

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

RAFAEL SOARES GUIEIRO

**ESTUDO DO *VEGF* SALIVAR EM PACIENTES IRRADIADOS EM
CABEÇA E PESCOÇO**

BELO HORIZONTE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

RAFAEL SOARES GUIEIRO

**ESTUDO DO *VEGF* SALIVAR EM PACIENTES IRRADIADOS EM
CABEÇA E PESCOÇO**

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: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Carlos Caldeira

BELO HORIZONTE

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha orientadora Professora Dra. Patrícia Carlos Caldeira pela oportunidade de participar nesse projeto tão importante, me proporcionando grande aprendizado e crescimento pessoal, agradeço por seus conselhos, sua confiança, disposição, dedicação e paciência ao longo desses anos. Agradeço o apoio financeiro recebido das agências de fomento FAPEMIG (APQ-01700-16) e CNPq (405585/2018-7). Agradeço aos pacientes que se disponibilizaram a contribuir com nossa pesquisa. Agradeço a Faculdade de Odontologia da UFMG pela oportunidade do conhecimento e da formação profissional. Finalmente, agradeço a todos os colegas e profissionais que se empenharam e tornaram possível o desenvolvimento e conclusão desse estudo.

RESUMO

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é conhecido por ter grande atuação nos processos de angiogênese, inclusive na regeneração da mucosa oral. A radioterapia em cabeça e pescoço produz toxicidades graves na boca e vários estudos relacionaram alguns desses efeitos ao VEGF. Além disso, a radioterapia em cabeça e pescoço provoca alterações quantitativas e qualitativas na saliva. O presente estudo objetivou investigar a concentração do VEGF na saliva de pacientes submetidos a tratamento radioterápico em região de cabeça e pescoço, comparando com indivíduos não irradiados. Foram coletadas amostras de saliva não estimulada de 24 pacientes irradiados e 24 não irradiados pareados por sexo e idade, que constituíram o grupo controle. As amostras de saliva foram quantificadas volumetricamente e a dosagem do VEGF foi feita pela técnica de ELISA. Análise estatística foi realizada e valores de 'p' menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre a concentração de VEGF na saliva de pacientes irradiados e o grupo controle. Pacientes irradiados apresentaram redução do volume salivar ($p < 0,05$). Conclui-se que pacientes submetidos a radioterapia em região de cabeça e pescoço não apresentam alteração significativa do VEGF na saliva. Devido à relevância do VEGF nos mecanismos fisiológicos e patológicos da cavidade bucal, consideramos importante a continuidade de estudos sobre este biomarcador em pacientes oncológicos, a fim de elucidar melhor o efeito da radiação em cabeça e pescoço nas dosagens salivares de VEGF.

Palavras-chave: fator A de crescimento do endotélio vascular, saliva, radioterapia, angiogênese, VEGF.

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a major molecule for angiogenesis, including the oral mucosa regeneration. Head and neck radiotherapy produces severe toxicities in mouth and several studies have related some of these effects to VEGF. Furthermore, the head and neck radiotherapy causes quantitative and qualitative changes in saliva. The present study aimed to investigate the concentration of salivary VEGF of patients submitted to head and neck radiotherapy and to compare with non-irradiated patients. Unstimulated saliva samples were collected from 24 irradiated patients and 24 non-irradiated individuals matched for sex and age (control group). Saliva volume was measured and VEGF concentration was assessed using ELISA assay. No difference ($p>0,05$) was observed between the concentrations of VEGF in irradiated patients and the control group. Irradiated patients had a reduction ($p<0,05$) in salivary volume. It was concluded that patients submitted to radiotherapy on the head and neck region do not present significant alteration of salivary VEGF concentration after the radiation treatment. Due to the relevance of VEGF in the physiological and pathological mechanisms in the oral cavity, further studies on VEGF in cancer patients are warranted to better elucidate the effect of head and neck radiation on salivary VEGF.

Key words: vascular endothelial growth factor A, saliva, radiotherapy, angiogenesis, VEGF.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Radioterapia e tratamento de câncer	6
1.2. Saliva humana	6
1.3. VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>).....	7
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo Geral	9
3.2. Objetivos Específicos	9
4. METODOLOGIA	9
4.1. Aspectos éticos e legais.....	9
4.2. Pacientes x grupo controle.....	10
4.3. Coleta de saliva.....	10
4.4. Dosagem do VEGF (ELISA).....	11
4.5. Análise estatística	11
5. RESULTADOS	12
6. DISCUSSÃO	19
7. CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22
ANEXOS	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 Radioterapia e tratamento de câncer

O tratamento de câncer de cabeça e pescoço geralmente envolve cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A radioterapia em região de cabeça e pescoço produz toxicidades inevitáveis para o tecido normal e a cavidade oral é muito susceptível a efeitos diretos e indiretos da radiação. As alterações mais comuns e importantes na saúde oral de pacientes irradiados são hipossalivação e xerostomia, disgeusia, infecções orais, cárie dental agressiva, mucosite, trismo e osteoradionecrose (FREITAS et al., 2011).

Danos às glândulas salivares e a consequente redução da produção de saliva é um efeito adverso comum da radioterapia, que pode ser temporário ou permanente. Uma vez que a saliva desenvolve vários papéis na homeostasia da cavidade oral (veja abaixo), a hipossalivação compromete significativamente a saúde oral de pacientes irradiados em cabeça e pescoço.

