed the comparison group, paired by sex and age. Exclusion criteria applied. Total unstimulated saliva was collected. RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF e MMP-9 concentration was assessed using ELISA method. Statistics analysis was performed on SPSS® 19.0 e GraphPad Prism®7.0 softwares. Statistical significance was set at $p < 0.05$. The salivary volume was significantly lower in the irradiated patients. Salivary concentration of RANK, OPG, and VEGF did not differ from patients ($n=29$) and controls ($p < 0.05$). EGF ($p=0.000$) e MMP-9 ($p=0.014$) were higher in control group than in patients. RANK-L dosage was higher in control group, with a marginal p -value (0.051). When comparing the results of the patients that received only RT ($n=13$) with controls, the EGF ($p=0.003$) e MMP-9 ($p=0.031$) were significantly higher in the control group, and the other biomarkers (RANK, RANK-L, OPG and VEGF) did not show statistical significant difference. The comparison between patients treated with RT and chemotherapy ($n=16$) revealed statistical significant difference only for EGF dosage ($p=0.031$). In conclusion, head and neck radiation therapy decreases the salivary levels of EGF and MMP-9, but not of RANK, OPG and VEGF. RANKL shows a tendency to decrease with radiotherapy. EGF and MMP-9 deficiency in the saliva of irradiated patients may be related to the deleterious effects of ionizing radiation in the oral cavity.

Keywords: Saliva. Salivary proteins. Radiotherapy. Bone remodeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1-	Comparação do volume salivar entre pacientes irradiados e grupo controle.....	36
Gráfico 2-	Comparação das dosagens salivares (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF e MMP-9 em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e indivíduos não irradiados.....	38
Gráfico 3-	Comparação da dosagem salivar (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF, MMP-9 entre os pacientes apenas irradiados em região de cabeça e pescoço e grupo controle.....	41
Gráfico 4-	Comparação da dosagem salivar (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF, MMP-9 entre os pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço que receberam quimioterapia e indivíduos não irradiados.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Fatores de risco associados à ORN.....	16
Tabela 2-	Kits utilizados para teste ELISA.....	30
Tabela 3-	Características clínicas e demográficas dos pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço.....	33
Tabela 4-	Comparação das dosagens salivares (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF e MMP-9 em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e indivíduos não irradiados.....	37
Tabela 5-	Comparação da dosagem salivar (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF e MMP-9 entre os pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço que receberam ou não quimioterapia e indivíduos não irradiados.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
Gy	<i>Gray</i>
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Min	Minutos
ml	Mililitros
mmol/L	Milimolar/Litro
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz-2
MMP-8	Metaloproteinase de Matriz-8
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz-9
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MRONJ	<i>Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw</i>
OPD	<i>Cromógero-Phenylenediamine Dihydrochloride</i>
OPG	Osteoprotegerina
ORN	Osteoradionecrose dos maxilares
PBS	Solução Tamponada com Fosfato
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
Rpm	Rotações por Minutos
RT	Radioterapia
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
uL	Microlitros
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Radioterapia (RT) em cabeça e pescoço: efeitos adversos e alterações salivares.....	15
2.2	Saliva humana.....	17
2.2.1	Composição e vantagens para o uso em pesquisa.....	17
2.3	Biomarcadores salivares associados à remodelação óssea e reparo tecidual.....	19
2.3.1	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B (RANK) e seu ligante (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG): eixo-chave no metabolismo ósseo.....	19
2.3.2	Fator de Crescimento Epidérmico (EGF).....	20
2.3.3	Fator de Crescimento do Endotélio vascular (VEGF).....	22
2.3.4	Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP-9).....	24
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4	METODOLOGIA.....	28
4.1	Aspectos éticos e legais.....	28
4.2	Seleção dos participantes.....	28
4.3	Coleta de saliva.....	29
4.4	ELISA.....	30
4.5	Análise estatística.....	31
5	RESULTADOS.....	32
6	DISCUSSÃO.....	44

7	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

O percentual de pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia (RT) como modalidade terapêutica é elevado (60 a 80%) (RIVERO, SHAMJI e KOLOKYTHAS, 2017). A RT pode desencadear efeitos deletérios iniciais ou tardios nos tecidos bucais. Os principais efeitos agudos são dor, edema e mucosite. Já os efeitos em longo prazo podem incluir edema crônico, atrofia e fibrose tecidual, hipossalivação e osteoradionecrose dos maxilares (ORN) (ASIKAINEN *et al.*, 2017).

A quimioterapia pode ser associada à RT no tratamento de neoplasias malignas em região de cabeça e pescoço. Sabe-se que os agentes quimioterápicos potencializam os efeitos da RT, além de atuarem em determinada fase do ciclo celular tanto das células tumorais, quanto das células normais, em especial aquelas que apresentam divisão celular mais intensa e rápida, como as células da mucosa do aparelho digestivo (BELLM *et al.*, 2000). Portanto, os efeitos adversos provocados pela quimioterapia incluem mucosites no trato gastrointestinal, hipossalivação, dificuldade de deglutição e consequente perda de peso (SCULLY, EPSTEIN e SONIS, 2003).

Estudos de biomarcadores salivares têm se revelado promissores no monitoramento, diagnóstico e elucidação da etiopatogenia de diversas doenças, uma vez que a saliva é constituída por um ecossistema biomolecular diversificado capaz de fornecer informações importantes com relação às funções dos diferentes órgãos do corpo humano (LOO *et al.*, 2010). Aliado a isso, a saliva tem a vantagem de apresentar coleta simples e não invasiva, além de fácil manipulação e armazenamento (SCHAFER *et al.*, 2014). Alguns estudos têm avaliado e identificado proteínas presentes na saliva dos pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço. (LAHEIJ *et al.*, 2015; RUSSO *et al.*, 2016; VIDOTTO *et al.*, 2011). Sabe-se que a RT em região de cabeça e pescoço pode causar alteração na quantidade e qualidade da saliva (NADELLA *et al.*, 2015) e provocar alterações na remodelação óssea e reparo tecidual (CHERIEX, NIJHUIS e MUREAU, 2013; COOPER *et al.*, 1995). Proteínas associadas a esses processos podem ser identificadas na saliva

ajudando a compreender algumas das principais consequências da RT em região de cabeça e pescoço. Por isso, a investigação específica de algumas dessas proteínas envolvidas diretamente no processo de remodelação óssea e reparo tecidual poderá contribuir para a compreensão dos efeitos desencadeados pela RT em região de cabeça e pescoço.

Portanto, o objetivo da pesquisa é avaliar comparativamente biomarcadores salivares associados à remodelação óssea e ao reparo tecidual em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e pacientes não irradiados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radioterapia (RT) em região de cabeça e pescoço: efeitos adversos e alterações salivares

A RT representa uma importante terapia contra o câncer em região de cabeça e pescoço. Normalmente, a RT é associada à cirurgia e/ou quimioterapia, sendo que a radiação induz efeitos adversos iniciais ou tardios nos tecidos bucais. Os efeitos iniciais consistem em danos à mucosa oral, glândulas salivares e alteração de paladar. Já os efeitos tardios incluem danos às glândulas salivares, dentição, periodonto, osso, músculos e articulações, predispondo o paciente à atrofia tecidual, hipossalivação, cárie, periodontite, ORN, perda de paladar, trismo e mucosite (ASIKAINEN *et al.*, 2017; JANSMA *et al.*, 1992).

Após o início da RT, os danos às glândulas salivares levam à diminuição do fluxo salivar e mudança na composição da saliva. Como o fluido salivar tem função protetora, a cavidade bucal torna-se mais susceptível a doenças, tais como cárie, gengivite, periodontite e infecções (STONE *et al.*, 2003; VISSINK *et al.*, 2003).

Muitas complicações podem surgir da terapia não cirúrgica do câncer, e as mais comuns são mucosite, dermatite, ORN, alteração de paladar, xerostomia, disfagia, anorexia e fadiga. A ORN é uma complicação grave e tardia do tratamento radioterápico dos pacientes com câncer em região de cabeça e pescoço, definida como uma área de osso exposto desvitalizado, persistente por 3 a 6 meses e caracterizada pela deficiência na cicatrização dos tecidos consequente à RT (COOPER *et al.*, 1995; NABIL e SAMMAN, 2011).

A RT predispõe à ORN uma vez que afeta os vasos sanguíneos intra-ósseos e prejudica a vascularização tecidual (THORN *et al.*, 2000). Da mesma forma, a RT produz radicais livres e altera a síntese de colágeno. Todos esses fenômenos promovem a perda da atividade celular, e causam a “fibroatrofia”, prejudicando o reparo e a remodelação óssea, e deixando o osso mais susceptível à exposição e contaminação, aumentando o risco de necrose (NADELLA *et al.*, 2015; SHAW e DHANDA, 2011). A Tabela 1 apresenta, além da radioterapia, os fatores que podem propiciar o desenvolvimento de osteoradionecrose.

Tabela 1 - Fatores de risco associados à ORN

Localização primária do tumor	Língua, assoalho bucal, rebordo alveolar, trígono retromolar e tonsila
Estágio da doença	Estágio III/IV
Dose de radiação	Dose >60Gy
Cirurgia prévia à radiação	Mandibulectomias ou osteotomias prévias à radiação
Higiene oral	Doença periodontal; pobre higiene oral
Extração dental	Extração dental depois da radioterapia
Uso de álcool	Uso contínuo durante e depois da radioterapia
Uso de tabaco	Uso contínuo durante e depois da radioterapia
Nutrição	Nutrição deficiente pode afetar a cicatrização de feridas

Fonte: Adaptado de DELL & SINHA, 2011

Na prática, outra modalidade de tratamento das neoplasias malignas em região de cabeça e pescoço é a administração de um agente quimioterápico, como a cisplatina, concomitantemente à RT (radioquimioterapia). Tal associação potencializa a ação da RT e tem se tornado cada vez mais frequente por representar uma estratégia conservadora nos casos em que apenas o tratamento cirúrgico provocaria defeitos funcionais e estéticos demasiados (JENSEN *et al*, 2008).

As drogas quimioterápicas podem ser empregadas isoladas ou associadas entre elas. O mecanismo de ação dos agentes quimioterápicos é complexo e depende do tipo de droga utilizada; algumas atacam diretamente a molécula de DNA quando se dividem; outras decompõem enzimas e proteínas necessárias para a síntese e divisão do DNA; outras, ainda, impedem a ação das enzimas que reparam os defeitos do DNA. Portanto, tais medicamentos agem de forma inespecífica interferindo no ciclo celular, seja ela célula tumoral ou normal, todavia, as células normais que se dividem mais rapidamente são as mais afetadas, como células da medula óssea, pele e seus anexos e mucosa do aparelho digestivo (BELLM *et al*, 2000).

Cada agente quimioterápico atua em uma determinada fase do ciclo celular, destruindo apenas as células que estão nessa fase específica de divisão celular, por isso, a associação de diferentes drogas que atuam em fases diferentes pode potencializar o efeito do tratamento.

