

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BÁRBARA LIMA CRUZ

**ESTUDO DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ 9 NA SALIVA DE PACIENTES
IRRADIADOS EM REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO: UM ESTUDO
TRANSVERSAL PAREADO**

BELO HORIZONTE

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BÁRBARA LIMA CRUZ

**ESTUDO DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ 9 NA SALIVA DE PACIENTES
IRRADIADOS EM REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO: UM ESTUDO
TRANSVERSAL PAREADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial a obtenção do grau de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profª Drª Patrícia Carlos Caldeira

BELO HORIZONTE

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sua constante presença em minha vida, pelos obstáculos que têm me apresentado, mas a força e a determinação por meio da espiritualidade para superá-los. Além de uma família maravilhosa, apoiadora e companheira. Ressalto, entre meus amores, a mulher incrível, minha mãe, que sempre fez de um tudo por seus filhos e que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida. Agradeço, principalmente, a ela essa conquista. Agradeço também aos amigos de longa data e aos amigos que fiz durante a graduação *Bests*, costume dizer que são a família que escolhemos. Tornaram essa caminhada mais prazerosa e doce.

Agradeço também a minha orientadora Prof^a. Dr^a Patrícia Carlos Caldeira pela oportunidade de participar dessa pesquisa extremamente relevante à sociedade. Quando se observa estatísticas mundiais e taxas do próprio Brasil em relação aos diagnósticos e a mortalidade, torna-se óbvia a necessidade de se estudar tal doença. Câncer é uma doença considerada como problema de saúde pública. Participar desse estudo não só foi enriquecedor para a minha formação acadêmica, bem como será para minha atuação como profissional da saúde. Segundo, agradeço o apoio financeiro recebido das agências de fomento FAPEMIG (APQ-01700-16) e CNPq (405585/2018-7). Por fim, eu tinha um desejo particular em participar desse estudo, uma vez que mais de um dos membros da família foram tirados de nós tão cedo.

“ A escolha é possível, em certo sentido, porém o que não é possível é não escolher. Eu posso sempre escolher, mas devo estar ciente de que, se não escolher, assim mesmo estarei escolhendo. Contudo, viver é isso: Ficar se equilibrando o tempo todo, entre escolhas e consequências. ”

Jean-Paul Sartre

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno- Sorbent Assay</i>
FAO	Faculdade de Odontologia
Gy	Gray
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
H2SO4	Ácido Sulfúrico
Ig-A	Imunoglobulina A
MEC	Matriz Extracelular
Min	Minutos
ML	Mililitros
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MMP-1	Metaloproteinase de Matriz-1
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz-2
MMP-3	Metaloproteinase de Matriz-3
MMP-8	Metaloproteinase de Matriz-8
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz-9
MMP-10	Metaloproteinase de Matriz-10
MMP-11	Metaloproteinasesde Matriz-11
MMP-13	Metaloproteinase de Matriz-13
µL	Microlitros
MUC5B	Mucina
MUC7	Mucina
OPD	Cromógeno- <i>Phenylenediamine Dihydrochloride</i>
PBS	Solução Tamponada com Fosfato
RT	Radioterapia
Rpm	Rotações por minuto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento-β
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-α
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

TNM	Tumor primário/Linfonodos afetados/Metástases a distância
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
Zn	Zinco

RESUMO

Metaloproteinases de matriz (MMPs) participam de diversos processos fisiológicos e patológicos no organismo, devido à sua função de remodelação da matriz extracelular. A metaloproteinase-9 (MMP-9) é a mais abundante e importante na remodelação tecidual e óssea. A radioterapia (RT) para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço pode causar danos às glândulas salivares, mucosa bucal, dentes, podendo ocasionar alterações como hipossalivação, mucosite, cáries, osteorradionecrose. O propósito dessa pesquisa foi investigar a concentração da MMP-9 salivar em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço comparando com indivíduos saudáveis. Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFMG (CEP/UFMG; CAAE: 85229518.9.0000.5149) e participantes assinaram o TCLE. Realizado um estudo transversal pareado, 25 pacientes submetidos a irradiação em região de cabeça e pescoço e 25 controles nunca expostos, pareados por idade e sexo. Pacientes selecionados do projeto de extensão da FAO-UFMG e acompanhantes foram recrutados para o grupo controle no mesmo período, seguindo critérios de inclusão e exclusão. Amostra de saliva não estimulada processada e a concentração de MMP-9 estabelecida pela técnica de ELISA. Análise descritiva e teste de Wilcoxon (IBM SPSS Statistics®) realizados e valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos. Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do volume salivar e dos níveis de MMP-9 salivar entre grupo irradiados e grupo controle, menor no grupo irradiados. Conclui-se que RT afeta o funcionamento fisiológico de glândulas salivares e a expressão da MMP-9 salivar. Esta redução de MMP-9 salivar pode estar relacionada ao desenvolvimento das alterações bucais frequentemente apresentadas pelos pacientes irradiados.

Palavras chave: Câncer de cabeça e pescoço. Radioterapia. Metaloproteinase 9. Saliva. Cicatrização.

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) participate in several pathological and physiological processes in the body, due to their role in remodelling the extracellular matrix. Metalloproteinase-9 (MMP-9) is the most abundant and important in tissue and bone remodelling. Radiotherapy (RT) for the treatment of head and neck cancer can cause damage to the salivary glands, oral mucosa, teeth, and can cause changes such as hyposalivation, mucositis, dental caries, and osteoradionecrosis. The purpose of this research was to investigate the concentration of salivary MMP-9 in irradiated patients in the head and neck region compared to healthy ones. Study approved by the Research Ethics Committee of the UFMG (CEP/UFMG; CAAE: 85229518.9.0000.5149) and participants signed the consent form. A paired cross-sectional study carried out, 25 patients undergoing irradiation in the head and neck region and 25 never exposed controls, matched for age and sex. Selected patients from the extension project of the FAO-UFMG and companions recruited into the control in the same period, following inclusion and exclusion criteria. Sample of unstimulated saliva processed and the concentration of MMP-9 established by the ELISA assay. Descriptive analysis and Wilcoxon test (IBM SPSS Statistics®) performed and values $p < 0.05$ considered statistically significant. There was a significant difference ($p < 0.05$) in salivary volume and levels of salivary MMP-9 between irradiated group and control group, lower in the irradiated group. In conclusion, the RT affects the physiological functioning of salivary glands and the expression of salivary MMP-9. This reduction in salivary MMP-9 may be related to the development of oral changes frequently seen in irradiated patients.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Câncer de cabeça e de pescoço	9
1.2 Tratamento do câncer com radioterapia e/ou quimioterapia	10
1.3 Fluido biológico (saliva humana)	11
1.4 MMP-9 (Metaloproteinase de matriz 9)	12
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4 METODOLOGIA	16
4.1 Aspectos éticos e legais	16
4.2 Pacientes irradiados e grupo controle	16
4.3 Coleta da saliva	17
4.4 Dosagem da MMP- 9	17
4.5 Análise estatística	19
5 RESULTADOS	20
6 DISCUSSÃO	28
7 CONCLUSÃO	331
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	332
ANEXOS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de cabeça e pescoço

Segundo Ferlay *et al.* (2015) e Calver *et al.* (2017), o câncer de cabeça e pescoço é um dos mais prevalentes cânceres no mundo, assumindo a sétima posição de diagnósticos em 2012. Cânceres de diferentes localizações como, por exemplo, câncer de lábio, boca, nasofaringe, faringe e laringe compõem o grupo de câncer de cabeça e de pescoço (CALVER *et al.*, 2017).