1.2 Saliva humana

Saliva é um fluido corporal complexo que participa em diversas funções: lubrificação da cavidade oral, paladar e digestão, proteção da mucosa oral e esofágica, e proteção dos dentes. A saliva não estimulada é uma solução hipotônica, consistindo de água (99%), mucinas (principalmente MUC5B e MUC7), eletrólitos (cálcio, fosfato, sódio, cloro, bicarbonato, potássio), enzimas (alpha-amilase), proteínas catiônicas (histatina, estaterina, alpha e beta-defensinas, lisozima) e, também, IgA secretora. A composição eletrolítica da saliva é alterada com a estimulação da salivação, com aumento do sódio e bicarbonato e pequena diminuição de potássio. Também se sabe que o pH salivar e a concentração de bicarbonato diminuem com a redução do fluxo salivar. Além disso, o fluxo salivar apresenta um ritmo circadiano, com seu pico no final da tarde, portanto, a hora da coleta da saliva interfere diretamente em seu volume e composição (DAWES et al., 2015).

Ainda de acordo com Dawes et al. (2015), o efeito protetor da saliva no reparo de feridas na boca pode ser atribuído a sua função lubrificante (prevenindo o ressecamento da mucosa e favorecendo traumas), aos componentes antibacterianos

presentes nela (prevenindo a infecção das feridas), e a presença de fatores de crescimento, como o EGF, TGF- α , fator trefoil 3, VEGF e histatinas salivares.

Vários estudos mostraram como a quantidade e composição da saliva se alteram com a radioterapia, e alguns apontam para alterações na concentração de fatores de crescimento.

1.3 VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

O VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular, pertence a uma superfamília de proteínas de fatores de crescimento derivados de plaquetas, sendo formado por glicoproteínas que podem originar estruturas variadas e assumir diferentes funções no organismo. Em geral, o VEGF assume função proangiogênica, tendo grande atuação no desenvolvimento de vasos sanguíneos e linfáticos. No entanto, existem outras isoformas com propriedades antiangiogênicas (BLOCHOWIAK et al., 2018).

Segundo Melincovici et al. (2018), o VEGF-A é o tipo mais potente e importante no estímulo da angiogênese, sendo regulador de efeitos como proliferação celular, inibição de apoptose de células endoteliais, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células inflamatórias. Além disso, essa forma é secretada por diversas células do organismo em resposta a hipóxia, como macrófagos, células T, células da retina, leucócitos, plaquetas, células tumorais, osteoblastos e pelas próprias células endoteliais.

De acordo com Ramjiawan et al. (2017), a angiogênese é um processo que leva a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes. Esse processo pode ocorrer em situações fisiológicas, como no desenvolvimento embrionário ou no reparo tecidual, mas também está associado com a formação e crescimento de tumores, ocorrendo um desequilíbrio entre os fatores próangiogênicos e antiangiogênicos. Segundo Viillard e Larrivé (2017), o crescimento aumentado e anormal de vasos sanguíneos observado em neoplasias, é causado por níveis elevados de fatores de crescimento secretados pelas células tumorais, principalmente, pelo VEGF.

Diversos fatores de crescimento são secretados em grande quantidade na saliva, incluindo o VEGF, sendo derivado, principalmente, das glândulas parótidas. A grande concentração de VEGF salivar está associada com a alta capacidade

regenerativa da mucosa oral, por ser um fator regulador direto e indireto da angiogênese, processo crítico para o reparo tecidual (KESWANI et al., 2013). Além disso, de acordo com Upile et al. (2009), o VEGF pode ativar fosfolipase C, induzir aumento de Ca^{2+} livre e estimular a liberação do fator Von Willebrand, contribuindo para a rápida regeneração tecidual da mucosa oral e, também, de outras regiões do trato digestivo. O VEGF presente na saliva pode estar associado, ainda, à própria secreção de saliva, por meio da permeabilização de capilares intraglandulares.

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. Segundo Al-Hassiny et al. (2017), existem evidências de que doenças inflamatórias crônicas estão diretamente relacionadas com um distúrbio do processo angiogênico e disfunção de células endoteliais. De acordo com Blochowiak et al. (2018), o VEGF é seletivo para células endoteliais vasculares e é o fator predominante na neovascularização em várias neoplasias em glândulas salivares. Além disso, a alta concentração de VEGF encontrada em tecidos tumorais pode estar relacionado com o pior prognóstico para o paciente e a quantificação prévia desse fator de crescimento poderia influenciar as escolhas durante o tratamento da lesão e ajudar a prever a evolução da doença (SCHLÜTER et al., 2018).

Existem vários estudos sobre os níveis de VEGF em pacientes oncológicos. No entanto, poucos estudos fizeram a dosagem do fator de crescimento em saliva de pacientes que concluíram o tratamento radioquimioterápico. Como exemplo, Citrin et al. (2012) realizou em seu estudo a dosagem de várias citocinas, incluindo o VEGF, na saliva de pacientes que ainda não haviam terminado o tratamento radioterápico e concluiu que os níveis de VEGF estavam consideravelmente elevados nas regiões altamente irradiadas.

2 JUSTIFICATIVA

Radioterapia na região de cabeça e pescoço implica vários efeitos adversos relevantes para a saúde oral e geral dos pacientes, alguns deles associados à redução da vascularização dos tecidos. No entanto existem poucos estudos de biomarcadores associados a angiogênese na saliva de pacientes irradiados em cabeça e pescoço. Além de ser um espécime de coleta simples, a identificação desses biomarcadores na

saliva não só ajudará a esclarecer a patogênese das alterações orais em pacientes irradiados em cabeça e pescoço, como também pode sugerir possíveis biomarcadores para identificar pacientes de risco para o desenvolvimento dessas alterações.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os níveis salivares de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) em pacientes irradiados em cabeça e pescoço.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar o volume de saliva não estimulada produzida pelos pacientes irradiados, comparando com grupo controle.
- Dosar os níveis salivares de VEGF em amostras de pacientes submetidos à radioterapia em cabeça e pescoço.
- Comparar os níveis salivares de VEGF dos pacientes com grupo controle, considerando a realização ou não de quimioterapia concomitante à radioterapia.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos e legais

A presente pesquisa e o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Protocolo CAAE 85229518.9.0000.5149).