Contudo, a radioquimioterapia pode desencadear efeitos adversos como inflamação intensa na mucosa do sistema digestivo, hipossalivação, dificuldade de deglutição e perda de peso (SCULLY, EPSTEIN e SONIS, 2003). Tais complicações podem exigir a introdução de sonda gástrica para garantir a nutrição do paciente e o tratamento multidisciplinar entre as equipes de oncologistas, radioterapeutas, cirurgiões, dentistas, enfermeiros, nutricionistas, fonoaudiólogos e fisioterapeutas (LEE e LEE, 2015).

2.2 Saliva humana

2.2.1 Composição e aplicação em pesquisa científica

A saliva é um líquido transparente ligeiramente ácido (pH 6-7) secretada na cavidade bucal pelas glândulas salivares (SPIELMANN e WONG, 2011). Em condições normais, um indivíduo adulto produz 500 a 1500 mililitros (ml) saliva/dia.

Noventa por cento do fluido salivar é secretado pelas glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual); apenas 10% são produzidos pelas glândulas salivares menores (lábio, mucosa jugal e palato). A saliva é considerada uma mistura complexa de componentes do fluido crevicular e gengival, células do epitélio oral e microorganismos como vírus, fungos e bactérias. Em alguns casos, pode apresentar células sanguíneas originadas de feridas na mucosa, secreção pulmonar e/ou nasal e resíduos alimentares (CUEVAS-CÓRDOBA e SANTIAGO-GARCIA, 2014).

A saliva é composta 99% por água e 1% por vários componentes orgânicos e inorgânicos (NAVAZESH e KUMAR, 2008). Os componentes inorgânicos incluem os eletrólitos como o sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto e fosfato, enquanto os componentes orgânicos podem ser proteicos (prolina rica em proteína, amilase, mucina, lisozima, Imunoglobulina A, lactoferrina, peroxidase, estaterina, histamina, metaloproteinases de matriz [MMPs] e glicoproteínas) e não proteicos (ácido úrico, bilirrubina, creatinina, glicose, lipídios, aminoácidos, aminas, lactato). Outros componentes proteicos da saliva são enzimas, inibidores enzimáticos, citocinas e hormônios (MARCANTONI, 2009).

A identificação destes componentes está relacionada a diferentes funções como resposta imune, proteção tecidual, atividade antimicrobiana, remineralização do esmalte, digestão, inibição de proteinase, bem como transcrição, proliferação celular, transdução de sinal, quimiotaxia e motilidade celular (DAWES *et al.*, 2015; SPIELMANN e WONG, 2011).

A saliva tem chamado atenção dos pesquisadores como um fluido em potencial para uso em diagnóstico e monitoramento de doenças. As suas vantagens incluem coleta simples e não invasiva com conseqüente redução dos níveis de estresse e ansiedade do paciente, principalmente em crianças, idosos e portadores de alterações vasculares; fácil manipulação e armazenamento; além de apresentar custos reduzidos (SCHAFER *et al.*, 2014; KHURSHID Z *et al.*, 2016).

As proteínas e peptídeos salivares podem ser investigados com técnicas bioquímicas tradicionais que incluem cromatografia líquida, eletroforese em gel, espectrometria de massa, imunoenaios (radioimunoenaios e imunoenaios enzimáticos – *Enzyme-linked immuno-sorbent assay* (ELISA) entre outros (AL KAWAS, RAHIM e FERGUSON, 2012). A maioria destes métodos investiga proteínas ou grupos de proteínas específicas.

Alguns trabalhos têm demonstrado alteração na expressão de determinadas proteínas salivares em pacientes submetidos à RT em região de cabeça e pescoço. Laheij *et al.* (2015) comparou a expressão relativa de proteína e peptídeos na saliva parotídea de pacientes irradiados (n=9) em região de cabeça e pescoço com pacientes saudáveis não irradiados. Resultados demonstraram diferenças significativas encontradas na expressão relativa de uma ampla gama de proteínas e peptídeos como lisozima, histatinas, cistatina, proteína S100 e proteína rica em prolina na saliva da parótida de pacientes irradiados em comparação com controles saudáveis. Russo *et al.* (2016) investigou mudanças nas citocinas salivares pré e pós RT e observou aumento significativo de fator de crescimento epidérmico (EGF), *growth regulated oncogene* α , interleucina-1 α , interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6, interleucina-8, fator de necrose tumoral α (TNF α) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em pacientes com câncer em orofaringe após o tratamento radioterápico.

Um fator importante que deve ser considerado na avaliação dos biomarcadores salivares é o tabagismo. Segundo Lahdentausta *et al.* (2018), o

tabagismo recente, aquele em que o indivíduo abandona hábito de fumar há menos de um ano, representa um fator de confusão na avaliação da expressão de proteínas salivares da doença periodontal. Substâncias nocivas da fumaça do cigarro podem promover a redução da vascularização, diminuição do transporte e metabolismo do oxigênio e inibição dos sistemas enzimáticos, provocando inibição na cicatrização das feridas, além de provocar possíveis alterações na composição salivar (SILVERSTEIN *et al.*, 1992).

2.3 Biomarcadores salivares associados à remodelação óssea e reparo tecidual

A morfogênese e a remodelação óssea são processos fisiologicamente controlados que envolvem a síntese de matriz óssea pelos osteoblastos e reabsorção óssea pelos osteoclastos. Sabe-se que a radiação ionizante interfere no metabolismo ósseo, induzindo a diminuição da proliferação e diferenciação de osteoblastos, parada do ciclo celular, redução da produção de colágeno e aumento da sensibilidade aos agentes apoptóticos (DIDZIAK *et al.*, 2000; SAKURAI *et al.*, 2007).

2.3.1 Receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANK) e seu ligante (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG): eixo-chave no metabolismo ósseo

RANK é uma proteína transmembrana expressa em células precursoras de osteoclastos, a qual participa da diferenciação e ativação de osteoclastos (LIU *et al.*, 2010). A ativação de RANK se dá pela ligação de RANKL, o qual é uma proteína de membrana tipo II membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), encontrada na superfície de osteoblastos (HANADA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2010). OPG é um receptor de citocinas membro da superfamília do receptor do TNF e tem como ligante o RANKL (HANADA *et al.*, 2011; KEARNS, KHOSLA e KOSTENUIK, 2008; YASUDA *et al.*, 1998;). Portanto, OPG funciona como inibidor da osteoclastogênese e da reabsorção óssea, uma vez que compete com RANK pela ligação de RANKL (HANADA *et al.*, 2011; KEARNS, KHOSLA e KOSTENUIK, 2008).

Sendo assim, o eixo RANK/RANKL/OPG regula a formação de osteoclastos multinucleados a partir de seus precursores, bem como sua ativação e

sobrevivência na remodelação óssea normal e em uma variedade de condições patológicas (LIU *et al.*, 2010). É de extrema importância que o eixo RANK/RANKL/OPG atue em harmonia. O desequilíbrio desse sistema pode estar relacionado à deficiência na remodelação óssea causada por algumas condições patológicas, tais como osteoporose e metástase óssea (KEARNS, KHOSLA e KOSTENUIK, 2008).

Belibasakis e Bostanci (2012), através de uma revisão de literatura dos estudos clínicos e *in vivo* da expressão de RANK e OPG no tecido gengival, fluido crevicular, saliva e sangue, concluíram que o aumento da razão RANKL / OPG pode servir como um biomarcador que prevê o surgimento da periodontite.

Garlet *et al.* (2006) investigaram a possibilidade da correlação entre fatores osteoclásticos (RANKL), MMPs e seus respectivos inibidores com citocinas regulatórias e inflamatórias no curso da doença periodontal em ratos e os resultados correlacionaram a perda óssea e tecidual com a expressão de MMPs/TIMPs e RANKL/OPG no tecido gengival.

Níveis de biomarcadores salivares, dentre eles RANK e OPG, foram avaliados em indivíduos com peri-implantite na ausência ou presença de periodontite e na manutenção da terapia periodontal de suporte por cinco anos. Os resultados não evidenciaram diferença estatisticamente significativa dessas proteínas salivares entre os grupos do estudo. (GOMES *et al.*, 2019).

2.3.2 Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)

O EGF é um polipeptídeo de cadeia única, composto por 53 aminoácidos. Descoberto inicialmente nas glândulas submandibulares de camundongos, foi isolado originalmente a partir da urina baseado na sua capacidade de inibir a secreção gástrica, sendo também denominado urogastrona (COHEN, 1962).

Além do EGF exercer uma grande variedade de efeitos biológicos, também atua na proliferação e diferenciação de células mesenquimais e epiteliais. As atividades biológicas do EGF desencadeiam-se através de sua ligação ao seu receptor de membrana celular (EGFR), onde exerce um efeito mitogênico na maioria

dos tecidos epiteliais, fibroblastos e células endoteliais (BERLANGA-ACOSTA *et al.*, 2009).

O EGF está presente nos fluidos biológicos incluindo soro, urina e saliva (JOH *et al.*, 1986). A maior parte do EGF salivar é derivada das células acinares das glândulas parótidas, embora as glândulas submandibulares também contribuam para os níveis salivares da proteína (THESLEFF *et al.*, 1988). A proporção relativa de EGF nas glândulas parótida, submandibular e no restante das glândulas é de 6:4:1, respectivamente (INO *et al.*, 1993).

Algumas evidências indicam que a concentração fisiológica do EGF na saliva estimula a proliferação e migração de células epiteliais para a reparação tecidual quando a mucosa bucal é agredida (BERLANGA-ACOSTA *et al.*, 2009; OHSHIMA *et al.*, 2002). Além disso, exerce importante função na manutenção da continuidade anatômica da membrana da mucosa bucal e é considerado fator protetor da mesma (BALICKI, GRABOWSKA e CITKO, 2005).

Oton-Leite *et al.* (2015) avaliaram o efeito da laserterapia na mucosite oral quimioinduzida e mediadores inflamatórios salivares em pacientes com câncer em região de cabeça e pescoço. Dentre as moléculas salivares avaliadas, MMPs mostraram uma tendência de concentrações mais baixas nos pacientes submetidos à laserterapia, devido ao processo de inflamação menos exacerbado, já EGF e VEGF se mostraram em menor concentração, especialmente no início e no final do tratamento, sugerindo que o processo de cicatrização foi menos necessário nos pacientes submetidos à laserterapia.

Alguns estudos avaliaram a quantidade de EGF salivar durante o tratamento radioterápico e os resultados mostraram a redução da expressão de EGF no decorrer da terapia. Além disso, os autores correlacionam baixo nível de EGF com a mucosite oral severa, sugerindo o EGF como um fator de proteção do epitélio oral (DUMBRIGUE *et al.*, 2000; EPSTEIN *et al.*, 1997 e 2000).

Bernardes *et al.* (2010) mensuraram níveis de EGF salivar em pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas (CCE) oral antes e após cirurgia de ressecção do tumor primário. Os níveis de EGF salivar pré-cirúrgico mostraram significativamente menores comparados ao controle. Em 2011, Bernardes *et al.* identificaram níveis significativamente menores de EGF salivar nos pacientes com diagnóstico de CCE, em comparação com controle.