Além da alta frequência, o prognóstico do câncer de cabeça e pescoço depende de algumas variáveis como fatores epidemiológicos, localização anatômica e estágio da doença (CHOW, 2020). Somada a essas variantes, o intervalo de tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento oncológico também afeta favorável ou desfavoravelmente o prognóstico. Esse atraso para se iniciar o tratamento aumenta a quantidade de casos nos estágios clínicos III e IV, com isso muitos dos tumores malignos se tornam mutiladores devido à tratamentos agressivos ou em tumores intratáveis. O retardo para tratar, portanto, influencia na perda de importantes funções motoras de estruturas nobres, bem como na taxa de sobrevida desses pacientes (COCA-PELAZ *et al.*, 2018). Ademais, prognósticos associados a HPV-positivo em carcinoma de células escamosas de orofaringe tem se apresentado favorável ao tratamento em relação aos pacientes HPV-negativo (DIRETRIZES-SBOC,2012; MARUR, 2016).

Neoplasia maligna de cabeça e de pescoço está diretamente relacionada a percepção dolorosa, perda de funções motoras e sensitivas do sistema estomatognático o que pode dificultar a mastigação, a deglutição, isso acontece porque a massa tumoral maligna cresce e invade tecidos profundos e, assim, causa alterações funcionais (YAN; AGRAWAL; GOOI, 2018). Ademais, esses tumores malignos podem comprometer esteticamente o paciente, uma vez que em alguns casos ocorre significativas ressecções de fragmentos de tecidos ósseos e/ou tecidos faciais como uma das formas de tratamento (CHOW, 2020).

Além de severa implicação psicossocial em decorrência das desfigurações faciais que as cirurgias ressectivas podem causar aos pacientes que são submetidos à tratamento cirúrgico, como também a necessidade de lidar com morte iminente. Cirurgias reconstrutivas podem contribuir para melhorar a qualidade de vida dessas

peças, no entanto, a expectativa dos pacientes mutilados geralmente é difícil de ser alcançada, visto que o cirurgião em muitos casos não tem tecido suficiente para tal reabilitação ou a região afetada não possibilita esse tipo de cirurgia reconstrutiva (ALIAS; HENRY, 2018).

1.2 Tratamento do câncer com radioterapia e/ou quimioterapia

Cirurgia, radioterapia e quimioterapia são tratamentos utilizados sozinhos ou de maneira combinada para o tratamento de câncer de cabeça e de pescoço; a escolha depende tanto da localização primária do tumor como também do estágio da doença conforme o sistema de classificação TNM (T-sítio do tumor primário; N-linfonodos afetados; M-metástases à distância) dos tumores malignos (MARUR, 2016).

A terapia com radiação e medicamentos quimioterápicos tem um importante papel no tratamento oncológico, como é evidenciado pela meta-análise de Blanchard *et al.* (2015) que apresenta resultados positivos em relação à sobrevida global, sobrevida livre de progressão, redução de recidiva locoregional e à distância. No entanto, a toxicidade às células saudáveis da mucosa bucal, de glândulas salivares, músculos constritivos da faringe, glândulas tireoide aumentam com longos períodos de tratamento radioterápico em decorrência da absorção pelos tecidos e com a administração de doses de radioterapia superiores a 55Gy (Gray) (MARUR, 2016). Apesar de especialistas utilizarem protocolos de fracionamento de radioterapia que têm por objetivo equilibrar a eficácia antitumoral e proteção aos tecidos saudáveis (SEMRAU, 2017), ainda assim, têm-se negativas consequências do tratamento radioterápico, como a hipossalivação (causando xerostomia), disfagia, hipotireoidismo, mucosite (MARUR, 2016; EVANS, 2017; HAUSSMANN *et al.*, 2019).

Ademais, a quimioterapia associada a RT para o tratamento do câncer potencializam as complicações causadas pela RT, como hipossalivação, mucosite, disfagia, infecção. Essas complicações também são relatadas durante os tratamentos apenas quimioterápicos e quimioradioterápicos, porém com diferenças na severidade de acometimento (BELLM *et al.*, 2000; SCULLY, EPSTEIN e SONIS, 2003).

De acordo com Dawes *et al.* (2015), os danos causados às glândulas salivares pela irradiação para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço interfere reduzindo a produção e a consequente secreção de saliva para a cavidade bucal. Jellema *et al.*,

(2007) demonstraram que a qualidade da saliva é alterada para pegajosa devido à alteração da composição da saliva. A radioterapia não somente afeta as células tumorais, bem como células saudáveis, ocasionando uma reação inflamatória da mucosa oral e orofaríngea denominada mucosite, dificultando a mastigação e deglutição (STONE *et al.*, 2003; VISSINK *et al.*, 2003). Ainda conforme Stone e Vissink, a osteorradionecrose é a complicação mais severa que pode ocorrer em decorrência da exposição óssea a irradiação. O desenvolvimento da osteorradionecrose (necrose dos ossos maxilofaciais) pode ser desencadeada devido à traumas, exodontias, procedimentos periodontais, biópsias, infecções, higienização deficiente na região submetida a irradiação. A radioterapia afeta o processo cicatricial, tornando o tecido mais fibroso e menos vascularizado, dessa forma, alterando a capacidade de remodelação óssea fisiológica.

1.3 Fluido biológico (saliva humana)

Saliva é composta de uma mistura de substâncias secretadas constantemente por glândulas salivares. A constante produção e secreção de saliva pelas glândulas é extremamente importante para se manter tanto dentes quanto mucosa oral e esofágica saudáveis. Esse fluido complexo, além de lubrificar os tecidos bucais, possui várias outras funções como, por exemplo, proteção à abrasão mecânica, química e térmica dos tecidos, reservatório de íons no processo desmineralização e remineralização dental, ação antimicrobiana, participa do processo da digestão, dentre outras (DAWES *et al.*, 2012).