4.2 Pacientes x grupo controle

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 na região de cabeça e pescoço”, da Faculdade de Odontologia da UFMG. Foram excluídos pacientes com

sinais de doença periodontal ativa, com tumores recidivantes, comunicação buco-nasal ou buco-sinusal, portadores de HIV ou doenças autoimunes, submetidos a procedimentos odontológicos há menos de um mês, em uso atual ou prévio de bifosfonatos ou medicamentos com efeito anti-inflamatório no momento da coleta ou até um mês antes e pacientes portadores de doenças sistêmicas não controladas. Dados clínicos e demográficos foram coletados dos prontuários Odontológicos dos pacientes, como a cidade de residência, o hospital de procedência, doenças sistêmicas, localização do tumor primário, classificação histológica do tumor e estadiamentos T e N.

Foram selecionados indivíduos não irradiados para compor o grupo controle, pareados por sexo e idade com os pacientes irradiados, que compareceram como acompanhantes nas clínicas da Faculdade de Odontologia da UFMG. Os mesmos critérios de exclusão foram aplicados.

4.3 Coleta de saliva

Amostra de saliva não estimulada foi coletada entre 14:00hs e 16:00hs em clínica odontológica. Os pacientes foram orientados a não comer, ingerir bebida alcoólica ou fumar 1 hora antes da coleta. Próteses removíveis foram retiradas e a boca dos pacientes foi lavada com água destilada. Então, os pacientes foram orientados a manter toda saliva produzida na boca por 5 minutos e depois cuspir em um tubo Falcon estéril, que foi mantido em isopor com gelo, até o processamento da amostra no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Primeiramente, foi feita a aferição do volume salivar coletado por meio de pipetas, registrando a quantidade de saliva em microlitros para cada amostra. Depois, as amostras foram centrifugadas por dez minutos, a 1500 rotações por minuto e a 4° Celsius. Ao volume salivar centrifugado acrescentou-se solução tampão de extração de citocinas, proporção 1:1 em volume. As amostras foram aliquotadas e armazenadas em freezer a -80°C.

4.4 Dosagem do VEGF (ELISA)

O biomarcador foi dosado através da técnica de ELISA (*enzyme-linked immunoassay*) empregando-se kits (R&D, DuoSet ELISA, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA). 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

Os resultados do estudo foram organizados em um banco de dados para realização das análises estatísticas, utilizando-se os programas SPSS® versão 19.0

e GraphPad Prism® versão 7.0. Foi realizado teste Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

Foram selecionados 32 pacientes que se submeteram previamente a radioterapia em região de cabeça e pescoço. Desse total, foram excluídas as amostras de 8 pacientes por quantidade insuficiente para análise laboratorial. Assim, a amostra final foi de 24 pacientes, dos quais 14 (58%) foram submetidos, também, a quimioterapia para tratamento do tumor. O grupo controle foi composto por 24 indivíduos não irradiados, pareados por sexo e idade.

Dentre os 24 pacientes incluídos nas análises, 18 eram homens e 6 eram mulheres, representando 75% e 25% dos casos, respectivamente. A idade mediana desses pacientes foi de 60 anos, sendo que a maioria (45,8%) se encontrava na sétima década de vida, com representatividade de 11 indivíduos. Os pacientes apresentavam, em média, apenas 15,5 dentes remanescentes em boca e mesmo nessa situação, 19 pacientes (79,2%) não usavam nenhum tipo de prótese removível.

15 (62,5%) pacientes residiam no município de Belo Horizonte, 7 (29,2%) na região metropolitana e 2 (8,3%) em outras cidades de Minas Gerais. Moradores de zona urbana contabilizaram 23 (95,8%) casos e moradores de zona rural apenas 1 (4,2%) caso. Os pacientes tinham procedência de vários hospitais diferentes, no entanto, eles foram mais frequentemente tratados nos hospitais Mário Penna, Luxemburgo e no Hospital das Clínicas, que juntos contabilizaram 15 (62,5%) casos. Também houve casos em que o paciente fez o tratamento cirúrgico e a radioterapia em hospitais diferentes, sendo que 18 (75%) tiveram que se submeter a cirurgia para tratamento da lesão, além da radioterapia. A frequência exata de cada hospital pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1: Hospital de procedência de 24 pacientes atendidos no Projeto Atendimento de suporte Odontológico ao paciente com câncer em região de Cabeça e Pescoço em 2019.

Hospital	Frequência	Porcentagem
Mário Penna	6	25,0
Luxemburgo	5	20,8
Hospital das Clínicas	4	16,7
Baleia	3	12,5
São Francisco	2	8,3
Vila da Serra	1	4,2
Mário Penna e Luxemburgo	1	4,2
CEROM	1	4,2
Vera Cruz	1	4,2
Total	24	100,0

Fonte: própria autoria

Quando questionados sobre serem portadores de alguma doença sistêmica, a maioria dos pacientes relatou não apresentar distúrbios sistêmicos e que não fazia uso de nenhum tipo de medicamento diário, representando 15 (62,5%) casos. Dentre as doenças sistêmicas relatadas, hipertensão foi a mais frequente e a segunda mais frequente foi diabetes. A frequência de cada doença pode ser vista na Tabela 2.

Tabela 2: Doenças sistêmicas relatadas por 24 pacientes atendidos no Projeto Projeto Atendimento de suporte Odontológico ao paciente com câncer em região de Cabeça e Pescoço em 2019.

