



WAGNER GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, DA  
EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE METALOPROTEINASES  
DE MATRIZ E DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA EM DENTES  
EXPOSTOS À RADIOTERAPIA NA REGIÃO DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

Piracicaba

2014





Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

WAGNER GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, DA  
EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE METALOPROTEINASES  
DE MATRIZ E DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA EM DENTES  
EXPOSTOS À RADIOTERAPIA NA REGIÃO DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Estomatopatologia, na Área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Fernando de Góes

Co-orientador: Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Wagner Gomes da Silva e orientada pelo Prof. Dr. Mário Fernando de Góes.

---

Assinatura do Orientador

Piracicaba  
2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

Si38a Silva, Wagner Gomes da, 1990-  
Avaliação das alterações morfológicas, da expressão imunoistoquímica de metaloproteinases de matriz e da atividade gelatinolítica em dentes expostos à radioterapia na região de cabeça e do pescoço / Wagner Gomes da Silva. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Mário Fernando de Góes.  
Coorientador: Alan Roger dos Santos Silva.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cárie dentária. 2. Radioterapia. 3. Metaloproteinases de matriz. 4. Gelatinases. 5. Imuno-histoquímica. I. Góes, Mário Fernando de, 1954-. II. Santos-Silva, Alan Roger, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of morphological changes, immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases and gelatinolytic activity in teeth exposed to radiotherapy in the head and neck area

**Palavras-chave em inglês:**

Dental caries

Radiotherapy

Matrix metalloproteinases

Gelatinases

Immunohistochemistry

**Área de concentração:** Patologia

**Titulação:** Mestre em Estomatopatologia

**Banca examinadora:**

Mário Fernando de Góes [Orientador]

Pablo Agustin Vargas

Gilberto de Castro Junior

**Data de defesa:** 30-07-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 30 de Julho de 2014, considerou o candidato WAGNER GOMES DA SILVA aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Alan Roger dos Santos Silva".

Prof. Dr. ALAN ROGER DOS SANTOS SILVA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gilberto de Castro Junior".

Prof. Dr. GILBERTO DE CASTRO JUNIOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Agustin Vargas".

Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS



## RESUMO

A cárie relacionada à radioterapia (CRR), também conhecida como “cárie de radiação”, é uma grave toxicidade bucal que acomete pacientes oncológicos submetidos à radioterapia (RDT) na região de cabeça e pescoço. Apesar de ser atribuída principalmente aos efeitos indiretos da RDT, como a hipossalivação, a CRR também é associada a efeitos diretos da radiação sobre o esmalte, a dentina e a polpa dental. Desta forma, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese nula de que a RDT não é capaz de gerar danos diretos aos componentes micromorfológicos da matriz inorgânica e orgânica dos dentes de pacientes com câncer de cabeça e pescoço (CCP). Um total de 39 dentes, incluindo 22 dentes que receberam RDT *in vivo* e 17 dentes não irradiados provenientes de pacientes com CCP, foram agrupados em dois eixos experimentais que avaliaram cortes histológicos preparados por desgaste (grupo experimental I) e por desmineralização (grupo experimental II). No grupo I, investigou-se a preservação da micromorfologia dos tecidos dentários; bem como a atividade gelatinolítica por meio da zimografia *in situ*. No grupo II, investigou-se a preservação da micromorfologia dos tecidos dentários; bem como a expressão imunoistoquímica de MMP-2, MMP-9 e MMP-20. Foi constatada preservação estrutural de todos os componentes micromorfológicos analisados, alta atividade gelatinolítica em dentina desmineralizada e intensa expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-20 em diferentes áreas de todos os espécimes avaliados. Não foi possível identificar diferenças significativas entre os espécimes irradiados e não irradiados em nenhuma das análises estatísticas. A hipótese nula teste não foi rejeitada e os resultados deste estudo sugerem que a ação direta da radiação não é capaz de gerar destruição radiogênica da matriz inorgânica ou orgânica dos dentes de pacientes com CCP em nível morfológico e que, possivelmente, os efeitos diretos da RDT sobre a estrutura dentária não contribuem para o início ou progressão da CRR.