Em uma revisão sistemática e meta-análise, Normando *et al.* (2017) identificaram o EGF como um dos principais biomarcadores salivares relacionados ao desenvolvimento da mucosite oral em pacientes com câncer em região de cabeça e pescoço. Autores observaram diminuição dos níveis de EGF salivar durante a RT e associaram com o maior risco de desenvolvimento de mucosite oral, sugerindo o EGF como fator de proteção da mucosa oral. Além disso, outros estudos, citados nesta revisão, evidenciam que os baixos níveis de EGF salivar antes do início da RT podem representar maior risco de lesão da mucosa durante o tratamento radioterápico.

Basal *et al.* (2018) comprovaram efeito do EGF na promoção da microvascularização e formação óssea em osteonecrose em cabeça de fêmur e relataram o efeito mitogênico e angiogênico deste fator de crescimento, além de sua atuação na diferenciação osteoclástica e formação óssea.

2.3.3 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

VEGF pertence à família das proteínas hemodiméricas. Existem pelo menos 6 tipos de VEGF: A (VEGF), B, C, D, E e fator de crescimento placentário. VEGF A (VEGF) é a forma mais abundante e apresenta importante função na proliferação, migração e ativação das células endoteliais, bem como, na promoção da permeabilidade dos vasos sanguíneos (HU e OLSEN, 2016).

O VEGF tem grande atuação no desenvolvimento de vasos sanguíneos e linfáticos. Presente em quantidade significativa na saliva, o VEGF é um fator importante de reparo tecidual, podendo estar associado a grande capacidade de recuperação da mucosa oral. No entanto, o VEGF desenvolve seu papel em condições de saúde e, também, em condições patológicas, podendo estar associado ao crescimento tumoral e a metástase, devido à angiogênese e linfangiogênese estimulada. Ainda, segundo Upile *et al.* (2009), o VEGF presente na saliva pode estar associado à própria secreção de saliva, por meio da permeabilização de capilares intraglandulares.

O VEGF está intimamente envolvido no mecanismo de reparo ósseo, cujo primeiro estágio envolve formação de hematoma o qual possui propriedades pró-angiogênicas, devido principalmente à presença do VEGF. Com novos vasos

sanguíneos sendo formados, as células formadoras de tecido ósseo migram para a região a ser reparada. Além disto, o VEGF pode estimular as células endoteliais a produzir citocinas osteogênicas que vão promover a diferenciação de células em osteoblastos. Portanto, o VEGF possivelmente atua diretamente na função de osteoblastos, regulando quimiotaxia, proliferação e diferenciação de osteoblastos. Assim, o VEGF é indispensável para a angiogênese e osteogênese e é o principal agente que correlaciona os dois processos durante o reparo ósseo (STEGEN, VAN GASTEL e CARMELIET, 2015).

Em um estudo experimental, Zhang *et al.* (2011) pesquisaram a expressão do VEGF em mandíbulas irradiadas de coelhos durante a distração osteogênica. Resultados mostraram aumento nos níveis de VEGF em ossos de coelhos submetidos à RT.

Hassanshahi *et al.* (2017) mostraram em uma revisão de literatura, que estudos pré-clínicos sugerem a contribuição da ativação das vias de sinalização do VEGF na aceleração da recuperação e regeneração da microvascularização da medula óssea danificada pela radiação e / ou quimioterapia.

As funções do VEGF derivado de osteoblastos na cicatrização do defeito ósseo foram investigadas por Hu e Olsen (2016) através da detecção específica de VEGF derivados de osteoclastos em camundongos transgênicos, identificando diversas funções críticas em vários estágios do processo de reparo: recrutamento de macrófagos e respostas angiogênicas na fase inflamatória; angiogênese e osteogênese em áreas de reparo por ossificação intramembranosa; aumento da maturação e mineralização osteoblástica e formação de osteoclastos na fase final de remodelação do processo de reparo ósseo. Estas descobertas fornecem base para estratégias clínicas melhorarem a regeneração óssea e o tratamento de defeitos na cicatrização óssea.

Xu *et al.* (2017) relacionam o VEGF com o processo de angiogênese e regeneração óssea. Já Tong *et al.* (2018) relataram o efeito deletério da radiação nas células endoteliais derivadas da medula óssea, promovendo a inibição do VEGF A, resultando na redução da angiogênese e ativação direta ou indireta dos osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea.

2.3.4 Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP-9)

MMPs são endopeptidases que desempenham diversas funções como regulação de células de crescimento e da apoptose; alteração da motilidade celular e da resposta imune; modulação da bioatividade das citocinas e quimiocinas. As MMPs são sintetizadas por diversos tipos celulares como células epiteliais, fibroblastos e células inflamatórias e apresentam o íon zinco (Zn) em sua composição. A ativação das MMPs ocorre pela remoção do peptídeo terminal amino, ou seja, quebra da ligação do íon Zn. O nível dessas enzimas é determinado basicamente por três fatores: expressão gênica, localização e ativação do zimogene e expressão dos TIMPs (AL-DASOOQI *et al.*, 2009; ORTEGA *et al.*, 2003).

As MMPs são enzimas que mediam alteração proteolítica da matriz extracelular, permitindo o remodelamento tecidual, inclusive o tecido ósseo, e liberação de moléculas sinalizadoras angiogênicas (VANDOOREN, VAN DEN STEEN e OPDENAKKER, 2013). Elas são classificadas de 1 a 28 e divididas em cinco classes de acordo com o substrato que produzem: colagenase (MMP 1,8,13), gelatinase (MMP 2,9), estromelase (MMP 3,10 e 11) e outras (AL-DASOOQI *et al.*, 2009).

Segundo Ortega *et al.* (2003), MMP-9 pode estar relacionada ao recrutamento e mobilização de precursores hematopoiéticos, angiogênese e hematopoiese e sugerem que MMPs estão envolvidas em eventos de regulação e desenvolvimento ósseo normal, reparo e hemostasia, desordens e patologias ósseas.

Al-Dasooqi *et al.* (2009), através de uma revisão de literatura, descreveram os mecanismos de desenvolvimento da mucosite, bem como o papel das MMPs no tecido normal, lesão tecidual e inflamação. Estudos têm evidenciado diversas funções de sinalizações das MMPs no processo de desenvolvimento da mucosite e sugere investigação da expressão oral dessas proteínas em pacientes submetidos à quimioterapia (BOWEN *et al.*, 2007; SONIS *et al.*, 2007). Portanto, MMPs têm se mostrado componente chave no desenvolvimento da mucosite quimioinduzida. Apesar de fortes evidências, são necessários estudos para definir a função das MMPs nas alterações epiteliais e fisiológicas observadas na mucosite (AL-DASOOQI *et al.*, 2009).

Existem ligações funcionais entre a formação, estrutura e remodelagem de vasos sanguíneos neo-formados e a MMP-9. Fenótipos vasculares parecem envolver a atividade catalítica de MMP-9, resultando na clivagem de componentes da matriz extracelular (colágeno) e processamento de quimiocinas angiogênicas (Ligante de quimiocina CX-5, 6 e 8) ou liberação de citocinas angiogênicas (VEGF e fator de crescimento fibroblástico) (VANDOOREN, VAN DEN STEEN e OPDENAKKER, 2013).

A MMP-9 também tem papel na manutenção e remodelação ósseas. MMP-9 é indispensável para a migração de osteoclastos e pré-osteoclastos através do colágeno em ossos longos (BLAVIER e DELAISSE, 1995; PAIVA *et al.*, 2017). Uma vez iniciada a diferenciação de osteoclastos pelo RANK-L, estas células produzem continuamente MMP-9 (YU *et al.*, 2003). O papel de MMP-9 na manutenção da estrutura óssea está relacionado especificamente à manutenção da arquitetura óssea trabecular, tendo sido demonstrado que ausência de MMP-9 levou a aumento da densidade trabecular em fêmurs mais frágeis em camundongos (NYMAN *et al.*, 2011)

Estudo em animais demonstrou aumento da expressão da MMP9 em alvéolos de ratos em uso de ácido zoledrônico após a extração dental, sugerindo que o ácido zoledrônico apresenta efeito geral na expressão das MMPs, devido ao aumento do número de osteoclastos e/ou sua indução (BASI *et al.*, 2011).

Vuotila *et al.* (2002) investigaram a presença e atividade proteolítica da MMP-8 e MMP-9 na saliva total de pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e avaliaram a influência do pH salivar na atividade de MMP-8 e MMP-9 na tentativa de identificar possível associação entre MMP-8 e MMP-9 e o surgimento de lesões da mucosa bucal durante a RT. Neste estudo, não identificaram correlação entre MMP-8 e MMP-9 salivar e presença de lesão oral induzida por radiação, mas sugere influência do pH na ativação da MMP-9.

Os mecanismos de ações e os papéis exercidos pelos diferentes tipos de MMPs são relatados por Paiva *et al.* (2017). A MMP-9 é considerada a MMP de maior expressão. MMP-9 pode ser secretada pelos osteoclastos, sua expressão está ligada à modulação do RANKL e participa da degradação da matriz extracelular. Os autores ainda relatam a atuação da MMP-9 na ativação de alguns fatores de crescimento, participação do recrutamento de osteoclastos, relação com a

progressão do câncer e degradação da matriz óssea mineralizada, além de atuar na inibição de osteoclastos induzidos por VEGF.

Moraschini *et al.* (2019), através de uma revisão sistemática, listaram onze biomarcadores com maiores evidências de associação ao diagnóstico e severidade das *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws* (MRONJ), dentre eles o VEGF e MMP-9. Porém, baixas evidências clínicas sustentam o uso desses biomarcadores no prognóstico e diagnóstico das MRONJs, sugerindo futuras pesquisas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Dosar e comparar a concentração de RANK, RANK-L, OPG, EGF, VEGF e MMP-9 na saliva de pacientes submetidos à radioterapia em região de cabeça e pescoço e indivíduos-controle não submetidos à radioterapia

3.2 Objetivos específicos

1. Quantificar o volume de saliva não estimulada em pacientes submetidos à radioterapia em região de cabeça e pescoço e em indivíduos-controle não submetidos à radioterapia.

2. Comparar as dosagens dos biomarcadores entre os pacientes que receberam apenas radioterapia com aqueles tratados com radioterapia e quimioterapia.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos e legais

Trata-se de um estudo transversal. O presente projeto de pesquisa, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número 85229518.9.0000.5149.

4.2 Seleção dos Participantes

Pacientes submetidos à RT para tratamento de neoplasias de cabeça e pescoço atendidos no Projeto de Extensão “Atendimento de suporte odontológico ao paciente com câncer em região de cabeça e pescoço”, da Faculdade de Odontologia da UFMG foram selecionados prospectivamente no período de abril a novembro de 2018.

Neste Projeto de Extensão são feitos, em média, 700 atendimentos ao ano, dos quais aproximadamente 500 envolvem pacientes no período pós-irradiação. Considerando-se que 50% dos atendimentos são consultas de retorno, estimou-se um universo de 250 pacientes elegíveis / ano. Considerando o tempo de duração do estudo, aplicação dos critérios de exclusão e possíveis perdas, estimou-se uma amostra final de 30 pacientes e 30 controles para o presente estudo.