Doença sistêmica	Frequência	Porcentagem
Não relatou	15	62,5
Hipertensão	5	20,8
Diabetes	2	8,3
Outra doença endócrina	1	4,2
Outra doença cardiovascular	1	4,2
Total	24	100,0

Fonte: própria autoria

Quando questionados sobre tabagismo, 18 (75%) pacientes responderam que eram tabagistas até descobrirem o tumor e pararam totalmente com o hábito. 2 (8,3%) relataram que ainda fumam, mesmo após o término do tratamento. Apenas 4 (16,7%) pacientes relataram que nunca fumaram.

Quanto ao etilismo, 6 pacientes (25%) relataram que nunca tiveram o hábito de consumir bebidas alcoólicas. 12 (50%) relataram que consumiam socialmente antes de descobrirem o tumor e pararam o consumo e 6 (25%) relataram que ainda consomem socialmente.

Em relação a dose de radiação recebida, os pacientes que se submeteram apenas a radioterapia receberam uma dose total mediana de 60 Gy e já haviam concluído o tratamento radioterápico há 16 meses (valor mediano). Já os pacientes que se submeteram a quimioterapia associada à radioterapia receberam uma dose total mediana de 66 Gy e haviam concluído a radioterapia há 8 meses (valor mediano).

Os pacientes tiveram o desenvolvimento do tumor primário em várias regiões diferentes da cabeça e pescoço, sendo mais frequentemente acometidos na orofaringe, na laringe e no soalho bucal. A grande maioria dos casos (87,5%) foi classificada histologicamente como carcinoma de células escamosas. Quanto ao estadiamento clínico, a maioria dos tumores foram T4 (33,3%) e sem envolvimento de linfonodos (45,8%). As características tumorais são descritas em detalhes na Tabela 3.

Tabela 3: Características dos tumores de 24 pacientes atendidos no Projeto Projeto Atendimento de suporte Odontológico ao paciente com câncer em região de Cabeça e Pescoço em 2019.

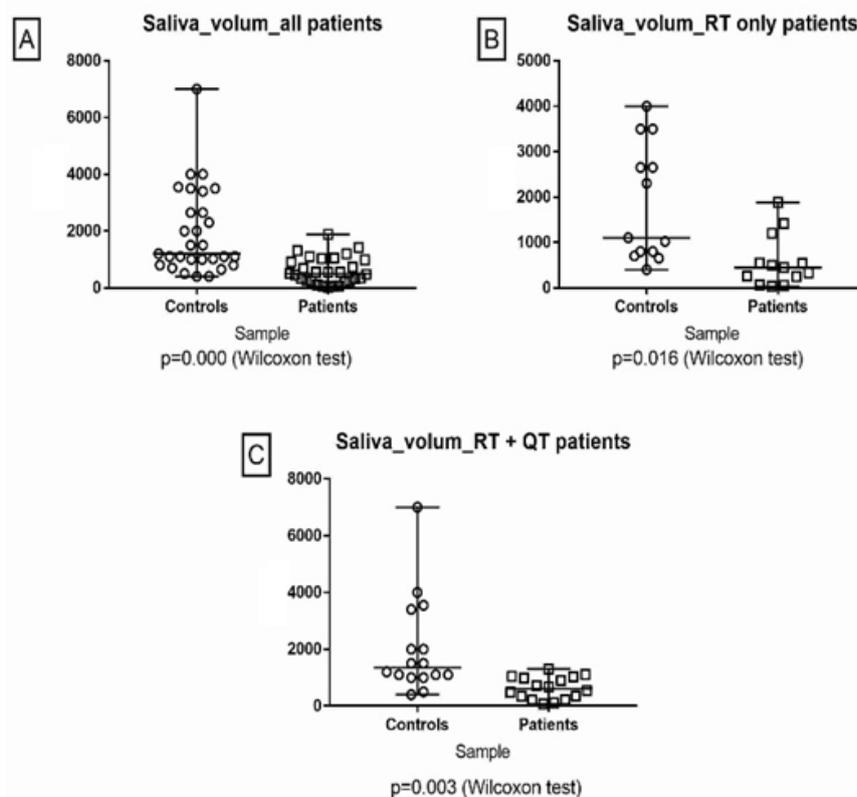
Localização do tumor	Frequência	Porcentagem
Orofaringe não especificada	7	29,2
Laringe	6	25,0
Soalho de boca	5	20,8
Trígono retromolar e gengiva	2	8,3
Amígdala	1	4,2
Órbita	1	4,2
Nasofaringe	1	4,2
Seio piriforme	1	4,2
Total	24	100,0
Classificação Histológica	Frequência	Porcentagem
Carcinoma de células escamosas	21	87,5
Linfoma	1	4,2
Adenocarcinoma	1	4,2
Carcinoma Adenoide Cístico	1	4,2
Total	24	100,0
Estadiamento T	Frequência	Porcentagem
1	2	8,3
2	6	25,0
3	6	25,0
4	8	33,3
Total	22	91,7
Faltando	2	8,3
Estadiamento N	Frequência	Porcentagem
0	11	45,8
1	3	12,5
2	6	25,0
3	3	12,5
Total	23	95,8
Faltando	1	4,2

Fonte: própria autoria

Dos pacientes incluídos nas análises, apenas 2 (8,3%) desenvolveram osteoradionecrose previamente a este estudo e ambas foram resolvidas completamente antes da coleta da saliva.

O volume salivar produzido pelos pacientes irradiados foi significativamente diminuído em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Esta diferença também foi evidenciada quando se comparou pacientes submetidos apenas à radioterapia e controles e pacientes submetidos à quimioterapia e radioterapia e controles. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que receberam radioterapia e os pacientes que realizaram radioterapia e quimioterapia. Os volumes salivares podem ser vistos no gráfico 1.

Gráfico 1 – Comparação do volume salivar entre os grupos de pacientes irradiados e grupo controle.