**Palavras-chaves:** Cárie dentária. Radioterapia. Metaloproteinases de matriz. Gelatinases. Imuno-histoquímica.



## ABSTRACT

Radiation-Related Caries (RRC), also known as "radiation caries" is a serious oral toxicity that affects cancer patients who have undergone radiotherapy (RDT) in the head and neck area. Although mainly attributed to the indirect effects of RDT, such as hyposalivation, RRC is also associated with direct effects of radiation on the enamel, dentin and dental pulp. Therefore, the aim of this study was to test the null hypothesis that RDT is not able to generate direct damage to the micromorphological components of inorganic and organic matrix of teeth from patients with head and neck cancer (HNC). A total of 39 samples, including 22 teeth that received *in vivo* RDT and 17 teeth from non-irradiated patients with HNC were grouped into two experimental groups that evaluated ground sections (experimental group I) and histological sections prepared by demineralization (experimental group II). In group I, the preservation of the micromorphological components of dental tissues as well as the gelatinolytic activity by *in situ* zymography were investigated. In group II, the preservation of micromorphological components of dental tissues and the immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9 and MMP-20 were investigated. Structural preservation of all micromorphological components analyzed, a high gelatinase activity in demineralized dentin and intense expression of MMP-2, MMP-9 and MMP-20 was found in different areas of all specimens evaluated. It was not possible to identify significant differences between irradiated and non-irradiated specimens in any of the statistical analyses. The null hypothesis was not rejected and the results of this study suggest that direct effects of radiation are not able to generate morphological radiogenic destruction of inorganic or organic matrix of teeth from HNC patients, and that, possibly, the direct effects of RDT on the dental tissues may not contribute to the onset and progression of RRC.

**Key words:** Dental caries. Radiotherapy. Matrix metalloproteinases. Gelatinases. Immunohistochemistry.



## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
EPÍGRAFE	xix
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	3
PROPOSIÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXO	99



## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Neiva Rosa Gomes da Silva e Alexandre Ferreira da Silva pelo incondicional carinho, prestimoso afeto e crucial apoio durante toda minha vida. Ao indispensável valor que deram a minha educação e formação profissional, acreditando nas minhas escolhas pessoais, mesmo aquelas que me levaram para mais distante deles. Toda gratidão ao exemplo de integridade e amor que dispensam e à notória trajetória de abnegação e trabalho, a qual permitiu meu crescimento e sucesso.



## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A meus irmãos Vinícius Gomes e Cláudio Rodrigues pela satisfação de poder compartilhar minha infância e juventude.

Aos meus avôs e avós (*in memoriam*), que apesar do pouco tempo de vida compartilhado, sei que não mediram esforços por mim.

A todos familiares cujo apoio inenarrável foi imprescindível todos esses anos e mais do que nunca nesta etapa da minha vida.

Aos meus queridos sobrinhos pelo amor compartilhado e pela chance de vê-los crescer, mesmo que ultimamente à distância.

Aos amigos da família UERJ cuja participação tornou-se vital nos últimos 6 anos da minha vida e que, certamente, se desdobrarão em muitos anos futuros de cumplicidade, alegria e respeito.

Aos queridos amigos que fiz em Piracicaba, minha segunda casa, e que ficarão guardados para sempre. Em especial aos companheiros de toda hora Marcondes, Wilfredo, Ana Carolina, Ana Camila, Carolina, Débora, Elizabete, Renata, José Filho e Vinícius.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do Magnífico Reitor, Professor Doutor José Tadeu Jorge.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu Diretor, Professor Doutor Jacks Jorge Júnior e Diretor Associado, Professor Doutor Alexandre Augusto Zaia.

Ao Professor Doutor Alan Roger dos Santos Silva, cuja orientação extrapolou os limites acadêmicos, gerando minha maior admiração pelo exemplo de competência, profissionalismo e cuidado que ele representa.

Ao Professor Doutor Fábio Ramôa Pires pelo exemplo de integridade, profissionalismo e pelo inestimável incentivo em me proporcionar os primeiros contatos com o fascinante mundo da Patologia Oral e da Estomatologia.