Ainda de acordo com Dawes *et al.* (2015), o volume fisiológico secretado de saliva diariamente pelas glândulas é cerca de 0,6 litro. As taxas de fluxo salivar normais estão entre 0,3-0,4mL/min quando não estimuladas e entre 1,5-2,0mL/min quando estimulada. A saliva não estimulada é uma solução hipotônica e é constituída, principalmente, por água (99,5%), mucinas (em sua maioria por MUC5B e MUC7), eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloro, bicarbonato, fosfato, tiocianato, fluoreto), enzimas (alfa-amilase), proteínas (histatina, estaterina, alfa e beta-defensinas, lisozima), anticorpo como Ig-A secretora. Essa saliva não estimulada possui uma composição eletrolítica muito semelhante ao plasma ultrafiltrado. Entretanto, quando ocorre estimulação de salivação, a composição eletrolítica da saliva é alterada, além de um expressivo aumento de sódio, bicarbonato e uma ligeira

diminuição de potássio, magnésio, fosfato, tem-se a presença de iodeto. Também se observa alteração de pH quando acontece o estímulo de salivação. Ademais, o fluxo salivar se comporta em conformidade com um ritmo circadiano em que o maior pico acontece no fim da tarde e a extremamente baixo durante o sono.

Conforme Alali *et al.* (2020), a saliva pode ser utilizada como um fluido biológico para diagnóstico, uma vez que a expressão de biomarcadores se encontram alterados no surgimento de patologias bucais, em presença de doenças sistêmicas, bem como em câncer de cabeça e de pescoço. Ainda de acordo com essa revisão sistemática, estudos relatam alterações na expressão da gelatinase MMP-9 em tecidos e fluidos biológicos em diferentes doenças com potencial de malignidade e em câncer de cabeça e pescoço. A MMP-9 pode ser encontrada na urina, plasma, líquido cefalorraquidiano, fluido gengival crevicular e saliva.

1.4 MMP-9 (Metaloproteinase de matriz 9)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) foram classificadas de MMP-1 a MMP-28 e divididas em grupos de acordo com o substrato da matriz extracelular (MEC): collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2, MMP-9), estromelases (MMP-3, MMP-10, MMP-11), elastases e outras (ORTEGA *et al.*, 2003; AL-DASOOQI *et al.*, 2009). As MMPs são extremamente importantes para manter diversas funções no organismo, tais como degradação da matriz extracelular (MEC) para permitir a migração celular, alteração do microambiente da MEC resultando em alteração no comportamento celular, modulação de moléculas biologicamente ativas; regulação da atividade de outras proteases e ligação celular, proliferação, diferenciação e apoptose.

Além das funções fisiológicas, as MMPs também participam em atividades patológicas, como em neoplasias malignas de cabeça e pescoço, sendo a MMP-9 (gelatinase B) uma das gelatinases que participa dessas alterações, por exemplo, na angiogênese tumoral (ORTEGA *et al.*, 2003). Essa neoformação vascular, segundo relatam Ghallab e Shaker (2016), pode acontecer devido a gelatinase B aumentar a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).

A MMP-9 além de degradar elastina, fibrilina, laminina, gelatina e alguns tipos de colágenos (IV, V, XI e XIV), também participa na ativação de fatores de crescimento, por exemplo, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Em condições de normalidade, a MMP-9 é expressa

por algumas células, trofoblastos, osteoclastos, leucócitos, células dendríticas e os precursores (CHAUDHARY *et al.*, 2010).

De acordo com Ortega *et al.* (2003), as MMPs são essenciais para o recrutamento de células precursoras hematopoiéticas, células hematopoiéticas e células endoteliais durante processos fisiológicos e patológicos. E a MMP-9 é fundamental para que ocorra o recrutamento celular, pois promove a ativação de fatores de crescimento, por exemplo, VEGF necessário no recrutamento de células endoteliais. Ela participa, portanto, do processo de angiogênese, reparo e hematopoese.

Além da ativa participação na remodelação tecidual, a MMP-9 também está envolvida em uma das vias do processo de remodelamento ósseo normal. Enzima com maior frequência observada no recrutamento de osteoclastos durante o processo de remodelamento ósseo fisiológico. A MMP-9 participa da ativação de várias citocinas e fatores de crescimento, por exemplo, TNF- α que é uma substância importante para a promoção da osteogênese e sobrevivência dos osteoclastos (PAIVA *et al.*, 2017). A MMP-9 também é expressa durante o processo de ossificação endocondral, está presente na cartilagem que será substituída por tecido ósseo (ORTEGA *et al.*, 2003). Essa endopeptidase desempenha importante papel na manutenção da arquitetura e densidade trabecular, estudo realizado em fêmur de camundongos demonstrou que a ausência de MMP-9 causa alteração da estrutura trabecular e aumenta a densidade desse osso (NYMAN *et al.*, 2011).

Moraschini *et al.* (2019), através de revisão sistemática, investigou biomarcadores relacionados com o diagnóstico, prognóstico e severidade da osteonecrose dos ossos maxilofaciais associada ao uso de medicação anti-absortiva. Foram apresentados estudos em que a MMP-9 estaria entre os biomarcadores envolvidos na osteonecrose. Todavia, concluem relatando a necessidade de novos estudos, visto que há pouca evidência clínica fundamentada nesses biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico.

2 JUSTIFICATIVA

Radioterapia na região de cabeça e pescoço pode desencadear alterações na cavidade bucal, como hipossalivação, mucosite, infecções, osteorradionecrose. Considerando que a MMP-9 participa da remodelação fisiológica tecidual e óssea, supõe-se que ela atue no desenvolvimento dos efeitos adversos da radioterapia em cabeça e pescoço. A saliva, além de ser um fluido biológico complexo e rico em compostos, é um fluido de fácil acesso, de baixo custo, de coleta simples e não invasiva e a MMP-9 pode ser dosada a partir dela. Portanto, o presente estudo poderá contribuir para elucidar os efeitos da radiação nos níveis salivares de MMP-9, a qual pode estar relacionada à patogenia das alterações bucais associadas à radioterapia em cabeça e pescoço.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a concentração de MMP-9 (Metaloproteinase de matriz-9) em saliva de pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço, comparando com indivíduos sistemicamente saudáveis e não submetidos a irradiação.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar e comparar o volume de saliva não estimulada produzida pelos pacientes irradiados com o grupo controle;
- Dosar os níveis salivares de MMP-9 em pacientes submetidos à radioterapia e grupo controle;
- Comparar os níveis dosados de MMP-9 entre pacientes e controles.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos e legais

Este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque e tanto a pesquisa quanto o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e protocolo (CAAE 85229518.9.0000.5149).

4.2 Pacientes irradiados e grupo controle

Trata-se de um estudo transversal pareado, cuja amostra não probabilística foi recrutada por conveniência, em fluxo contínuo entre Janeiro de 2018 a Janeiro de 2019. O grupo caso foi composto de pacientes submetidos à radioterapia para o tratamento de neoplasias malignas de cabeça e pescoço e 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. O grupo controle foi constituído por indivíduos sistematicamente saudáveis que não foram submetidos à tratamento radioterápico associado ou não à quimioterapia e pareados por sexo e idade com os pacientes participantes da pesquisa. Os controles foram selecionados indivíduos que compareceram como acompanhantes nas clínicas da FAO-UFMG, durante o mesmo período de recrutamento dos casos.