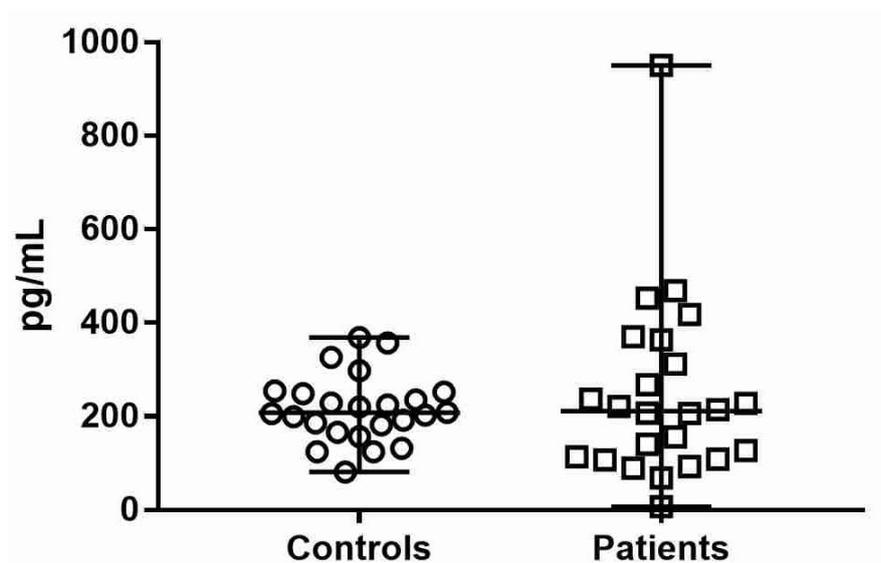
Fonte: própria autoria

No gráfico 1-A é apresentado o volume salivar das amostras do grupo controle e de pacientes irradiados. O volume máximo do grupo controle foi 7000,00 μL , o mínimo foi 400,00 μL e a mediana foi 1150,00 μL . O volume máximo dos pacientes foi 1880,00 μL , o mínimo foi 200,00 μL e a mediana foi 550,00 μL . No gráfico 1-B é apresentado o volume salivar do grupo controle e de pacientes apenas irradiados. O volume máximo do grupo controle foi 3500,00 μL , o mínimo foi 650,00 μL e a mediana foi 1062,50 μL . O volume máximo dos pacientes apenas irradiados foi 1880,00 μL , o mínimo foi 250,00 μL e a mediana foi 520,00 μL . No gráfico 1-C é apresentado o volume salivar do grupo controle e pacientes que se submeteram a radioterapia e quimioterapia. O volume máximo do grupo controle foi 7000,00 μL ,

o mínimo foi 400,00 μL e a mediana foi 1350,00 μL . O volume máximo dos pacientes foi 1300,00 μL , o mínimo foi 200,00 μL e a mediana foi 700,00 μL .

A comparação dos níveis salivares de VEGF entre os pacientes (n=24) e controles (n=24) não revelou diferença estatisticamente significativa. De maneira semelhante, a comparação entre os pacientes que receberam radioterapia e quimioterapia (n=14) e controles (n=14) não revelou diferenças. Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a dosagem de VEGF dos pacientes apenas irradiados (n=10) e o grupo controle (n=10). Os valores das dosagens de cada grupo podem ser vistos nos gráficos 2,3 e 4.

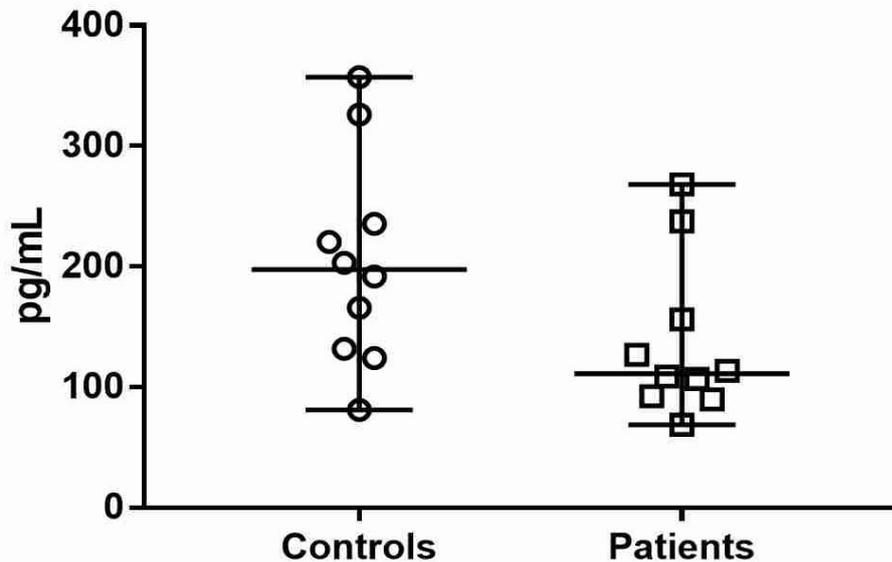
Gráfico 2 – Dosagem de VEGF salivar no grupo controle e em todos os pacientes (n=24)



Fonte: própria autoria

A dosagem máxima de VEGF obtida no grupo controle foi 369,0 pg/mL, a mínima foi 81,3 pg/mL e a mediana foi 207,6 pg/mL. Já nos pacientes, a máxima foi 950,1 pg/mL, a mínima foi 6,7 pg/mL e a mediana foi 210,8 pg/mL. Não houve alterações estatisticamente significativas (Teste Wilcoxon; $p=0,941$).