A todos os incentivadores e atores diretos desta pesquisa que contribuíram inestimavelmente em todas as etapas.

Em especial ao Doutor Marcelo da Rocha Marques pela incrível habilidade científica, competência profissional, simplicidade e disponibilidade ao trabalho. Sem sua irrefutável contribuição esta Dissertação não seria possível.

Aos técnicos: Adriano, Aparecida (Cidinha), Eliene (Eli), Fabiana (Fabi) e Geovania (Geo) das áreas de histologia e patologia oral, cuja disponibilidade foi crucial, e os quais o compartilhamento de dúvidas e pedidos de socorro foram extremamente valiosos.

À área de Materiais Dentários na pessoa do Professor Doutor Mário Fernando de Góes pela disponibilidade do uso das dependências laboratoriais e pelo compartilhamento da experiência com os estudos envolvendo dentes irradiados.

Aos Professores Doutores das Áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Alan Roger dos Santos Silva, Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Agustín Vargas e Ricardo Della Coletta, pelo essencial envolvimento que tem na minha formação e no meu treinamento em Patologia oral e Estomatologia.

À Professora Doutora Tuula Salo e Professor Doutor Leo Tjäderhane pela partilha de conhecimentos inestimáveis sobre o mundo das MMPs e por disponibilizar o anticorpo anti-MMP-20 utilizado nesta dissertação.

Aos Professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), que me proporcionaram não somente uma excepcional formação como também a paixão pelo magistério, o prazer pela investigação científica e a curiosidade pelo conhecimento.

Em especial aos tutores do Programa de Educação Tutorial (PET) da Faculdade de Odontologia da UERJ, César dos Reis Perez, Kátia Regina Hostílio Cervantes e Tereza Cristina Avila Berlinck pelo inestimável exemplo, além dos amigos petianos com os quais convivi e pude compartilhar a disposição ao trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo imprescindível auxílio concedido na forma de bolsa de mestrado.

À Doutora Thaís Bianca Brandão, chefe do serviço de Odontologia Oncológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) por ter cedido o material biológico que viabilizou a execução desta Dissertação, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto de pesquisa e por confiar em meu trabalho permitindo que me juntasse à sua equipe.

Aos cirurgiões dentistas, auxiliares e técnicas em saúde bucal do ICESP pelo apoio em coletar os espécimes utilizados na Dissertação e pelo compartilhamento de momentos muito agradáveis no hospital.

Aos profissionais do OROCENTRO, Rogério Elias, Aparecida (dona Cida), Daniele (Dani) e Doutora Elizabete. Além dos colegas com os quais partilhei experiências e conhecimento, Camilla, Felipe, Lara, Karina, Vinícius e Renato.

E a todos os demais profissionais e pessoas que, de diversas maneiras contribuíram para a realização deste estudo e que torcem pelo meu sucesso.



“A verdadeira viagem do descobrimento  
não consiste em procurar novas paisagens,  
mas em ter novos olhos”

**Marcel Proust**



## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é, normalmente, tratado por meio de protocolos que incluem a radioterapia (RDT). Contudo, a alta eficiência da RDT no controle do CCP é obtida às custas de uma série de toxicidades agudas e crônicas aos tecidos normais adjacentes ao tumor, sendo que os dentes geralmente estão incluídos dentro campo de radiação e, por isso, acabam por receber altas doses (Vissink et al., 2013).

O aprimoramento e os avanços técnicos no tratamento do CCP permitiram maiores taxas de sobrevida, fato que tornou mais evidente as toxicidades bucais crônicas do tratamento oncológico, tendo em vista seu potencial negativo sobre a qualidade de vida dos pacientes. Este cenário aumentou o interesse científico na compreensão do início e da progressão da cárie relacionada à RDT (CRR), cujo risco de desenvolvimento acompanhará permanentemente os pacientes submetidos à RDT na região da cabeça e pescoço (Kielbassa et al., 2006; Silva et al., 2009; Silva et al., 2010).