Os critérios de inclusão adotados foram: paciente com diagnóstico de neoplasia maligna em região de cabeça e pescoço histologicamente confirmado; tratamento oncológico finalizado, o qual incluiu RT da região de cabeça e pescoço com ou sem quimioterapia associada; estar disponível no prazo de duração do estudo; concordar e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pacientes com sinais clínicos de periodontite, com tumores recidivantes, comunicação buco-nasal ou buco-sinusal, portadores de imunodeficiência humana (HIV) ou doenças autoimunes, submetidos a procedimentos odontológicos invasivos há menos de um mês, em uso atual ou prévio de bifosfonatos, em uso de anti-inflamatórios, antibióticos ou anti-fúngicos no momento da coleta ou até um mês

antes, portadores de doenças sistêmicas não controladas (hipertensão arterial, diabetes mellitus) e pacientes cujo volume salivar coletado foi insuficiente para as análises propostas foram excluídos do estudo.

Indivíduos sistemicamente saudáveis nunca expostos à RT formaram o grupo de comparação (controle). Realizou-se pareamento de sexo e idade com os pacientes. Foram selecionados indivíduos que compareceram como acompanhantes nas clínicas da Faculdade de Odontologia da UFMG. Os mesmos critérios de exclusão foram aplicados.

Todos os indivíduos selecionados e que concordaram em participar do estudo passaram por avaliação odontológica e preenchimento de ficha clínica com dados demográficos (APÊNDICE A). Todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os dados relacionados à ORN foram atualizados na data final de coleta das amostras de saliva, por meio de consulta ao prontuário odontológico dos pacientes.

4.3 Coleta de saliva

A coleta de saliva foi realizada na primeira consulta, sempre no mesmo horário (entre 14 e 16 horas), em ambiente de consultório odontológico, na posição assentada.

Os pacientes efetuaram inicialmente um bochecho com 5 ml de água destilada por 1 minuto (min). Aos usuários de próteses removíveis, foi solicitada a sua remoção. Realizou-se, então, a coleta da saliva total não estimulada. O paciente foi orientado a deixar acumular na boca toda a saliva por 5 min e posteriormente cuspir em um tubo Falcon 50 ml estéril acomodado em isopor com gelo. A amostra foi conduzida até o laboratório, onde o volume total de saliva foi aferido. A saliva foi então centrifugada (1500 rotações por minutos [rpm] / 10 min / 4 °C). Ao volume final de sobrenadante foi acrescentada solução tamponada com fosfato (PBS) contendo inibidores de protease (0.1 mmol/L de fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF], 0.1 mmol/L de cloreto benzetônio, 10 mmol/L de ácido etilenodiamino tetra-acético [EDTA], 0.01mg/ml de aprotinina e 0,05 % de Tween20), na proporção 1:1 volume. A mistura final foi aliquoteada e armazenada em freezer à -80°C.

4.4 ELISA

A técnica de ELISA sanduíche foi utilizada para dosagem das proteínas RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF e MMP-9. Os kits de reagentes usados para os testes estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Kits utilizados para teste ELISA

	Fabricante	Código	Lote
RANK	Duo-Set, R&Dsystems®, Minneapolis	DY683	1287992
RANKL	PrepoTech®	900-K142	612142
OPG	Duo-Set, R&Dsystems®, Minneapolis	DY805	1283328
EGF	Duo-Set, R&Dsystems®, Minneapolis	DY236	127939
VEGF	Duo-Set, R&Dsystems®, Minneapolis	DY293B	1279390
MMP-9/TIMP-2	Duo-Set, R&Dsystems®, Minneapolis	DY1453	1271433

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019

O protocolo do experimento é apresentado de forma resumida abaixo:

- 1- Sensibilização das placas com anticorpo de captura, incubação 18 horas 4°C, seguida de lavagem.
- 2- Adição de tampão de bloqueio (albumina sérica bovina [BSA] 1%), 1 hora, seguida de lavagem.
- 3- Adição de 50 microlitros (uL) das amostras e controles.
- 4- Incubação por 18 horas 4°C, seguida de lavagem.
- 5- Adição de 100 µl de anticorpo de detecção.
- 6- Incubação por 2 horas em temperatura ambiente, seguida por lavagem.
- 7- Adição de 100 µl de conjugado estreptavidina-peroxidase.
- 8- Incubação por 20 min em temperatura ambiente, seguida por lavagem.
- 9- Adição de 100 µl de cromógeno (OPD).

10-Incubação das placas no escuro em temperatura ambiente com controle visual.

11-Adição de 50 µl de solução ácido sulfúrico (H₂SO₄).

12-Leitura em espectrofotômetro, absorvância de 490 nanômetros.

4.5 Análise estatística

A elaboração do banco de dados e a análise estatística foram realizados nos programas SPSS® 19.0 e GraphPad Prism® 7.0. Foi realizada análise descritiva dos dados (frequência absoluta e relativa), com indicadores de tendência central e dispersão (média, mediana, mínimo, máximo e desvio-padrão). O Teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das amostras (n<50). Em seguida, os testes utilizados para as respectivas comparações foram:

- 1- Biomarcadores salivares em pacientes irradiados X grupo controle (não irradiados): teste de Wilcoxon (não paramétrico) ou teste T pareado (paramétrico).
- 2- Biomarcadores salivares em pacientes apenas irradiados X pacientes irradiados e com quimioterapia: teste de Mann-Whitney (não paramétrico) ou teste T (paramétrico).
- 3- Características clínicas e demográficas dos pacientes apenas irradiados X pacientes irradiados e com quimioterapia: teste qui-quadrado (variáveis categóricas) ou teste T (variáveis contínuas).

A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Foram selecionados 31 pacientes, porém dois foram excluídos por não terem volume suficiente de saliva para realização da análise de pelo menos um biomarcador. Portanto, a amostra final foi composta de 29 pacientes, sendo que 13 receberam RT e 16 receberam RT associada à quimioterapia. Os dados clínicos e demográficos dos pacientes incluídos no estudo estão detalhados na Tabela 3.

Considerando a amostra total, os pacientes foram predominantemente do sexo masculino (75,9%) com média de idade 59,9 anos, apenas um (3,4%) residente na zona rural. A localização mais comum do tumor primário foi orofaringe (24,1%), seguida de soalho de boca (20,7%) e laringe (20,7%). O principal diagnóstico histopatológico das lesões foi carcinoma de células escamosas (CCE) (89,7%). O estadiamento T foi em sua maioria 3 e 4 (31 % cada) e o estadiamento N a maioria foi 0 (37,9%) ou 2 (34,5%). A média da dose total de radiação foi 61,7 Gy. A média de meses de término da RT foi de 19,7 meses, com mínimo de um mês e máximo de 99 meses. Hospital Mário Penna (27,6%), Luxemburgo e Baleia (17,2% cada) lideraram as unidades de origem dos pacientes desse estudo. A maioria dos pacientes apresentaram tabagismo prévio (75,9%) e etilismo social prévio (51,7%). A média de dentes presentes em boca foi de 14 e 24,1% faziam uso de prótese removível. Apenas dois pacientes apresentaram histórico de ORN, com tratamento prévio à coleta de saliva, sem sinais ou sintomas de ORN no momento da coleta de saliva. Nenhum paciente desenvolveu ORN ao longo da pesquisa. 37,9% apresentaram alterações sistêmicas dignas de nota, sendo a mais frequente hipertensão arterial controlada (20,7%). As características clínicas e demográficas dos pacientes apenas irradiados (n=13) e pacientes que receberam quimioterapia e RT (n=16) foram semelhantes ($p>0,05$), exceto para localização do tumor, cirurgia e número de dentes presentes em boca ($p<0,05$) (TABELA 3).

Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço

		Pacientes (total) n=29		Radioterapia n=13		Radioterapia+ Quimioterapia n=16		Valor p (x ²)
		N	%	N	%	n	%	
Sexo	Masculino	22	75,9	10	76,9	12	75	0,904
	Feminino	7	24,1	3	23,1	4	25	
Idade	Média	59,9		61,9		58,1		0,142 ^a
	Mediana	60		62,0		57		
	Mínimo	46		49		46		
	Máximo	71		71		70		
Idade	5 ^a década	3	10,3	1	7,7	2	12,5	0,329
	6 ^a década	9	31,0	2	15,4	7	43,8	
	7 ^a década	15	51,7	9	69,2	6	37,5	
	8 ^a década	2	6,9	1	7,7	1	6,3	
Cidade	Belo Horizonte	19	65,5	9	69,2	10	62,5	0,895
	Região Metropolitana	7	24,1	3	23,1	4	25	
	Outras cidades de Minas Gerais	3	10,3	1	7,7	2	12,5	
Residência	Zona Urbana	28	96,6	13	100	15	93,8	0,359
	Zona Rural	1	3,4	0	0	1	6,3	
Localização Tumor Primário	Orofaringe, exceto amígdala	7	24,1	2	15,4	5	31,3	0,070
	Soalho de boca	6	20,7	5	38,5	1	6,3	
	Laringe	6	20,7	2	15,4	4	25	
	Amígdala	2	6,9	0	0	2	12,5	
	Gengiva	2	6,9	2	15,4	0	0	
	Nasofaringe	2	6,9	0	0	2	12,5	
	Língua	2	6,9	2	15,4	0	0	
	Órbita	1	3,4	0	0	1	6,3	
Seio Piriforme	1	3,4	0	0	1	6,3		
Localização	Boca	10	34,5	9	69,2	1	6,3	0,002*

primária Tumor Região	do —	Orofaringe	9	31	2	15,4	7	43,8	
		Outros	10	34,5	2	15,4	8	50	
Classificação Histológica		Carcinoma de células escamosas	26	89,7	11	84,6	15	93,8	0,342
		Linfoma	1	3,4	0	0	1	6,3	
		Adenocarcinoma	1	3,4	1	7,7	0	0	
		Carcinoma Adenoide Cístico	1	3,4	1	7,7	0	0	
Estadiamento Tamanho do Tumor (T)		1	2	6,9	2	15,4	0	0,0	0,137
		2	7	24,1	1	7,7	6	37,5	
		3	9	31,0	5	38,5	4	25,0	
		4	9	31,0	4	30,8	5	31,3	
		Faltante	2	6,9	1	7,7	1	6,3	
Estadiamento Linfonodo (N)		0	11	37,9	5	38,5	6	37,5	0,462
		1	4	13,8	2	15,4	2	12,5	
		2	10	34,5	5	38,5	5	31,3	
		3	3	10,3	0	0	3	18,8	
		Faltante	1	3,4	1	7,7	0	0	
Cirurgia		Sim	23	79,3	13	62,5	10	37,5	0.013*
		Não	6	20,7	0	0	6	100	
Hospital origem	de	Mário Penna	8	27,6	5	38,5	3	18,8	0,185
		Luxemburgo	5	17,2	0	0	5	31,3	
		Hosp. Clínicas	4	13,8	2	15,4	2	12,5	
		Baleia	5	17,2	3	23,1	2	12,5	
		São Francisco	2	6,9	2	15,4	0	0	
		Vera Cruz	1	3,4	0	0	1	6,3	
		Felício Rocho	1	3,4	0	0	1	6,3	
		Vila da Serra	1	3,4	0	0	1	6,3	
		Luxemburgo e Mário Pena	1	3,4	0	0	1	6,3	
		Centro de Radio Oncologia de Minas gerais	1	3,4	1	7,7	0	0	
Dose (Gy)	Total	Média	61,7		59		64		0,063 ^a
		Mediana	60		60		66		
		Mínimo	46		46		50		
		Máximo	70		68		70		