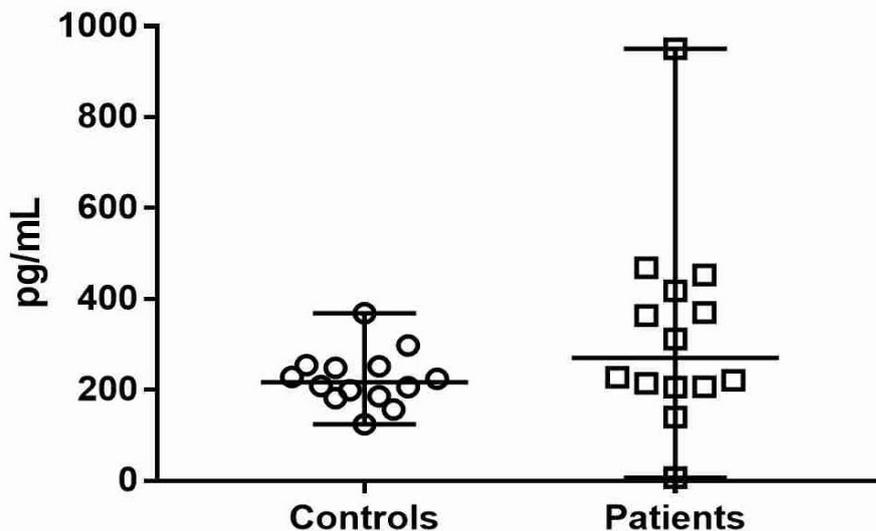
Gráfico 3 – Dosagem de VEGF salivar no grupo controle e em pacientes submetidos apenas à radioterapia (n=10)



Fonte: própria autoria

A dosagem máxima de VEGF obtida no grupo controle foi 357,2 pg/mL, a mínima foi 81,3 pg/mL e a mediana foi 197,5 pg/mL. Já no grupo de pacientes apenas irradiados a dosagem máxima foi 268,0 pg/mL, a mínima foi 68,7 pg/mL e a mediana foi 111,2 pg/mL. Não houve alterações estatisticamente significativas (Teste Wilcoxon; $p=0,084$).

Gráfico 4 – Dosagem de VEGF salivar no grupo controle e em pacientes submetidos à radioterapia e à quimioterapia (n=14)



Fonte: própria autoria

A dosagem máxima de VEGF obtida no grupo controle foi 369,0 pg/mL, a mínima foi 124,6 pg/mL e a mediana foi 216,8 pg/mL. Já nos pacientes a dosagem máxima obtida foi 950,1 pg/mL, a mínima foi 6,7 pg/mL e a mediana foi 270,2 pg/mL. Não houve alterações estatisticamente significativas (Teste Wilcoxon; $p=0,191$).

6 DISCUSSÃO

O VEGF é o principal fator de crescimento envolvido nos processos de angiogênese e linfangiogênese. Sua atuação nesses processos é variada e depende de suas isoformas. A produção desse fator de crescimento é feita por vários tipos celulares em todo o organismo humano e já é sabido que o VEGF pode atuar tanto em situações fisiológicas, quanto em situações patológicas. Além disso, sabe-se, também, que o VEGF é o principal fator responsável pela neovascularização em processos tumorais, desde a formação, crescimento e até a manutenção das células tumorais. Assim, a total compreensão da atuação do VEGF no organismo tornou-se imprescindível para o maior entendimento dos processos neoplásicos.

Dessa forma, o VEGF se tornou objeto de estudo de diversas pesquisas com pacientes oncológicos, as quais buscam entender a relação do fator de crescimento com a doença, os efeitos do tratamento radioquimioterápico sobre o VEGF e se os efeitos tóxicos desse tratamento estão relacionados a uma alteração da concentração desse fator no organismo.

Brieger et al. (2007) expuseram células de seis tipos de câncer a doses pequenas de radiação e perceberam que a concentração de VEGF aumentou significativamente e, além disso, correlacionaram o aumento desse fator com a resistência progressiva das células tumorais a radiação. De forma semelhante, Citrin et al. (2012) perceberam um aumento significativo na concentração de VEGF na saliva de pacientes ainda em radioterapia, que já haviam recebido no mínimo 60 Gy de radiação.

Srivastava et al. (2014) realizaram um estudo da concentração de VEGF-A no sangue de 72 pacientes no início do tratamento radioquimioterápico para carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço e concluíram que o VEGF-A estava significativamente aumentado em relação ao grupo de indivíduos não irradiados. Além disso, perceberam que os níveis desse fator de crescimento estavam mais elevados em pacientes com positividade para linfonodos e em pacientes em estágio avançado da doença (III-IV). Ainda, foi feita a avaliação da resolução da doença ao final do tratamento e, assim como Brieger et al. (2007), Srivastava et al. (2014) perceberam que pacientes com maior concentração de VEGF-A responderam pior ao tratamento radioquimioterápico.

Schlüter et al. (2018) analisaram a concentração de VEGF e CD31 em tecido de tumores de laringe retirados durante a biópsia da lesão em 87 pacientes, tentando correlacionar a expressão desses fatores com o prognóstico dos indivíduos. Ao final do estudo, concluíram que pacientes com tumores menores (T1 e T2) e alta concentração de VEGF e CD31 apresentavam pior prognóstico e maiores chances de recidiva da lesão do que aqueles com baixa concentração de VEGF e CD31.

Pode-se perceber que a maioria dos estudos sobre o VEGF envolvendo pacientes oncológicos são realizados antes da conclusão do tratamento radioquimioterápico para os tumores (BRIEGER et al., 2007; CITRIN et al., 2012; SCHLÜTER et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2014). No entanto, o presente estudo foi feito após a conclusão desse tratamento, buscando elucidar os efeitos latentes da radiação em cabeça e pescoço sobre a concentração de VEGF no organismo. Como descrito nos resultados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na concentração de VEGF entre os pacientes irradiados e o grupo controle de indivíduos não-irradiados, apesar dos valores medianos obtidos para os pacientes apenas irradiados terem sido menores do que no grupo controle. Enquanto isso, os trabalhos sobre o VEGF no início do tratamento radioterápico encontram uma alta concentração desse fator de crescimento no sangue, no tecido tumoral e até mesmo na saliva (BRIEGER et al., 2007; CITRIN et al., 2012; SCHLÜTER et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2014). Assim, com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se inferir que a concentração de VEGF na saliva dos pacientes irradiados caminha para a normalização após retirado o estímulo da radiação, não se observando efeitos tardios do tratamento radioquimioterápico para tumores em região de cabeça e pescoço sobre o VEGF salivar.