Foram estabelecidos critérios de exclusão para os participantes deste estudo, participantes que preencheram os critérios de inclusão, mas com características adicionais, que poderiam interferir no sucesso do estudo ou aumentar o viés, foram, portanto, excluídas. Foram excluídos da pesquisa pacientes e indivíduos com tumores recidivantes, com sinais de doença periodontal ativa (acúmulo de biofilme próximo ou na margem gengival e/ou cálculo supragengival ou subgengival, bolsa periodontal, sinais de inflamação, recessão gengival, sangramento ativo a sondagem (STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C., 2018), submetidos à procedimentos odontológicos invasivos a menos de um mês, em uso atual ou prévio de bisfosfonatos, anti-inflamatórios, antibióticos, antifúngicos no momento da coleta ou até um mês antes, portadores de doenças auto-imunes, portadores de imunodeficiência humana (HIV), com doenças sistêmicas não controladas (hipertensão arterial, diabetes mellitus) e

participantes cujo volume salivar coletado foi insuficiente para a análise laboratorial. Dados clínicos e demográficos foram coletados durante a anamnese. Todos os participantes assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.3 Coleta da saliva

A coleta da amostra de saliva não estimulada ocorreu sempre entre 14:00 e 16:00 horas na clínica de Odontologia, na Faculdade de Odontologia da UFMG. O horário de funcionamento do projeto de extensão coincidiu com o momento de maior pico da taxa do fluxo salivar, visto que, de acordo com ritmo circadiano, ele ocorre no final da tarde. O pode ter contribuído para os volumes coletados.

Os participantes foram orientados a não ingerir bebida alcoólica, a não fumar e não comer uma hora antes da coleta. Foi solicitado ao participante que fizesse a remoção de próteses removíveis e depois entregue um copo com 5mL de água destilada para que fosse feito um bochecho por 1 minuto com o objetivo de lavada a boca antes da coleta. Em seguida, na posição assentada, os pacientes foram orientados a acumular toda saliva produzida por 5 minutos em boca sem que fosse realizado qualquer estímulo para a sua produção como, por exemplo, movimentos de mastigação, deglutição ou tentativa de fala. Após os 5 minutos cronometrados, eles foram orientados a cuspir em um tubo Falcon estéril que, depois, era mantido em caixa de isopor com gelo até o processamento da amostra naquele mesmo dia no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Primeiramente, foi realizada a aferição do volume salivar coletado por meio de pipetas e registrada as quantidades de saliva em microlitros de cada amostra coletada. Depois, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rotações por minuto e a 4° Celsius. Ao volume centrifugado adicionou-se solução tampão de extração de citocinas na proporção de 1:1 em volume. Por fim, foram feitas alíquotas das amostras para serem armazenadas em freezer a -80°C.

4.4 Dosagem da MMP- 9

A MMP-9 foi quantificada através da técnica *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) empregando-se kits (R&D, DuoSet ELISA, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA). ELISA é um método analítico quantitativo que mostra reações

antígeno-anticorpo através da mudança de cor obtida usando um conjugado enzimático e substrato enzimático que servem para identificar/mensurar a presença e concentração de moléculas em fluidos biológicos (AYDIN, 2015). Esse método pode ser usado para medir substâncias mesmo em concentrações muito baixas, com quase nenhum risco de interferência (AYDIN, 2015). Conforme a meta-análise de Shree *et al.* (2018), o ELISA já foi utilizado para a detecção de MMPs em saliva, bem como a MMP-9, gelatinase B estudada.

O protocolo da técnica (*Sandwich* ELISA) será apresentado, sucintamente, a seguir:

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

Os resultados do estudo foram organizados para elaboração de um banco de dados e posteriormente a análise estatística, sendo utilizado os programas SPSS® 19.0 e GraphPad Prism® 7.0. A distribuição de normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Teste de Wilcoxon para amostras pareadas e teste Mann-Whitney para amostras independentes foram empregados. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Foram selecionados 31 pacientes que se submeteram a radioterapia (RT), associada ou não à quimioterapia. Dentre estes, seis foram excluídos do estudo por não terem atingido o volume mínimo de saliva para análise laboratorial. Portanto, a amostra final foi composta de 25 pacientes, sendo que 56% (n=14) receberam RT e quimioterapia e 44% (n=11) receberam RT sem quimioterapia para o tratamento do tumor. O grupo controle foi composto por 25 indivíduos sistemicamente saudáveis, não irradiados, pareados por sexo e idade.

Conforme dados demográficos coletados, dentre os 25 pacientes, 19 eram homens e 6 eram mulheres, representando 76% e 24% dos casos, respectivamente. A média das idades foi de 59,64 anos, variando de 46 a 71 anos, com a maioria dos pacientes na sexta (n=8) e sétima (n=12) décadas de vida, isto é, representando juntas 80% dos pacientes que participaram do estudo. Em seguida, os demais pacientes participantes com 12% (n=3) na quinta e 8% (n=2) na oitava décadas de vida. Além de observada a situação do edentulismo, após análise, a média do número de dentes presente nas arcadas dentárias foi de 14,04 variando de 0 a 29 dentes presentes. A maioria dos pacientes, 80% (n=20) não faziam uso de nenhum tipo de prótese removível.

Dentre os pacientes da amostra pesquisada, a maioria deles residem na zona urbana, representando 96% (n=12) dos casos e apenas um dos pacientes residia na zona rural, representando 4% (n=1) dos casos.

Os hospitais de procedência com significativa frequência foram os Hospitais Mario Penna, Luxemburgo, Hospital das Clínicas, Baleia e São Francisco que juntos representaram 84% (n=21) da amostra da presente pesquisa e 16% (n=4) dos pacientes realizaram os tratamentos em outros hospitais. A distribuição dos hospitais de procedência será detalhada a seguir na Tabela 1.

Ainda sobre o histórico médico, 76% (n=19) dos pacientes foram submetidos a procedimentos cirúrgicos, além da radioquimioterapia. De maneira mais detalhada, o grupo de pacientes submetidos apenas a RT, 100% (n=11) deles foram submetidos a cirurgia, enquanto o grupo de pacientes submetidos a RT concomitante a quimioterapia, uma parte do tratamento foi cirúrgico sendo esse percentual de 57,1% (n=8) e os outros 42,9% (n=6) não realizaram nenhum tipo de cirurgia como forma terapêutica.