A literatura é controversa no que diz respeito a revelar a capacidade da RDT em gerar efeitos diretos na estrutura dentária, contribuindo para a origem da CRR. Neste mesmo contexto, a RDT foi recentemente associada à ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) nos pulmões e cérebro (Araya et al., 2001; Zhai et al., 2006; Gogineni et al., 2009; Lee et al., 2012), e essas enzimas, por sua vez, são apontadas como importantes fatores na degradação da matriz orgânica dentária durante o processo de desmineralização envolvendo as cáries. Desta forma, tornou-se de grande interesse investigar se os dentes incluídos no campo de radiação sofreriam alterações micromorfológicas radiogênicas em sua matriz orgânica e inorgânica e se a RDT seria capaz de aumentar a expressão ou ativar MMPs presentes na dentina, o que poderia ocasionar degradação da matriz dentinária e contribuir para o desenvolvimento da CRR.

Assim, esta dissertação testou a hipótese nula de que a RDT não é capaz de causar prejuízo direto aos componentes micromorfológicos dos tecidos dentários e de aumentar a expressão ou ativar MMPs dentinárias.



## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Considerações gerais**

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma maior dimensão, convertendo-se em um evidente problema de saúde mundial. A Organização Mundial da Saúde estima que, no ano 2030, podem ser esperados 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com neoplasias malignas. O maior efeito desse aumento irá afetar principalmente países em desenvolvimento (INCA, 2014).

Devido à maneira com a qual os dados estatísticos epidemiológicos do CCP são obtidos, os números referentes à exata incidência de neoplasias malignas da região da cabeça e do pescoço são, como um todo, difíceis de serem precisados. No entanto, tem sido relatados cerca de 670.000 novos casos em todo o mundo anualmente, totalizando aproximadamente 6% de todas as neoplasias malignas, e 350.000 mortes todo ano (Parkin et al., 2005; Argiris et al., 2008; Matzinger et al., 2009).

O CCP é a sexta neoplasia maligna mais comum na população mundial e refere-se a uma ampla variedade de tumores que acometem a parte superior do trato aero digestivo (Huber e Terezhalmly, 2003; Duvvuri e Myers, 2009). Cerca de 90% destes casos, são classificados como carcinomas espinocelulares (CECs) (Duvvuri e Myers, 2009). Esses tumores podem ser didaticamente agrupados levando-se em consideração as regiões anatômicas acometidas: cavidade bucal (lábios, mucosas jugais, língua, assoalho bucal, palato duro, gengivas e trígono retromolares); faringe (orofaringe, nasofaringe e hipofaringe); laringe (laringe supraglótica, cordas vocais e laringe subglótica); cavidade nasal e seios paranasais (seios maxilares, seio etmoidal, seio esfenoidal e seios frontais); e glândulas salivares maiores (submentonianas, submandibulares e parótidas), entre outros (Matzinger et al., 2009). Porém, casos de tumores extensos e avançados tornam-se complexos de serem classificados devido ao acometimento simultâneo de diferentes regiões anatômicas.

Em se tratando somente de câncer bucal, são estimados 11.280 casos novos afetando homens e 4.010 afetando mulheres em 2014 no Brasil (INCA, 2014). Na cavidade bucal o CEC é a variante histológica mais comum e também representa 90% de todos os casos (Wingo et al., 1995; Scully e Felix, 2006).

Os fatores de risco mais importantes para os CECs de boca são o consumo de tabaco e álcool. A associação entre esses dois fatores apresenta um importante efeito carcinogênico sinérgico (Pelucchi et al., 2008). Outros fatores de risco como infecção pelo papiloma vírus humano (HPV - *Human Papiloma Virus*), principalmente para os tumores de orofaringe (D'Souza et al., 2007; Sturgis et al., 2007), exposição ocupacional a carcinógenos ou radiação solar (para tumores de lábio inferior), radiação de outras naturezas, dieta e susceptibilidade genética também estão relacionados com a patogênese do CEC de boca (Pelucchi et al., 2008; Tarvainen et al., 2008; Hashibe et al., 2009).