A hipossalivação e a própria alteração da composição da saliva são efeitos esperados da radiação. Esse efeito pode ser percebido no presente trabalho, no qual foi mostrado que o volume salivar dos pacientes irradiados estava significativamente diminuído em relação ao grupo de indivíduos não-irradiados, mesmo após vários meses do término do tratamento. Alguns estudos (PAMMER et al., 1998; UPILE et al., 2009) sugerem que o VEGF salivar tem atuação na própria secreção da saliva e poderia ter alguma participação na hipossalivação observada em pacientes irradiados. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não estão de acordo com essa hipótese, uma vez que os pacientes irradiados estudados apresentam mudanças significativas na quantidade de saliva, mas não apresentam alterações

estatisticamente significativas no VEGF salivar, sugerindo que o VEGF não pode ser o principal e único fator regulador do fluxo salivar. No entanto, devido à relevância do VEGF nos mecanismos fisiológicos e patológicos da cavidade bucal, consideramos importante a continuidade de estudos sobre este biomarcador em pacientes oncológicos, a fim de elucidar melhor o efeito da radiação em cabeça e pescoço nas dosagens salivares de VEGF, em especial, após o término do tratamento radioterápico.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho buscou investigar a concentração de VEGF na saliva de pacientes submetidos à radioterapia em região de cabeça e pescoço, que passaram ou não por quimioterapia, comparando-a com a de controles saudáveis. De forma diferente da maioria dos estudos sobre o VEGF em pacientes irradiados, a coleta das amostras de saliva foi feita após a conclusão do tratamento radioterápico. Já é sabido que o VEGF desenvolve papel importante nos processos angiogênicos no organismo, em situações fisiológicas e em situações patológicas e que a concentração desse fator fica alterada em pacientes sob radioterapia. Dessa forma, a persistência dessa alteração mesmo após o término do tratamento poderia indicar maior susceptibilidade desses indivíduos a desordens na cavidade oral, como mucosa fragilizada, doenças inflamatórias e osteoradionecrose. Neste trabalho foi mostrado que pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço não apresentam diferença estatisticamente significativa da concentração de VEGF na saliva em relação a indivíduos não irradiados. Portanto, após o término da radioterapia parece ocorrer a normalização da concentração de VEGF na saliva desses pacientes. Ainda assim, são necessários mais estudos sobre esse fator de crescimento após concluído o tratamento radioterápico a fim de confirmar este resultado. Sugere-se, também, novos estudos do VEGF após a radioterapia não apenas na saliva, mas também em tecido ósseo e da mucosa, como em fragmentos cirúrgicos, de pacientes em tratamento para osteoradionecrose, por exemplo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HASSINY, A. et al. Upregulation of angiogenesis in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, v. 47, n. 2, p. 173-178, Fev 2018.

BASSO, F. G. et al. Proliferation, migration, and expression of oral-mucosal-healing-related genes by oral fibroblasts receiving low-level laser therapy after inflammatory cytokines challenge. **Lasers Surg Med**, v. 48, n. 10, p. 1006-1014, Dez 2016.

BOARD, P. D. Q. S. A. P. C. E. Oral Complications of Chemotherapy and Head/Neck Radiation (PDQ(R)): Health Professional Version. In: (Ed.). **PDQ Cancer Information Summaries**. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), 2002.

BRAND, H. S.; VEERMAN, E. C. Saliva and wound healing. **Chin J Dent Res**, v. 16, n. 1, p. 7-12, 2013.

BRIEGER, J. et al. Impact of vascular endothelial growth factor release on radiation resistance. **Oncol Rep**, v. 18, n. 6, p. 1597-601, Dez 2007.

BŁOCHOWIAK, K. J. et al. Expression of VEGF₁₆₅b, VEGFR1, VEGFR2 and CD34 in benign and malignant tumors of parotid glands. **Adv Clin Exp Med**, v. 27, n. 1, p. 83-90, Jan 2018.

CITRIN, D. E. et al. Determination of cytokine protein levels in oral secretions in patients undergoing radiotherapy for head and neck malignancies. **Radiat Oncol**, v. 7, p. 64, Abr 26 2012.

DAWES, C. et al. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 6, p. 863-74, Jun 2015.

DIJKEMA, T. et al. MUC5B levels in submandibular gland saliva of patients treated with radiotherapy for head-and-neck cancer: a pilot study. **Radiat Oncol**, v. 7, p. 91, Jun 15 2012.

DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **J Leukoc Biol**, v. 100, n. 5, p. 979-984, Nov 2016.

DUMBRIGUE, H. B. et al. Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 89, n. 6, p. 710-6, Jun 2000.

FREITAS, D. A. et al. Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. **Revista CEFAC**, v. 13, p. 1103-1108, 2011.

HAN, N. K. et al. Geranylgeranylacetone Ameliorates Intestinal Radiation Toxicity by Preventing Endothelial Cell Dysfunction. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 10, Out 2017.

JENSEN, S. B. et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. **Support Care Cancer**, v. 18, n. 8, p. 1039-60, Ago 2010.

JHAM, B. C.; DA SILVA FREIRE, A. R. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 72, n. 5, p. 704-8, Set 2006.

KESWANI, S. G. et al. Role of salivary vascular endothelial growth factor (VEGF) in palatal mucosal wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 21, n. 4, p. 554-62, Jul-Ago 2013.