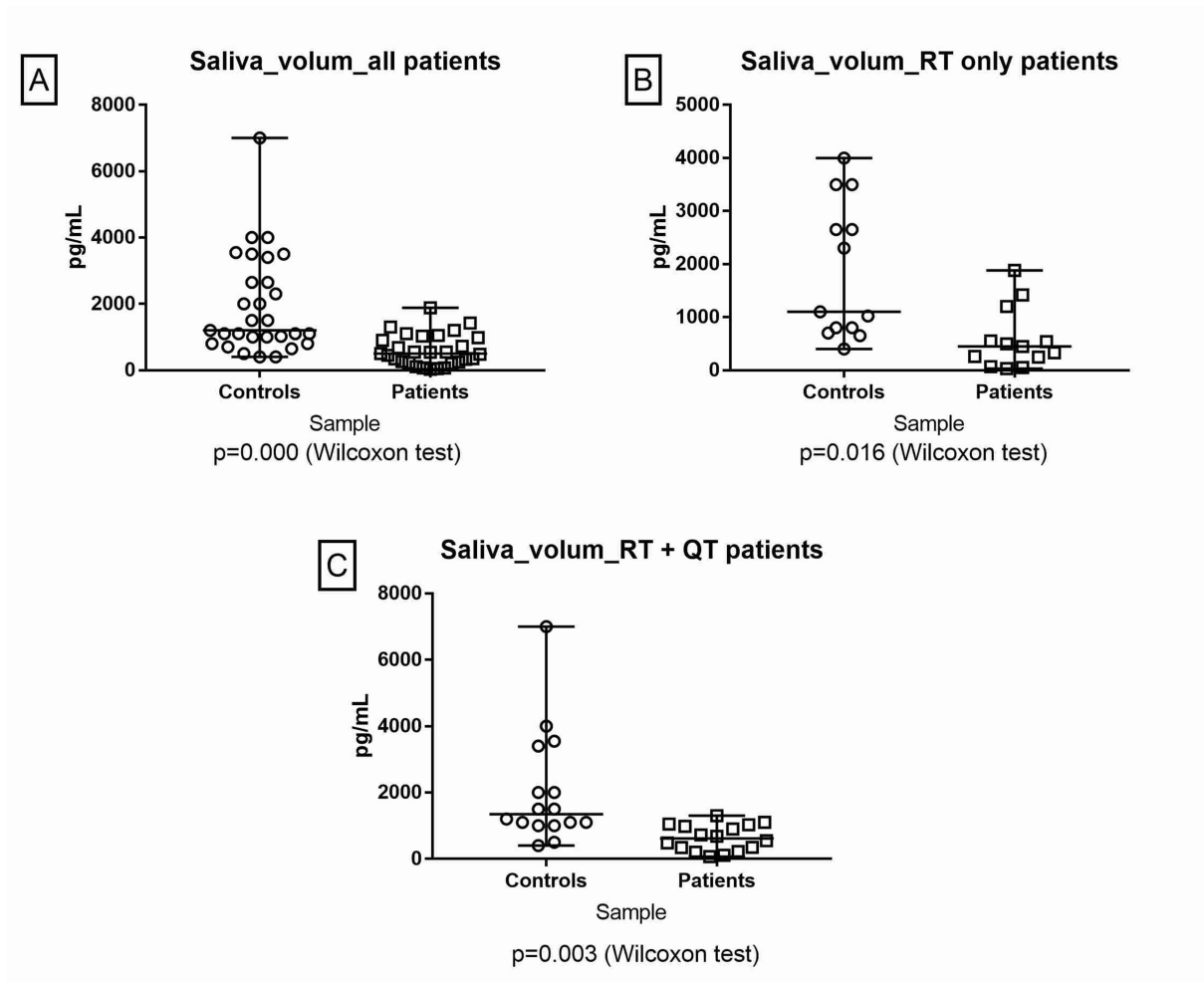
Doenças sistêmicas (Diagnóstico)	Não Relatou	18	62,1	7	53,8	11	68,8	0,177
	Hipertensão	6	20,7	5	38,5	1	6,3	
	Diabetes	2	6,9	0	0	2	12,5	
	Outras doenças endócrinas	2	6,9	1	7,7	1	6,3	
	Outra doença cardiovascular	1	3,4	0	0	1	6,3	
Doença sistêmica	Sim	11	37,9	6	46,2	5	31,3	0,411
	Não	18	62,1	7	53,8	11	68,8	
Tabagismo	Nunca	5	17,2	2	15,4	3	18,8	0,385
	Sim, prévio	22	75,9	11	84,6	11	68,8	
	Sim, atual	2	6,9	0	0	2	12,5	
Etilismo	Nunca	7	24,1	4	30,8	3	18,8	0,549
	Sim, social prévio	15	51,7	7	53,8	8	50	
	Sim, social atual	7	24,1	2	15,4	5	31,3	
Número de Dentes	Média	14		9		18		0,013 *a
	Mediana	14		7		20		
	Mínimo	0		0		0		
	Máximo	30		24		30		
Prótese Removível	Não	22	75,9	9	69,2	13	81,3	0,452
	Sim	7	24,1	4	30,8	3	18,8	
ORN	Nunca	27	93,1	13	100	14	87,5	0,186
	Sim, prévia e resolvida	2	6,9	0	0	2	12,5	
Meses de término da Radioterapia	Média	19,7		19,6		19,8		0,981 ^a
	Mediana	11		12		8		
	Mínimo	1		3		1		
	Máximo	99		48		99		

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. ^a Teste T

O volume salivar foi significativamente menor nos pacientes que nos controles ($p < 0,05$, teste de Wilcoxon) (GRÁFICO 1). Não houve diferença em

relação ao volume salivar ao comparar pacientes irradiados com pacientes que receberam RT e quimioterapia ($p=0,456$, Teste de Mann-Whitney).

Gráfico 1 - Comparação volume salivar entre pacientes irradiados e grupo controle.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019

A análise de normalidade dos biomarcadores demonstrou distribuição normal apenas para EGF, sendo os demais de distribuição não-normal.

A Tabela 4 e o Gráfico 2 apresentam os resultados para as dosagens dos biomarcadores. A comparação das dosagens entre os pacientes ($n= 29$) e os controles não irradiados não revelou diferenças estatisticamente significantes para RANK, OPG e VEGF ($p > 0,05$). Os valores de EGF ($p=0,000$) e MMP-9 ($p=0,014$) foram maiores nos controles que nos pacientes. A dosagem de RANK-L foi maior nos controles, com valor marginal de p ($0,051$).

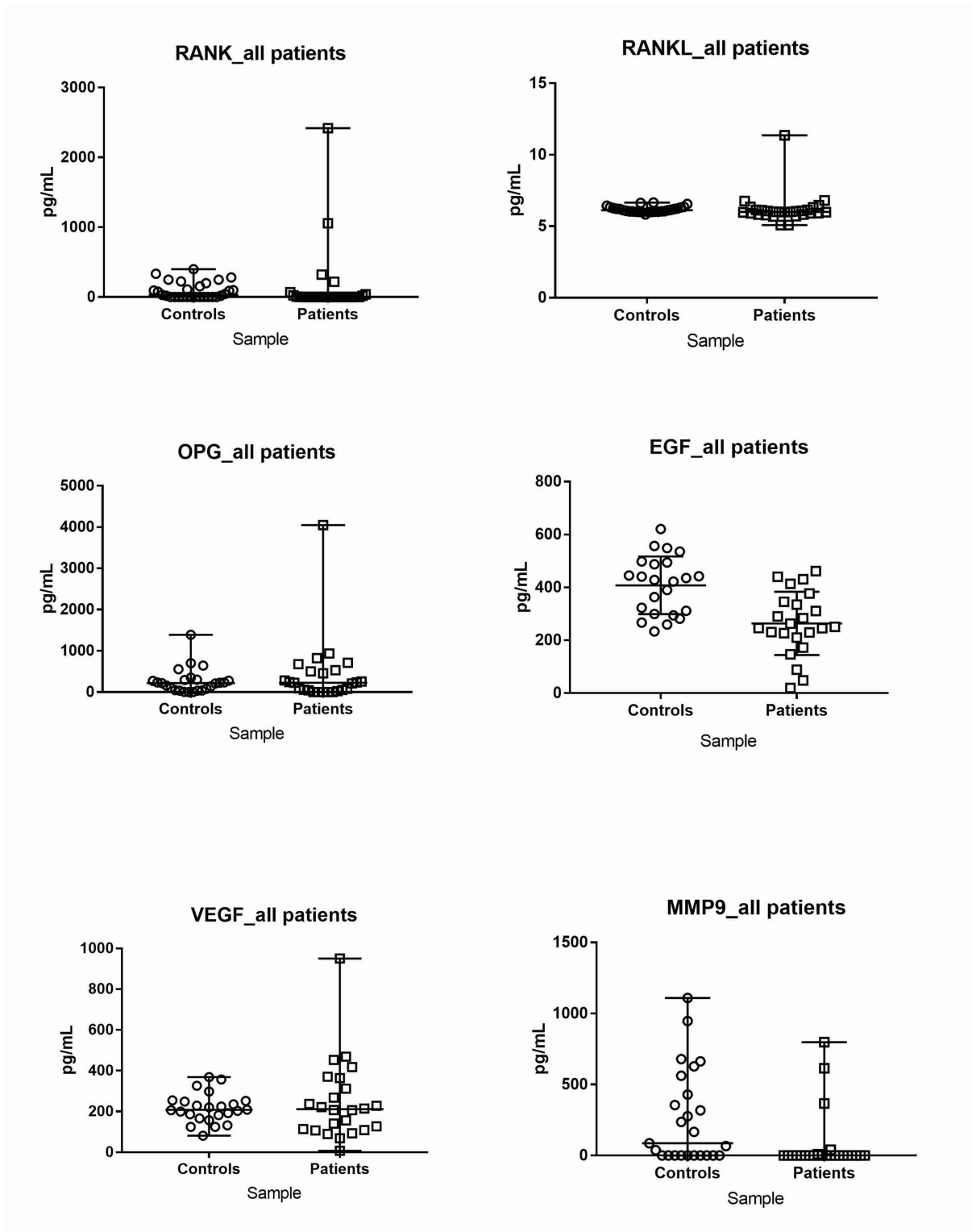
Tabela 4. Comparação das dosagens salivares (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF e MMP-9 em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e indivíduos não irradiados