Tabela 1 – Hospital de procedência dos pacientes

Hospital	Frequência	Porcentagem
Mário Penna	7	28,0
Luxemburgo	5	20,0
Hospital das Clínicas	4	16,0
Baleia	3	12,0
São Francisco	2	8,0
Vila da Serra	1	4,0
Mário Penna e Luxemburgo	1	4,0
CEROM	1	4,0
Vera Cruz	1	4,0

Fonte: própria autoria

Os pacientes participantes da pesquisa relataram doenças sistêmicas como, por exemplo, hipertensão e diabetes que somadas representam 32% (n=8) dos pacientes. Também foi relatado, com baixa frequência, doença endócrina e cardiovascular que representam juntas 8% (n=2). Por fim, 60% (n=15) dos pacientes não relataram doenças sistêmicas. Ainda de acordo com relato, 40% (n=10) deles informou uso de medicamento controlado. A frequência das doenças de base será detalhada na Tabela 2.

Tabela 2 – Doenças sistêmicas relatadas pelos pacientes

Doença sistêmica	Frequência	Porcentagem
Não relatou	15	60,0
Hipertensão	6	24,0
Diabetes	2	8,0
Outra doença endócrina	1	4,0
Outra doença cardiovascular	1	4,0

Fonte: própria autoria

Ainda durante questionamento, 76% (n=19) dos pacientes informaram ter sido tabagistas previamente ao diagnóstico da doença e, que a partir desse momento interromperam o hábito, já 8% (n=2) relataram ainda serem tabagistas mesmo após o tratamento oncológico. Por fim, 16% (n=4) dos pacientes relataram nunca terem

fumado. Quanto ao hábito etilista, 48% (n=12) dos pacientes informaram fazer uso de bebida alcóolica previamente ao diagnóstico, mas que parou com o hábito após o tratamento e 28% (n=7) relataram que ainda permaneciam com esse hábito. Apenas 24% (n=6) dos pacientes disseram nunca ter tido o hábito de ingerir bebida alcóolica.

Quanto a dose total de radiação recebida, os pacientes que foram submetidos apenas à radioterapia receberam, de acordo com a mediana, dose de 60Gy e o tratamento havia finalizado há 14 meses do início do presente estudo. Já os pacientes que foram submetidos à quimiorradioterapia receberam, valor também referente a mediana, dose de 66Gy e o tratamento finalizado há 8 meses.

Dentre os pacientes presentes no estudo, 8% (n=2) desenvolveram osteoradionecrose previamente ao início desta pesquisa e esse quadro foi solucionado anteriormente à coleta da saliva. Já os demais 92% (n=23) não desenvolveram esse tipo de patologia previamente ao estudo.

As localizações do tumor primário foram detectadas em diferentes regiões da cabeça e do pescoço dos pacientes da presente pesquisa. A histologia de carcinoma de células escamosas foi uma das mais frequentes, sendo representada por 88% (n=22) das neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Quanto ao estadiamento clínico, 36% (n=9) dos tumores foram classificados como T4 e 44% (n=11) como N0. As características dos tumores serão detalhadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Características dos tumores

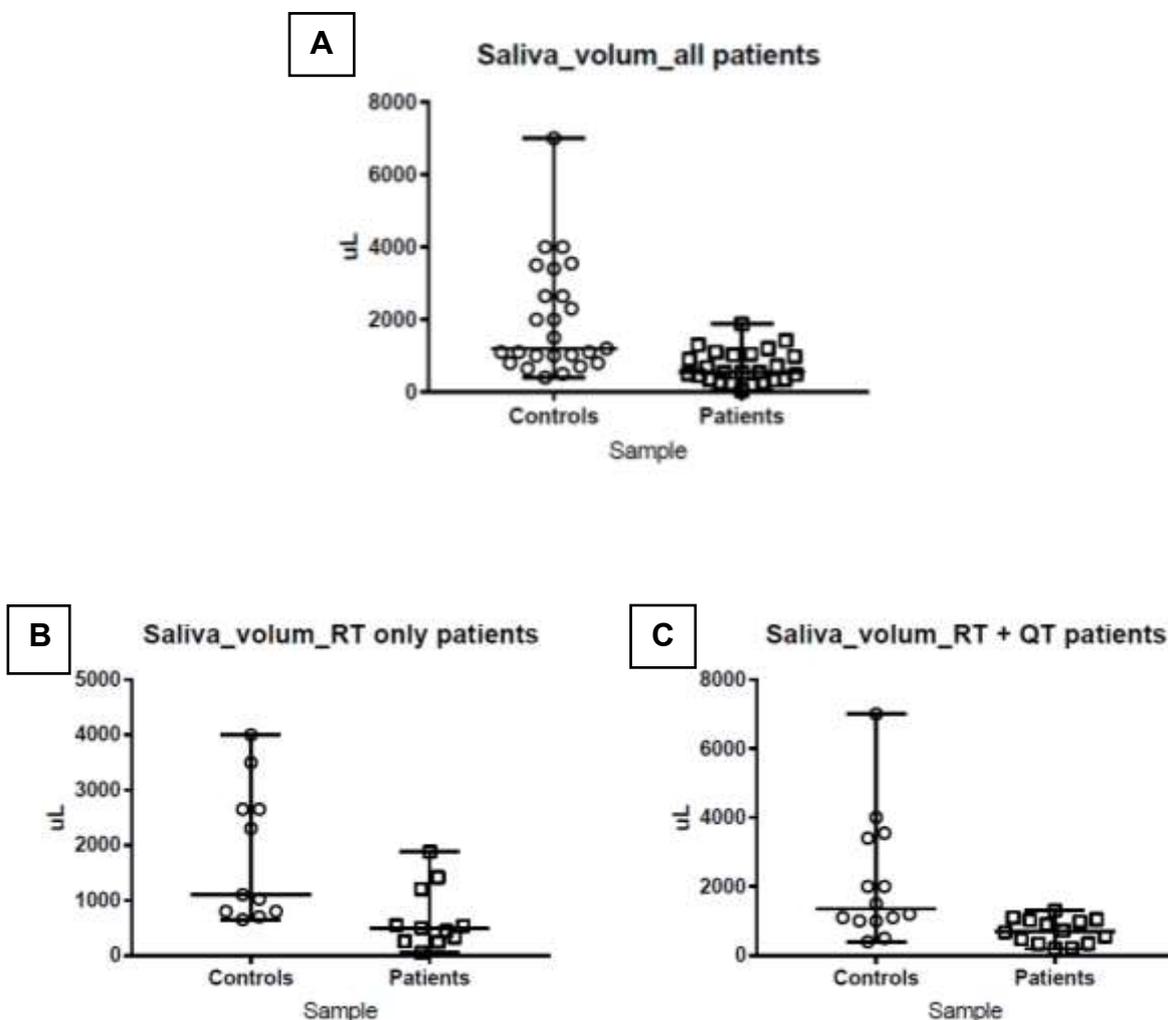
Localização do tumor	Frequência	Porcentagem
Orofaringe não especificada	7	28,0
Laringe	6	24,0
Soalho de boca	6	24,0
Trígono retromolar e gengiva	2	8,0
Amígdala	1	4,1
Órbita	1	4,1
Nasofaringe	1	4,1
Seio piriforme a direita	1	4,1
Total	25	100,0
Classificação Histológica	Frequência	Porcentagem
Carcinoma de células escamosas	22	88,0