KOJIMA, Y et al. Relationship between dental status and development of osteoradionecrosis of the jaw: a multicenter retrospective study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 124(2):139-145, Ago 2017.

LACOMBE, J. et al. Analysis of Saliva Gene Expression during Head and Neck Cancer Radiotherapy: A Pilot Study. **Radiat Res**, v. 188, n. 1, p. 75-81, Jul 2017.

LEE, Y. H.; WONG, D. T. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. **Am J Dent**, v. 22, n. 4, p. 241-8, Ago 2009.

MADRID, C.; ABARCA, M.; BOUFERRACHE, K. Osteoradionecrosis: an update. **Oral Oncol**, v. 46, n. 6, p. 471-4, Jun 2010.

MANGONI, M. et al. Normal tissues toxicities triggered by combined anti-angiogenic and radiation therapies: hurdles might be ahead. **Br J Cancer**, v. 107, n. 2, p. 308-14, Jul 2012.

MARX, R. E. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, n. 5, p. 283-8, Mai 1983.

MELINCOVICI, C. S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. **Rom J Morphol Embryol**, v. 59, n. 2, p. 455-467, 2018.

MOON, D. H. et al. Incidence of, and risk factors for, mandibular osteoradionecrosis in patients with oral cavity and oropharynx cancers. **Oral Oncol**, v. 72, p. 98-103, Set 2017.

NABIL, S.; SAMMAN, N. Incidence and prevention of osteoradionecrosis after dental extraction in irradiated patients: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 40, n. 3, p. 229-43, Mar 2011.

PAMMER, J. et al. Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary glands and is secreted in the saliva of healthy individuals. **J Pathol**, v. 186, n. 2, p. 186-91, Out 1998.

PETERSON, D. E. et al. Osteoradionecrosis in cancer patients: the evidence base for treatment-dependent frequency, current management strategies, and future studies. **Support Care Cancer**, v. 18, n. 8, p. 1089-98, Ago 2010.

RAGUSE, J. D. et al. Patient and treatment-related risk factors for osteoradionecrosis of the jaw in patients with head and neck cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 121, n. 3, p. 215-21.e1, Mar 2016.

RAMJIWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W.; DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? **Angiogenesis**, v. 20, n. 2, p. 185-204, Mai 2017.

SCHLUTER, A. et al. CD31 and VEGF are prognostic biomarkers in early-stage, but not in late-stage, laryngeal squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 272, Mar 2018.

SRIVASTAVA, V. K. et al. Serum vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) as a biomarker in squamous cell carcinoma of head and neck patients undergoing

chemoradiotherapy. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 7, p. 3261-5, 2014.

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

VIALARD, C.; LARRIVEE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 409-426, Nov 2017.

VIGARIOS, E.; EPSTEIN, J. B.; SIBAUD, V. Oral mucosal changes induced by anticancer targeted therapies and immune checkpoint inhibitors. **Support Care Cancer**, v. 25, n. 5, p. 1713-1739, Mai 2017.

VISSINK, A. et al. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 3, p. 213-25, 2003.

YANG, X. et al. VEGF-B promotes cancer metastasis through a VEGF-A-independent mechanism and serves as a marker of poor prognosis for cancer patients. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 22, p. E2900-9, Jun 2015.

ANEXOS

Anexo 1. Artigo científico produzido a partir deste trabalho.

Oncology
Elsevier Editorial System(tm) for Oral
Manuscript Draft

Manuscript Number: OO-D-19-608

Title: Salivary biomarkers of bone remodeling and tissue repair in patients submitted to head and neck radiotherapy.

Article Type: Original Research Article

Section/Category: Translational

Keywords: Saliva; Salivary proteins; Radiotherapy; Bone remodeling; Head and neck cancer.

Corresponding Author: Dr. Patrícia Carlos Caldeira, PhD

Corresponding Author's Institution: School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais

First Author: Eduardo M Oliveira

Order of Authors: Eduardo M Oliveira; **Rafael S Guieiro**; Bárbara L Cruz; Maria Cássia F Aguiar; Janine M Silva; Tarcília A Silva; Patrícia Carlos Caldeira, PhD

Abstract: Objective: The aim of this study was to evaluate salivary biomarkers associated to bone remodeling and tissue repair in patients submitted to head and neck radiotherapy.
Materials and Methods: Patients submitted to radiotherapy with or without chemotherapy for head and neck cancer treatment were prospectively selected. Healthy individuals never exposed to radiotherapy composed the comparison group, paired by sex and age. Total unstimulated saliva was collected. RANK, RANK-L, OPG, EGF, VEGF, and MMP-9 concentration was assessed using ELISA. Statistical analysis was performed and statistical significance was set at $p < 0.05$.
Results: The salivary volume was significantly lower in the irradiated patients. Salivary concentration of EGF ($p=0.000$) and MMP-9 ($p=0.014$) were lower in patients than in the control group. RANK-L dosage was lower in patients, with a marginal p -value (0.051). RANK, OPG, and VEGF did not differ from patients ($n=29$) and controls ($p < 0.05$). When comparing the results of the patients that received only radiotherapy ($n=13$) with controls, the EGF ($p=0.003$) and MMP-9 ($p=0.031$) were significantly lower in patients, and the other biomarkers did not show difference. The comparison between patients treated with radiotherapy and chemotherapy ($n=16$) and controls revealed statistical significant difference only for EGF ($p=0.031$).
Conclusions: Head and neck radiotherapy decreases the salivary levels of EGF and MMP-9, but not of RANK, OPG, and VEGF. RANK-L shows a tendency to decrease with radiotherapy. EGF and MMP-9 deficiency in the saliva of irradiated patients may be related to the late deleterious effects of radiation in the oral cavity.