		Controle	Paciente	Valor p ^a
RANK n= 29	Mediana	30,3	0,0	0,247
	Mínimo	0,0	0,0	
	Máximo	397,7	2418,0	
RANK-L n=28	Mediana	6,1	6,0	0,051
	Mínimo	5,8	5,1	
	Máximo	6,7	11,4	
OPG n=25	Mediana	220,4	228,4	0,692
	Mínimo	0,0	0,0	
	Máximo	1391,0	4049,0	
EGF n=23	Média	407,9	263,9	0,000*
	Desvio-padrão	109,2	119,6	
VEGF n=24	Mediana	207,6	210,8	0,941
	Mínimo	81,3	6,7	
	Máximo	369,0	950,1	
MMP-9 n=25	Mediana	87,3	0,0	0,014*
	Mínimo	0,0	0,0	
	Máximo	1109,0	798,3	

^aTeste de Wilcoxon, exceto EGF, cujo teste foi o teste T pareado

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Gráfico 2 - Dosagens salivares (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF e MMP-9 em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço (n=29) e indivíduos não irradiados



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Ao comparar os resultados dos pacientes que receberam apenas RT (n=13) com os indivíduos controle não irradiados, não houve diferença estatisticamente significativa para dosagem de RANK, RANKL, OPG e VEGF ($p > 0,05$); já EGF ($p=0,003$) e MMP-9 ($p=0,031$) apresentaram diferença estatisticamente significativa (TABELA 5, GRÁFICO 3). Ao compararmos pacientes que receberam RT e quimioterapia (n=16) com o controle observa-se diferença estatisticamente significativa apenas para dosagem de EGF ($p=0,031$) (TABELA 5, GRÁFICO 4). Para todas as comparações, as dosagens foram maiores no grupo controle.

Tabela 5 - Comparação da dosagem salivar (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF, MMP-9 entre os pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço que receberam ou não quimioterapia e indivíduos não irradiados.

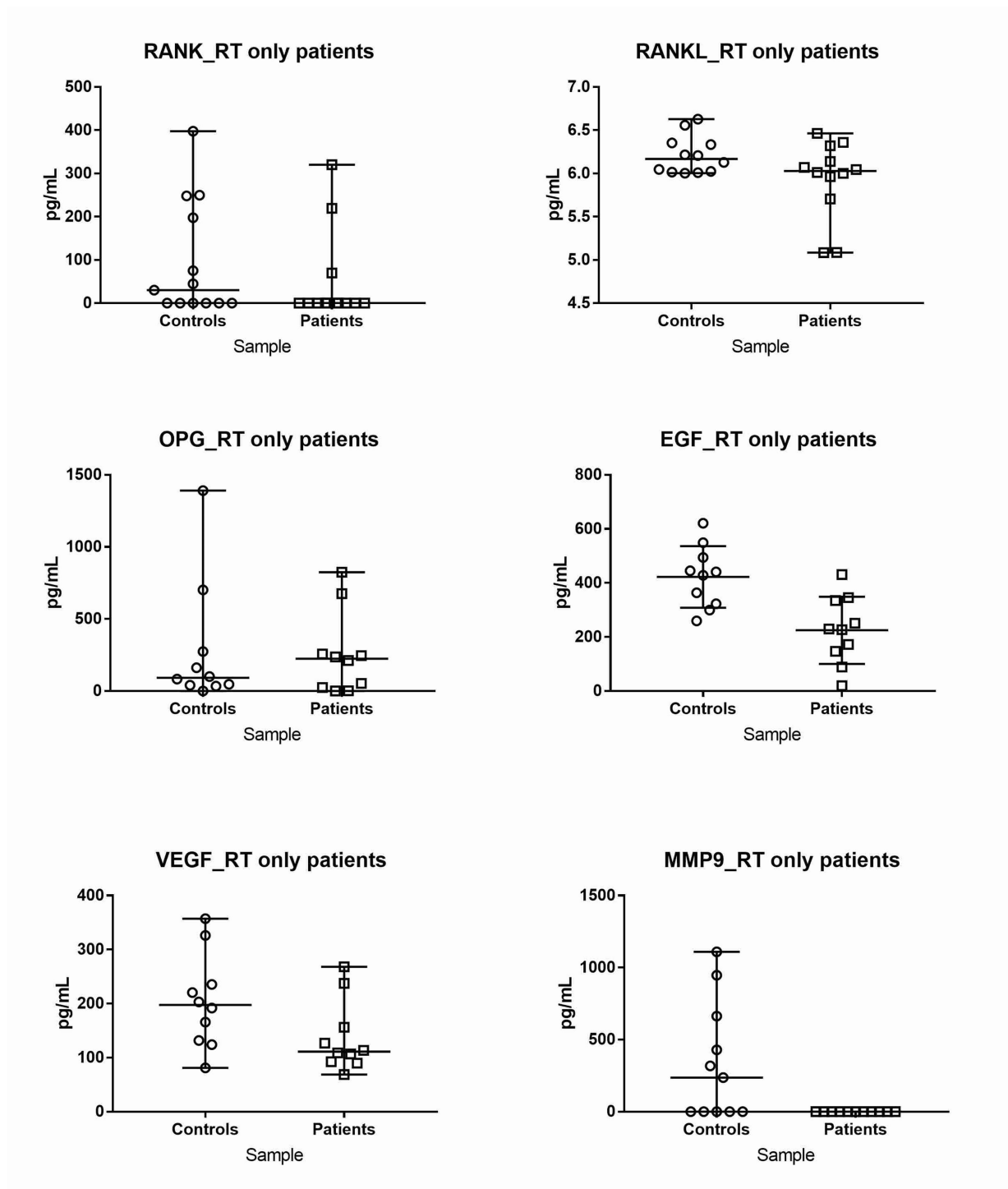
	Radioterapia			Radioterapia + Quimioterapia		
	Controle	Paciente	Valor p ^a	Controle	Paciente	Valor p ^a
RANK		n=13	0,375		n=16	0,497
Mediana	30,3	0,0		54,6	0,0	
Mínimo	0,0	0,0		0,0	0,0	
Máximo	397,7	320,2		332,8	2418	
RANK-L		n=12	0,129		n=16	0,211
Mediana	6,2	6,0		6,1	6,0	
Mínimo	6,0	5,1		5,8	5,7	
Máximo	6,6	6,5		6,7	11,4	
OPG		n=10	0,625		n=15	0,639
Mediana	91,8	224,7		234,8	228,4	
Mínimo	1,2	0,0		0,0	0,0	
Máximo	1391	824,3		645,1	4049	
EGF		n=10	0,003*		n=13	0,031*
Média	422,5	224,7		396,8	294,0	
Desvio-padrão	113,8	124,4		108,8	111,1	
VEGF		n=10	0,084		n=14	0,191
Mediana	197,5	111,2		216,8	270,2	

Mínimo	81,3	68,7		124,6	6,7	
Máximo	357,2	268		369	950,1	
MMP-9		n=11	0,031*	n=14		0,244
Mediana	236,9	0,0		76,8	0,0	
Mínimo	0,0	0,0		0,0	0,0	
Máximo	1109	0,0		679,2	798,3	

^aTeste de Wilcoxon, exceto EGF, cujo teste foi o teste T pareado.

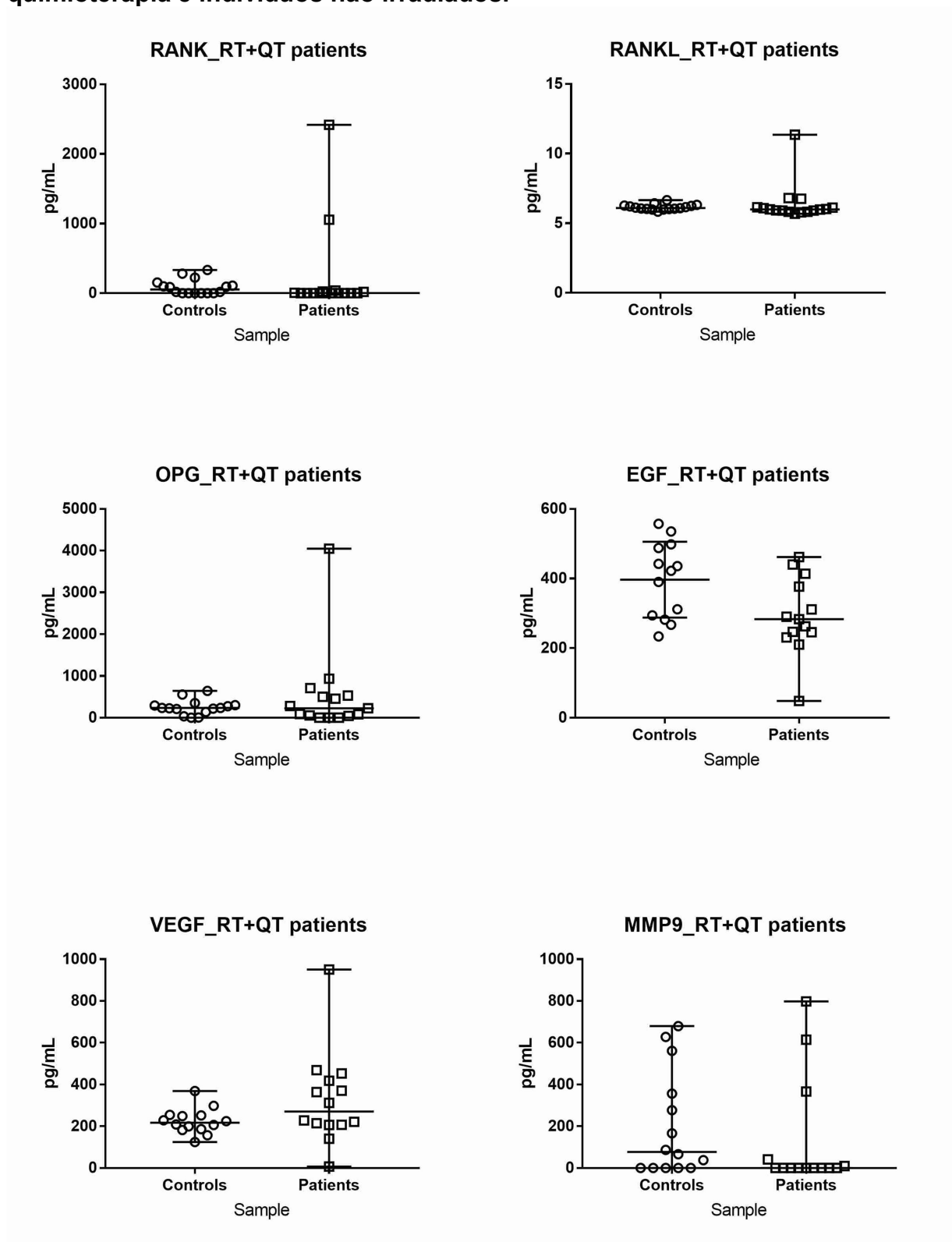
Fonte: Elaborado pelo autor, 2019

Gráfico 3 - Dosagem salivar (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF, MMP-9 entre os pacientes apenas irradiados em região de cabeça e pescoço e controle



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Gráfico 4 - Dosagem salivar (pg/ml) de RANK, RANKL, OPG, EGF, VEGF, MMP-9 entre os pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço que receberam quimioterapia e indivíduos não irradiados.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A comparação das dosagens dos biomarcadores entre pacientes que receberam apenas RT (n=13) e os pacientes que receberam RT e quimioterapia (n=16) revelou diferença apenas para VEGF ($p=0,006$) e MMP-9 (0,003), sendo que MMP-9 não foi detectada nas amostras dos pacientes apenas irradiados (TABELA 5).