Linfoma	1	4,0
Adenocarcinoma	1	4,0
Carcinoma Adenoide Cístico	1	4,0
Total	25	100,0
Estadiamento T	Frequência	Porcentagem
4	9	36,0
2	6	24,0
3	6	24,0
1	2	8,7
Total	23	92,0
Faltante	2	8,0
Estadiamento N	Frequência	Porcentagem
0	11	44,0
2	7	28,0
1	3	12,0
3	3	12,0
Total	24	96,0
Faltante	1	4,0

Fonte: própria autoria

O volume total de saliva não estimulada coletada nos pacientes irradiados (n=25) foi significativamente menor quando se compara ao grupo controle (n=25) ($p < 0,05$, teste de Wilcoxon). De maneira semelhante, quando se compara o volume salivar obtido do grupo controle (n=11) dos grupos de pacientes apenas irradiados (n=11) e grupo de pacientes submetidos à radioterapia associada a quimioterapia (n=14), nota-se também um resultado significativamente menor no grupo dos pacientes. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes submetidos apenas a irradiação (n=11) e o grupo de pacientes submetidos a radioquimioterapia (n=14) (teste de Mann-Whitney). Os volumes salivares encontram-se detalhados a seguir no gráfico 1A, 1B e 1C.

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



Fonte: própria autoria

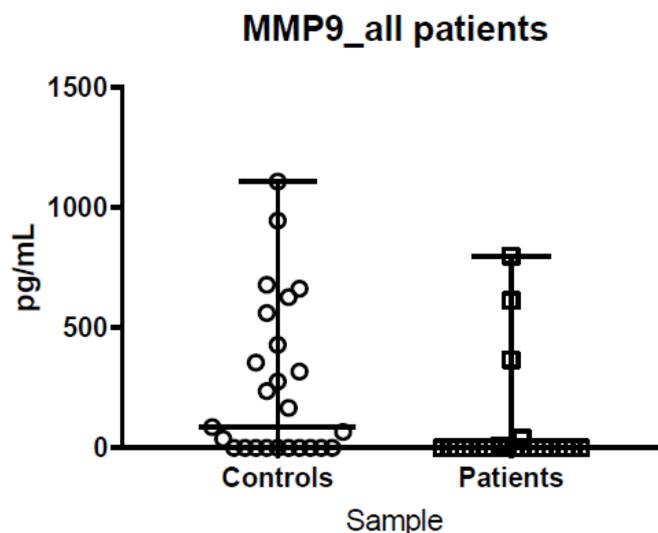
No gráfico 1-A: observa-se o volume salivar total de todas as mostras do grupo controle e dos pacientes irradiados. O volume salivar mínimo obtido no grupo controle foi de 400,00 μ L, o volume salivar máximo 7000,00 μ L e a mediana encontrada de 1200,00 μ L. Já no grupo de pacientes irradiados o volume salivar mínimo obtido foi de 50,00 μ L, o volume salivar máximo de 1880,00 μ L e a mediana encontrada de 550,00 μ L. (P= 0,0002 Teste Wilcoxon)

No gráfico 1-B: observa-se o volume salivar das amostras do grupo controle e dos pacientes apenas irradiados. O volume salivar mínimo obtido no grupo controle foi de 650,00 μ L, o volume salivar máximo 4000,00 μ L e a mediana encontrada de 1100,00 μ L. Enquanto que no grupo dos pacientes apenas irradiados o volume salivar mínimo obtido foi de 50,00 μ L, o volume salivar máximo 1880,00 μ L e a mediana encontrada de 500,00 μ L. (p= 0,0322 Teste Wilcoxon)

No gráfico 1-C: observa-se o volume salivar das amostras do grupo controle e dos pacientes submetidos à radioquimioterapia. O volume salivar mínimo obtido do grupo controle foi de 400,00 μ L, o volume salivar máximo 7000,00 μ L e a mediana encontrada de 1350,00 μ L. Já o volume salivar mínimo obtido no grupo de pacientes submetidos à radioquimioterapia de 200,00 μ L, o volume salivar máximo 1300,00 μ L e a mediana encontrada de 700,00 μ L. (p= 0,0046 Teste Wilcoxon)

Ao comparar os resultados das concentrações de MMP-9 salivar dos pacientes que receberam RT e RT associada a quimioterapia (n=25) com os indivíduos do grupo controle (n=25), foi observado diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,014$, teste de Wilcoxon), sendo observada menor concentração de MMP-9 salivar no grupo dos pacientes irradiados. No entanto, ao comparar os níveis de MMP-9 salivar no grupo dos pacientes que receberam RT e quimioterapia concomitantemente (n=14) com o grupo controle (n=14) não se observou diferença estatisticamente significativa ($p=0,244$, teste de Wilcoxon). E ao comparar as dosagens de MMP-9 salivar dos pacientes submetidos apenas a radioterapia (n=11) com grupo controle (n=11) não foi detectada MMP-9 salivar nas amostras ($p=0,031$, teste de Wilcoxon). Os resultados das dosagens de MMP-9 salivar serão detalhados a seguir nos gráficos 2, 3, 4.

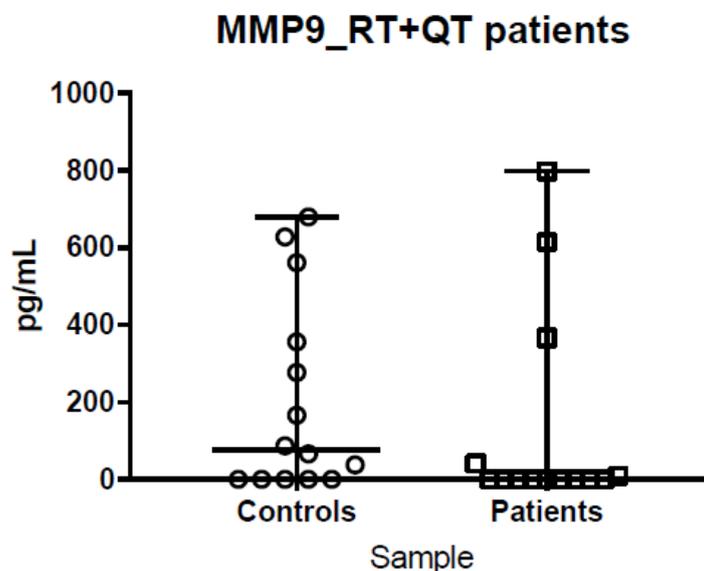
Gráfico 2 – Dosagem de MMP-9 salivar no grupo controle e em todos os pacientes (n=25).



Fonte: própria autoria

A dosagem mínima da MMP-9 obtida no grupo controle foi de 0,00pg/mL, a dosagem máxima 1109pg/mL e a mediana encontrada foi de 87,3pg/mL. Enquanto que o grupo dos pacientes irradiados a dosagem mínima foi de 0,00pg/mL, a dosagem máxima 788,3pg/mL e a mediana 0,00pg/mL ($p=0,014$, teste de Wilcoxon).

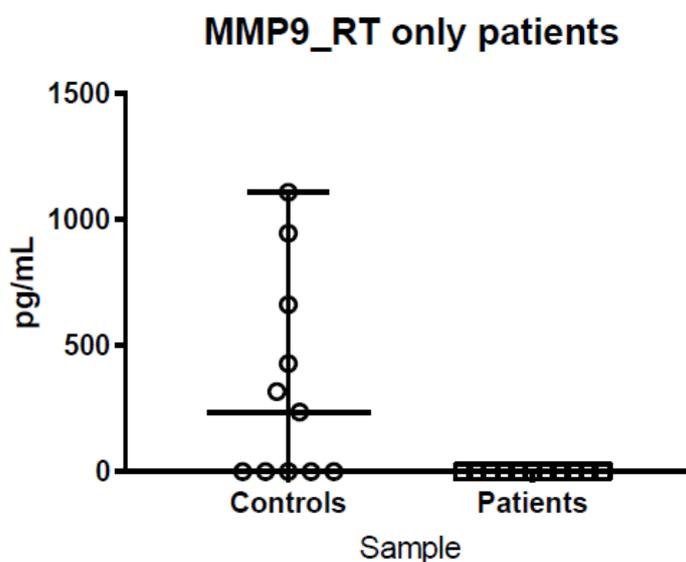
Gráfico 3 – Dosagem de MMP-9 salivar no grupo controle e no grupo dos pacientes que se submeteram a radioterapia e a quimioterapia (n=14).



Fonte: própria autoria

A dosagem mínima da MMP-9 obtida no grupo controle foi de 0,00pg/mL, a dosagem máxima 679,2pg/mL e a mediana encontrada foi de 76,8pg/mL. Enquanto que no grupo dos pacientes a dosagem mínima foi de 0,00pg/mL, a dosagem máxima 798,3pg/mL e a mediana 0,00pg/mL ($p=0,244$ teste de Wilcoxon).

Gráfico 4 – Dosagem de MMP-9 salivar no grupo controle e no grupo dos pacientes submetidos apenas a radioterapia (n=11).



Fonte: própria autoria

A dosagem mínima da MMP-9 obtida no grupo controle foi de 0,00pg/mL, a dosagem máxima 1108,8pg/mL e a mediana encontrada foi de 236,9pg/mL. Enquanto que para o grupo dos pacientes a dosagem mínima foi de 0,00pg/mL, a dosagem máxima 0,00pg/mL e a mediana 0,00pg/mL ($p=0,031$, teste de Wilcoxon).

6 DISCUSSÃO

Análise dos resultados do presente estudo demonstraram que o volume salivar do grupo de pacientes irradiados de cabeça e pescoço foi significativamente menor quando se compara ao grupo controle. Além disso, constatou que a dosagem de MMP-9 também foi significativamente menor em pacientes submetidos a irradiação em comparação aos indivíduos controle. No entanto, quando se compara a expressão da MMP-9 entre os grupos de pacientes apenas irradiados e o grupo de pacientes que foram submetidos a quimioradioterapia, a MMP-9 não foi detectada nas amostras do grupo de pacientes que receberam apenas RT.

No estudo de Otton-Leite *et al.* (2015) também se verifica diminuição da concentração de MMP-9 na saliva de pacientes ao longo da realização do tratamento radioquimioterápico, embora o objetivo principal destes autores tenha sido a avaliação do efeito da laserterapia em mediadores inflamatórios presentes na saliva.

Pele, mucosa, tecidos subcutâneos, tecido ósseo, glândulas salivares são afetadas pelas sessões de RT na região de cabeça e pescoço em tratamentos oncológicos. Os tecidos das glândulas salivares sofrem severos danos ao parênquima e aos sistemas de ductos devido à irradiação, causando assim prejuízo estrutural e funcional a essas células. Como consequência dessa terapia, têm-se a diminuição do fluxo salivar normal, mudança da composição da saliva, comprometendo dessa forma a qualidade da saliva (STONE *et al.*, 2003; VISSINK *et al.*, 2003). Portanto, a diminuição do volume salivar pós-RT encontrada no presente estudo está de acordo com o relatado na literatura.

Conforme Ortega *et al.* (2003) e Paiva *et al.* (2017), a MMP-9 é a mais abundante e importante no processo de reabsorção óssea, uma vez que participa do recrutamento de pré-osteoclastos, osteoclastos e atua também na biodisponibilidade de fatores de crescimento e de várias citocinas, substâncias estas sinalizadoras responsáveis pelo remodelamento ósseo. Ainda com base nesses estudos, a MMP-9 é expressa durante o desenvolvimento cartilaginoso e ósseo normal. Ambos autores e colaboradores em seus estudos utilizaram camundongos nulos de MMP-9, diante dos resultados relataram uma ossificação endoconal anormal e justificada pela substituição inadequada da matriz cartilaginosa pela matriz óssea, visto que o recrutamento de osteoclastos estava prejudicada devido à biodisponibilidade de fatores de crescimento e também atraso da invasão vascular. Diante desses

resultados, a baixa e/ou nula expressão de MMP-9 evidenciada nos pacientes submetidos a irradiação no presente estudo corroboram com a alteração do processo cicatricial ósseo, o que torna esses pacientes mais susceptíveis a infecções e necroses ósseas.

Neyman *et al.* (2011) demonstrou, também através de experimento com camundongos como Ortega *et al.* (2003), que a ausência de MMP-9 fez com que acontecesse alteração da arquitetura, da estrutura cortical e densidade mineral trabecular no fêmur desses animais. Esse experimento evidenciou que camundongos nulos de MMP-9 tinham uma quantidade maior de trabéculas ósseas, porém eram mais finas quando se comparou ao grupo controle. O osso cortical nos camundongos nulos de MMP-9 se apresentou mais forte em relação ao grupo controle, mas com menor tenacidade e deflexão, isto é, menor resistência. Já a densidade mineral trabecular nos camundongos nulos de MMP-9 foi menor do que o grupo controle. Essas alterações não apenas reduzem a resistência à fratura, bem como contribuem para que ocorra fratura osteoporótica. Diante do exposto, a baixa dosagem da MMP-9 salivar nos pacientes submetidos a RT apresentada nos resultados deste estudo sugere um risco aumentado para injúrias tanto aos tecidos bucais quanto ao tecido ósseo, além de um potencial risco para infecções. Visto que a MMP-9, de acordo com as evidências apresentadas, está intrinsecamente envolvida no processo de remodelação tecidual e óssea, bem como em reparo de feridas.