6 DISCUSSÃO

Resultados deste estudo evidenciaram que o volume salivar foi significativamente menor nos pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço quando comparados aos pacientes não irradiados saudáveis. As dosagens de EGF e MMP-9 salivar foram menores nos pacientes submetidos à RT quando comparados ao grupo controle, enquanto a dosagem dos demais biomarcadores salivares investigados (RANK, RANKL, OPG e VEGF) não apresentaram diferença estatisticamente significante entre os grupos.

Um dos efeitos primários da radiação em região de cabeça e pescoço é o dano funcional e estrutural às glândulas salivares com consequente redução da quantidade e alteração da qualidade da saliva (STONE *et al.*, 2003; VISSINK *et al.*, 2003). Estas alterações tornam a cavidade oral mais susceptível a doenças bucais, como cárie de progressão rápida, gengivite, periodontite, infecções oportunistas e ORN, tendo em vista a função protetora do fluido salivar (ASIKAINEN *et al.*, 2017; JANSMA *et al.*, 1992). Estes efeitos tardios da RT impactam drasticamente na qualidade de vida desses pacientes (COOPER *et al.*, 1995; NABIL e SAMMAN, 2011).

A baixa concentração do EGF salivar encontrada nos pacientes irradiados da pesquisa pode ser explicada pela degeneração das estruturas acinares provocadas pelo efeito da radiação ionizante, uma vez que maior parte do EGF salivar é derivado das células acinares das glândulas salivares, principalmente parótida (INO *et al.*, 1993). Alguns autores relataram resultados semelhantes, evidenciando a diminuição do EGF salivar durante o tratamento radioterápico e correlacionando sua diminuição com o aumento do risco de desenvolvimento da mucosite oral durante a RT, considerando o EGF como fator de proteção da mucosa oral (DUMBRIGUE *et al.*, 2000; EPSTEIN *et al.*, 1997 e 2000; NORMANDO *et al.*, 2017; OTON-LEITE *et al.*, 2015).

Resultados do presente estudo demonstraram a redução de EGF após a RT, na ausência de mucosite, comprovando a permanência dos efeitos da radiação nos níveis de EGF mesmo após o término da RT. Bernardes *et al.* (2011) identificaram níveis significativamente menores de EGF salivar nos pacientes com

diagnóstico de CCE, em comparação com controle. Na presente pesquisa observamos menores níveis de EGF em pacientes pós RT e a maioria dos indivíduos da amostra (89,7%) apresentaram diagnóstico histopatológico confirmado de CCE. Russo *et al.* (2016) encontraram resultados opostos, relatando aumento significativo de EGF salivar pós RT, porém foram investigados apenas pacientes com câncer em orofaringe e a mensuração da dosagem dos biomarcadores foi 12 meses após o término da RT em todos pacientes da amostra. A redução do EGF, conseqüentemente, inibe a estimulação da proliferação de fibroblastos e células epiteliais na mucosa oral (BERLANGA-ACOSTA *et al.*, 2009), podendo afetar o processo de reparo tecidual.

EGF também é importante para a síntese das MMPs (ORTEGA *et al.*, 2003), podendo estar associado à redução da dosagem de MMP-9 encontrada nos pacientes neste estudo. Paiva *et al.* (2017) e Ortega *et al.* (2003) relataram o papel da MMP-9 no recrutamento dos osteoclastos e pré-osteoclastos, promovendo a reabsorção óssea. Nyman *et al.* (2011) mostraram que a ausência de MMP-9 levou a um aumento da densidade trabecular e conseqüente fragilidade óssea em fêmur de camundongos, evidenciando a participação da MMP-9 na manutenção da arquitetura óssea trabecular. Portanto, a baixa dosagem de EGF e MMP-9 após a RT sugere maior susceptibilidade ao dano tecidual e redução no processo de cicatrização, uma vez que o EGF participa do reparo epitelial (BERLANGA-ACOSTA *et al.*, 2009) e a MMP-9 atua na degradação da matriz de colágeno (PAIVA *et al.*, 2017). Uma vez que a MMP-9 está diretamente relacionada ao metabolismo ósseo (NYMAN *et al.*, 2011), sua baixa concentração salivar em pacientes irradiados identificada em nosso estudo também pode estar associada ao comprometimento do processo de remodelação óssea nestes pacientes, tornando o osso alveolar menos responsivo às injúrias e infecções.

O RANK é uma proteína transmembrana expressa na parede dos osteoclastos; o RANK-L é o seu ligante responsável pela ativação e diferenciação dos osteoclastos (HANADA *et al.*, 2011; LUI *et al.*, 2010); o OPG compete com RANK-L pela ligação RANK (HANADA *et al.*, 2011). RANK/RANK-L/OPG atuando em harmonia são essenciais para o equilíbrio do processo de remodelação óssea (KEARNS, KHOSLA e KOSTENUIK, 2008). Alguns estudos mostram a relação entre perda óssea e tecidual periodontal e a razão RANK-L/OPG (BELIBASAKIS e

BOSTANCI, 2012; GARLET *et al.* 2006). Os resultados do presente estudo não evidenciaram diferença significativa entre as dosagens desses biomarcadores entre grupos, sugerindo que embora a radiação ionizante afete o processo de reparo ósseo via redução de MMP-9, os mecanismos controlados pelo eixo RANK/RANK-L/OPG não são afetados como ocorre na doença periodontal. Desta forma, é possível que o efeito da RT em osteoclastos seja menos expressivo que o dano causado ao endotélio da medula óssea, mais relevante nos processos de reparo. Assim, o dano aos osteoclastos seria secundário, decorrente da redução da vascularização e da alteração do mecanismo de produção do colágeno. Por outro lado, talvez a saliva não seja o melhor meio para avaliação desses biomarcadores específicos, ou, alternativamente, o tamanho da amostra pode não ter sido suficiente para demonstrar diferenças significativas entre os grupos, uma vez que a dosagem de RANK-L foi maior nos controles, com valor marginal de p (0,051).

Segundo Stegen *et al.* (2015), o VEGF está fortemente associado à angiogênese do reparo tecidual. Além disso, o VEGF possivelmente atua diretamente na função de osteoblastos, regulando quimiotaxia, proliferação e diferenciação de osteoblastos. Assim, o VEGF é indispensável para a angiogênese e osteogênese e é o principal agente que correlaciona os dois processos durante o reparo ósseo (HU e OLSEN, 2016). Diante disso, não seria o esperado a ausência de diferença significativa na dosagem de VEGF quando comparamos pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço com o controle. A variação do período pós-RT entre os pacientes, a dosagem do VEGF em único *time point* e a discreta variação na dose de radiação recebida entre os pacientes podem ter influenciado este resultado, o qual acreditamos que deva ser confirmado em estudos futuros.

Pacientes submetidos a RT e quimioterapia apresentaram maiores dosagens de VEGF e MMP-9, sendo que a MMP-9 não foi detectada em pacientes apenas irradiados, sugerindo influência da quimioterapia no aumento do VEGF e MMP-9 decorrente da reconstituição da resposta imune-inflamatória após o tratamento quimioterápico, levando a ativação das vias de angiogênese e reparo tecidual. Otton-leite *et al.*, 2015 encontraram resultados semelhantes, porém a avaliação foi realizada apenas durante o período de radioterapia e quimioterapia. Portanto, trabalhos avaliando MMP-9 e VEGF salivar durante e após o tratamento

radioterápico concomitante à quimioterapia em diversos *time points* padronizados poderão ajudar a elucidar esta questão.

Algumas limitações deste estudo podem ser evidenciadas. A ocorrência de hipossalivação nos pacientes irradiados gera limitação ou impedimento na coleta de saliva, resultando em exclusão de pacientes e impossibilidade de mensuração da dosagem de alguns biomarcadores em algumas amostras. Ademais, esta característica limitaria o uso de saliva como meio diagnóstico/ prognóstico nestes pacientes. Outra limitação do estudo é a avaliação dos biomarcadores apenas em um momento após a RT, com variação entre o período pós-RT entre os pacientes. Estudos longitudinais avaliando a dosagem desses biomarcadores antes, durante e após o tratamento radioterápico seriam de grande contribuição. Por fim, devido à baixa prevalência de ORN na amostra estudada, não foi possível avaliar a associação entre os biomarcadores e a ocorrência de ORN.

Lahdentausta *et al.* (2018) ressalta que o tabagismo atual ou prévio recente (menos de um ano sem fumar) representam um fator de confusão na expressão de biomarcadores salivares da periodontite, uma vez que componentes nocivos da fumaça do cigarro possuem um efeito inibitório na cicatrização de feridas. Os efeitos do tabagismo consistem na redução da vascularização pela nicotina, diminuição do transporte e metabolismo do oxigênio pelo monóxido de carbono e inibição dos sistemas enzimáticos pelo cianeto de hidrogênio (SILVERSTEIN *et al.*, 1992). Em nosso estudo, 75,9% dos pacientes eram tabagistas prévios, porém todos com pelo menos um ano de abandono do hábito. Portanto, acreditamos que os possíveis efeitos do cigarro na dosagem dos biomarcadores neste estudo foram minimizados, apesar de não ter sido feito pareamento com os controles em relação ao hábito de fumar.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a radioterapia em região de cabeça e pescoço leva à redução do volume salivar bem como dos níveis salivares de EGF e MMP-9. A concentração reduzida desses biomarcadores pode estar associada com alteração nos processos de reparo tecidual e de remodelação óssea desses pacientes, os quais por sua vez podem estar envolvidos na patogenia de algumas complicações tardias da radioterapia.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças nos níveis de VEGF, consideramos importante a continuidade de estudos incluindo esta proteína devido à importância da mesma nos processos de reparo tecidual. O eixo RANK/RANK-L/OPG deve ser investigado em outros tecidos e fluidos em pacientes irradiados, uma vez que na saliva não foram identificadas alterações de suas concentrações. Pacientes submetidos à radioterapia associada à quimioterapia apresentaram maiores dosagens de VEGF e MMP-9, podendo esta diferença ser decorrente da reconstituição da resposta imune-inflamatória após o tratamento quimioterápico.

REFERÊNCIAS

- AL KAWAS, S.; RAHIM, Z. H. A.; FERGUSON, D. B. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 1, p. 1-9, 2012.
- AL-DASOOQI, N. *et al.* Matrix metalloproteinases: key regulators in the pathogenesis of chemotherapy-induced mucositis?. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 1-9, 2009.
- ASIKAINEN, P. J. *et al.* Radiation-induced changes in the microstructure of epithelial cells of the oral mucosa: A comparative light and electron microscopic study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 10, p. 1004-1010, 2017.
- BALICKI, R.; GRABOWSKA, S.Z.; CITKO, A. Salivary epidermal growth factor in oral cavity cancer. **Oral Oncology**, v. 41, n. 1, p. 48-55, 2005.
- BASAL, O. *et al.* Epidermal growth factor (EGF) promotes bone healing in surgically induced osteonecrosis of the femoral head (ONFH). **Bosnian journal of basic medical sciences**, v. 18, n. 4, p. 352, 2018.
- BASI, D. L. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 expression in alveolar extraction sockets of zoledronic acid-treated rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 11, p. 2698-2707, 2011.
- BELIBASAKIS, G. N.; BOSTANCI, N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 3, p. 239-248, 2012.
- BELLM, L. A. *et al.* Patient reports of complications of bone marrow transplantation. **Supportive care in cancer**, v. 8, n. 1, p. 33-39, 2000.
- BERLANGA-ACOSTA, J. *et al.* Epidermal growth factor in clinical practice—a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. **International Wound Journal**, v. 6, n. 5, p. 331-346, 2009.
- BERNARDES, V. F. *et al.* Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: a case control study. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 40, 2010.

BERNARDES, V. F. *et al.* EGF in saliva and tumor samples of oral squamous cell carcinoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 19, n. 6, p. 528-533, 2011.

BLAVIER, L.; DELAISSE, J. M. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 12, p. 3649-3659, 1995.

BOWEN, J. M. *et al.* Gene expression analysis of multiple gastrointestinal regions reveals activation of common cell regulatory pathways following cytotoxic chemotherapy. **International journal of cancer**, v. 121, n. 8, p. 1847-1856, 2007.

CHERIEUX, K. C. A. L.; NIJHUIS, T. H. J.; MUREAU, M. A. M. Osteoradionecrosis of the jaws: a review of conservative and surgical treatment options. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 29, n. 02, p. 069-076, 2013.

COHEN, S. *et al.* A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 3, p. 1523-1531, 1982.

COOPER, J. S. *et al.* Late effects of radiation therapy in the head and neck region. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 31, n. 5, p. 1141-1164, 1995.

CUEVAS-CÓRDOBA, B.; SANTIAGO-GARCIA, J. Saliva: a fluid of study for OMICS. **Omics: a Journal of Integrative Biology**, v. 18, n. 2, p. 87-97, 2014.

DAWES, C. *et al.* The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 6, p. 863-874, 2015.

DELL, K. O.; SINHA, U. Osteoradionecrosis. **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am**, v. 23; p. 455-464, 2011.

DUDZIAK, M. E. *et al.* The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 106, n. 5, p. 1049-1061, 2000.

DUMBRIGUE, H. B. *et al.* Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck. **Oral Surgery, Oral**

Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, v. 89, n. 6, p. 710-716, 2000.

EPSTEIN, J. B. *et al.* Assessment of epidermal growth factor in oral secretions of patients receiving radiation therapy for cancer. **Oral oncology**, v. 33, n. 5, p. 359-363, 1997.

EPSTEIN, J. B. *et al.* The correlation between epidermal growth factor levels in saliva and the severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 89, n. 11, p. 2258-2265, 2000.

GARLET, G. P. *et al.* Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral microbiology and immunology**, v. 21, n. 1, p. 12-20, 2006.

GOMES, A. M. *et al.* Periodontal disease, peri-implant disease and levels of salivary biomarkers IL-1 β , IL-10, RANK, OPG, MMP-2, TGF- β and TNF- α : follow-up over 5 years. **Journal of Applied Oral Science**, v. 27, 2019.

HANADA, R. *et al.* RANKL/RANK—beyond bones. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, n. 7, p. 647-656, 2011.

HASSANSHAHI, M. *et al.* Bone marrow sinusoidal endothelium: damage and potential regeneration following cancer radiotherapy or chemotherapy. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 427-442, 2017.

HU, K.; OLSEN, B. R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. **Bone**, v. 91, p. 30-38, 2016.

INO, M. *et al.* Kinetics of epidermal growth factor in saliva. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 113, n. sup500, p. 126-130, 1993.

JANSMA, J. *et al.* Protocol for the prevention and treatment of oral sequelae resulting from head and neck radiation therapy. **Cancer**, v. 70, n. 8, p. 2171-2180, 1992.

JENSEN, S. B. *et al.* Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary salivary gland hypofunction. **Oral oncology**, v. 44, n. 2, p. 162-173, 2008.

JOH, T. *et al.* Physiological concentrations of human epidermal growth factor in biological fluids: use of a sensitive enzyme immunoassay. **Clinica Chimica Acta**, v. 158, n. 1, p. 81-90, 1986.

KEARNS, A. E.; KHOSLA, S.; KOSTENUIK, P. J. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 2, p. 155-192, 2008.

KHURSHID, Z. *et al.* Human saliva collection devices for proteomics: An update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 846, 2016.

LAHDENTAUSTA, Laura *et al.* Smoking confounds the periodontal diagnostics using saliva biomarkers. **Journal of periodontology**, 2018.

LAHEIJ, A. M. G. A. *et al.* Proteins and peptides in parotid saliva of irradiated patients compared to that of healthy controls using SELDI-TOF-MS. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 639, 2015.

LEE, H.O.; LEE, J. J. Nutritional intervention using nutrition care process in a malnourished patient with chemotherapy side effects. **Clinical nutrition research**, v. 4, n. 1, p. 63-67, 2015.

LIU, C. *et al.* Structural and functional insights of RANKL–RANK interaction and signaling. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 6910-6919, 2010.

LOO, J. A. *et al.* Comparative human salivary and plasma proteomes. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 10, p. 1016-1023, 2010.

MARCANTONI, M. Ecología de la cavidad bucal. **Microbiología Estomatológica, Fundamentos y Guía práctica**. 1ª ed. Argentina, p. 213, 1999.

MORASCHINI, V. *et al.* Association between biomarkers and Medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 127, n. 6, p. 504-515, 2019.

NABIL, S.; SAMMAN, N. Incidence and prevention of osteoradionecrosis after dental extraction in irradiated patients: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 3, p. 229-243, 2011.

NADELLA, K. R. *et al.* Osteoradionecrosis of the Jaws: clinico-therapeutic management: a literature review and update. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v. 14, n. 4, p. 891-901, 2015

NAVAZESH, M.; KUMAR, S. K. S. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, p. 35S-40S, 2008.

NORMANDO, A. G. C. *et al.* Biomarkers in the assessment of oral mucositis in head and neck cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **Supportive Care in Cancer**, v. 25, n. 9, p. 2969-2988, 2017.

NYMAN, J. S. *et al.* Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 6, p. 1252-1260, 2011.

OHSHIMA, M. *et al.* Physiologic levels of Epidermal Growth Factor in saliva stimulate cell migration of an oral epithelial cell line, HO-1-N-1. **European Journal of Oral Sciences**, v. 110, n. 2, p. 130-136, 2002.

ORTEGA, N. *et al.* How proteases regulate bone morphogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 995, n. 1, p. 109-116, 2003.

OTON-LEITE, A. F. *et al.* Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. **Lasers in surgery and medicine**, v. 47, n. 4, p. 296-305, 2015.

PAIVA, K. B. S.; GRANJEIRO, J. M. Matrix metalloproteinases in bone resorption, remodeling, and repair. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, 2017. p. 203-303.

RIVERO, J. A.; SHAMJI, O.; KOLOKYTHAS, A. Osteoradionecrosis: a review of pathophysiology, prevention and pharmacologic management using pentoxifylline, α -tocopherol, and clodronate. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 124, n. 5, p. 464-471, 2017.

RUSSO, N. *et al.* Cytokines in saliva increase in head and neck cancer patients after treatment. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 122, n. 4, p. 483-490. e1, 2016.

SAKURAI, T. *et al.* Radiation-induced reduction of osteoblast differentiation in C2C12 cells. **Journal of Radiation Research**, v. 48, n. 6, p. 515-521, 2007.

SCHAFER, C. A. *et al.* Saliva diagnostics: utilizing oral fluids to determine health status. In: **Saliva: Secretion and Functions**. Karger Publishers, 2014. p. 88-98.

SCULLY, C.; EPSTEIN, J.; SONIS, S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v. 25, n. 12, p. 1057-1070, 2003.

SHAW, R. J.; DHANDA, J. Hyperbaric oxygen in the management of late radiation injury to the head and neck. Part I: treatment. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 49, n. 1, p. 2-8, 2011.

SILVERSTEIN, P. Smoking and wound healing. **The American journal of medicine**, v. 93, n. 1, p. S22-S24, 1992.

SONIS, S. T. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. **J Support Oncol**, v. 5, n. 9 Suppl 4, p. 3-11, 2007.

SPIELMANN, N.; WONG, D. T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral Diseases**, v. 17, n. 4, p. 345-354, 2011.

STEGEN, S.; VAN GASTEL, N.; CARMELIET, G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. **Bone**, v. 70, p. 19-27, 2015.

STONE, H. B. *et al.* Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. **The Lancet Oncology**, v. 4, n. 9, p. 529-536, 2003.

THESLEFF, I. *et al.* The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor. **Life Sciences**, v. 43, n. 1, p. 13-18, 1988.

THORN, J. J. *et al.* Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, n. 10, p. 1088-1093, 2000.

TONG, L. *et al.* Suppressing angiogenesis regulates the irradiation-induced stimulation on osteoclastogenesis in vitro. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 4, p. 3429-3438, 2018.

UPILE, T. *et al.* Salivary VEGF: a non-invasive angiogenic and lymphangiogenic proxy in head and neck cancer prognostication. **International Archives of Medicine**, v. 2, n. 1, p. 12, 2009.

VANDOOREN, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 48, n. 3, p. 222-272, 2013.

VIDOTTO, A. *et al.* Salivary and serum proteomics in head and neck carcinomas: before and after surgery and radiotherapy. **Cancer Biomarkers**, v. 8, n. 2, p. 95-107, 2011.

VISSINK, A. *et al.* Oral sequelae of head and neck radiotherapy. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 3, p. 199-212, 2003.

VUOTILA, T. *et al.* The relationship between MMPs and pH in whole saliva of radiated head and neck cancer patients. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 31, n. 6, p. 329-338, 2002.

XU, W. *et al.* In situ release of VEGF enhances osteogenesis in 3D porous scaffolds engineered with osterix-modified adipose-derived stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 23, n. 9-10, p. 445-457, 2017.

YASUDA, H. *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 7, p. 3597-3602, 1998.

YU, X. *et al.* Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1) Recruits Osteoclast Precursors by Inducing Chemotaxis, Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Activity, and Collagen Transmigration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 8, p. 1404-1418, 2003.

ZHANG, W. B. *et al.* Expression of bone morphogenetic protein, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in irradiated mandibles during

distraction osteogenesis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 11, p. 2860-2871, 2011.