Segundo Lahdentausta *et al.* (2018), o tabagismo atual ou prévio (menos de um ano sem fumar) pode afetar a expressão de biomarcadores presentes na saliva para periodontite, inclusive a expressão da MMP-9. Nesse estudo não só relataram pesquisas anteriores, como também puderam evidenciar os baixos níveis dessa enzima em pacientes com o hábito de fumar. Diante disso, o processo de cicatrização de feridas na cavidade bucal se torna comprometido. O cianeto de hidrogênio, monóxido de carbono e, principalmente, nicotina, substâncias presentes na fumaça dos cigarros, causam anóxia tecidual, hipóxia celular, vasoconstrição, reduz a capacidade das hemácias de carregarem oxigênio e causa intoxicação ao sistema de enzimas necessárias para cicatrização de feridas. Portanto, essas alterações evidenciadas inibem o processo fisiológico de cicatrização (SILVERSTEIN *et al.*, 1992). Na presente pesquisa, 84% dos pacientes participantes relataram serem tabagistas prévios e/ou atuais, porém 76% deles deixaram de ser fumantes com uma margem mínima de um ano e, 8% continuaram com o hábito de fumar após o

tratamento oncológico. Portanto, o tabagismo pode ter contribuído para reduzir os níveis de MMP-9 salivar nos pacientes estudados, apesar de não ter sido realizado estudo pareado com os indivíduos do nosso grupo controle.

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou redução do volume salivar e da concentração de MMP-9 em saliva de pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço. A diminuição da concentração da MMP-9 salivar pode estar associada a alteração dos processos de remodelamento tecidual, ósseo e ao reparo de feridas, os quais podem estar envolvidos em patologias bucais, como mucosite, hipossalivação, osteorradiocrose. A quimioterapia parece influenciar na concentração salivar de MMP-9. Estudos futuros em amostras teciduais e em pacientes com osteorradiocrose poderão elucidar o papel desta enzima nas alterações bucais dos pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALALI, A. M.; WALSH, T.; MARANZANO, M. CYFRA 21-1 and MMP-9 as salivary biomarkers for the detection of oral squamous cell carcinoma: a systematic review of diagnostic test accuracy. **International journal oral maxillofacial of surgery**, p. 1-11, 2020.

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.

ALIAS, A.; HENRY, M. Psychosocial effects of head and neck cancer. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 499-512, 2018.

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, **Peptides**, v. 72, p. 4-15, 2015.

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.

BLANCHARD, P. *et al.* Chemotherapy and radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma: an update of the MAC-NPC meta-analysis. **The lancet oncology**, v. 16, n. 6, p. 645-655, 2015.

CALVER, L. *et al.* The effect of psychological interventions on quality of life in patients with head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. **European journal of cancer care**, v. 27, n. 1, p. e12789, 2017.

CHAUDHARY, A. K. *et al.* Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck, **Journal of biomedical science**, v. 17, n.1, p. 10, 2010.

CHAVES, A. L. G. *et al.* Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela

Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, 2020. **Sociedade brasileira de oncologia clínica**. Disponível em: <
https://www.sboc.org.br/images/diretrizes/diretrizes_pdfs/2020/lote_6/pt2/Diretrizes_SBOC_2020_-_Cabe%C3%A7a_e_Pesco%C3%A7o_localizado.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2020.

CHOW, L. Q. M. Head and neck cancer. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 1, p. 60-72, 2020.

COCA-PELAZ, A. *et al.* Head and neck cancer: A review of the impact of treatment delay on outcome. **Advances in therapy**, v. 35, n. 2, p. 153-160, 2018.

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.

EVANS, E. W. Treating scars on the oral mucosa. **Facial plastic surgery clinics**, v. 25, n. 1 p. 89-97, 2017.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. e359-e386, 2015.

GHALLAB, N.A.; SHAKER, O. G. Serum and salivary levels of chemerin and MMP-9 in oral squamous cell carcinoma and oral premalignant lesions. **Clinical oral investigations**, v. 21, n. 3, p. 937-947, 2017.

HAUSSAMANN, J. *et al.* Addition of chemotherapy to hyperfractionated radiotherapy in advanced head and neck cancer—a meta-analysis. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 195, n. 12, p. 1041-1049, 2019.

JELLEMA, A. P. *et al.* Unilateral versus bilateral irradiation in squamous cell head and neck cancer in relation to patient-rated xerostomia and sticky saliva. **Radiotherapy and Oncology**, v. 85, n. 1, p. 83-89, 2007.

LAHDENTAUSTA, L. *et al.* Smoking confounds the periodontal diagnostics using saliva biomarkers, **Journal of periodontology**, v. 90, n. 5, p. 475-483, 2018.

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. **Mayo clinic proceedings**, v. 91, n. 3, p. 386-396, 2016.

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.

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.

ORTEGA, N. *et al.* How proteases regulate bone morphogenesis. **Annals of 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**, v. 148, p. 203-303, 2017.

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.

SEMRAU, R. The role of radiotherapy in the definitive and postoperative treatment of advanced head and neck cancer, **Oncology research and treatment**, v. 40, n. 6, p. 347-352, 2017.

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

SHREE, K. H. *et al.* Saliva as a diagnostic tool in oral squamous cell carcinoma—a systematic review with meta-analysis. **Pathology & Oncology Research**, v. 25, n. 2, p. 447-453, 2019.

STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. **Revista de ODONTOLOGIA da UNESP**, v. 47, n. 4, p. 189-197, 2018.

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.

VIRÓS, D. *et al.* Prognostic role of MMP-9 expression in head and neck carcinoma patients treated with radiotherapy or chemoradiotherapy. **Oral oncology**, v. 49, n. 4, p. 322-325, 2013.

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.

YAN, K.; AGRAWAL, N.; GOOI, Z. Head and neck masses. **Medical clinics**, v.102, n. 6, p. 1013-1025, 2018.

Anexo 1. Artigo científico produzido a partir deste trabalho.



Salivary molecules of bone remodeling and tissue repair after head and neck radiotherapy

Eduardo Morato de OLIVEIRA¹ 
Rafael Soares GUIEIRO¹ 
Bárbara Lima CRUZ¹ 
Maria Cássia Ferreira de AGUIAR¹ 
Janine Mayra da SILVA¹ 
Tarcília Aparecida SILVA¹ 
Patrícia Carlos CALDEIRA¹ 

Abstract: Head and neck radiotherapy causes quantitative and qualitative changes in saliva. The objective of this case-control study was to evaluate the salivary biomarkers associated with bone remodeling and tissue repair in patients submitted to radiotherapy for head and neck cancer treatment, compared with non-irradiated individuals. Total unstimulated saliva was collected for EUSA assay analysis of receptor activator for nuclear factor κ B (RANK) and its ligand (RANKL) osteoclastogenesis matrix metalloproteinase-9/