Três modalidades principais são usadas comumente no tratamento das neoplasias malignas da cabeça e do pescoço, e englobam a ressecção cirúrgica, a RDT e quimioterapia (QT). O tratamento das neoplasias malignas de cabeça e pescoço depende de um modo geral, do estadiamento clínico do tumor no momento do diagnóstico, da localização do tumor, das condições físicas do paciente, dos recursos financeiros disponíveis e da experiência da equipe médica. Dependendo desses fatores, o paciente será tratado por uma, duas, ou pelas três modalidades, seja concomitantemente ou em sequência (Kowalski et al., 2005; Sciubba e Goldenberg, 2006).

O estadiamento clínico dos CECs considera o tamanho do tumor primário, além do tamanho, quantidade e localização dos linfonodos cervicais envolvidos e a presença de metástase à distância como os principais fatores clínicos prognósticos, características que influenciam diretamente na escolha do tipo de abordagem terapêutica (Wittekind et al., 2001). Diversos estudos têm mostrado que a maior parte dos CECs de cabeça e pescoço é diagnosticada tardiamente, ou seja, no momento do diagnóstico o paciente apresenta estadiamento clínico avançado, o que costuma ocasionar um prognóstico ruim

e a necessidade de tratamentos mais agressivos (Scully e Felix, 2006; Warnakulasuriya et al., 2007). Metástases à distância são incomuns nos estágios iniciais da doença, resultando em apenas 10% dos casos em estágio avançado (Cooper et al., 2009).

A cirurgia ainda é considerada o tratamento primário para grande parte dos casos de CECs de cabeça e pescoço. Contudo, esta técnica muitas vezes é limitada nos casos de tumores avançados loco-regionalmente, onde o envolvimento de estruturas anatômicas importantes (como nervos, vasos e artérias de calibres expressivos) pode contraindicar sua utilização (Brenner et al., 2007). Nestas situações, a RDT é etapa fundamental do tratamento e pode ser utilizada com finalidade curativa ou paliativa e de modo neoadjuvante ou adjuvante (Lefebvre, 2006). Um evidente aprimoramento nas taxas de sucesso terapêutico de casos avançados de CEC bucal foi obtido com a introdução da quimiorradioterapia, modalidade em que a QT pode ser aplicada antes da RDT (QT de indução), concomitante à RDT ou após o tratamento radioterápico (QT adjuvante) (Kowalski et al., 2005; Sciubba e Goldenberg, 2006; Bucheler et al., 2012).

O tratamento radioterápico está associado ao controle de tumores malignos da cabeça e do pescoço e a altas taxas de cura para tumores em estágio inicial de desenvolvimento (Denham et al., 2003). O objetivo desta modalidade é reduzir o tamanho do tumor, reduzir o risco de metástases e potencializar a atividade citotóxica antitumoral, entretanto, esta associação é notoriamente associada a uma maior prevalência e intensidade de toxicidades agudas e crônicas, e o tratamento oncológico em geral resulta em considerável morbidade física e psicológica, afetando negativamente a qualidade de vida desses pacientes (Sheets et al., 2013).

## **2.2 Radioterapia**

Décadas após a descoberta dos raios-X por Wilhem Roentgen em 1896, foi relatado o uso terapêutico da radiação ionizante como modelo de tratamento de tumores malignos, embora não se saiba o exato momento em que este método tenha sido iniciado. Neste contexto, o objetivo da RDT tornou-

se proporcionar uma dose precisa de radiação a um volume tumoral definido, de forma a minimizar os danos aos tecidos adjacentes, erradicar o tumor, assim como permitir melhor qualidade de vida e prolongamento da sobrevivência dos pacientes (Huber e Terezhalmay, 2003).

Em 1951, foi desenvolvida a primeira bomba de cobalto, ou telecobalto, aparelho emissor de raios gama cobalto 60 ( $^{60}\text{Co}$ ) como unidade de tratamento de RDT externa de alta energia. Em grande parte, esses equipamentos vêm sendo substituídos por outros aparelhos de teleterapia, os aceleradores lineares que permitem níveis de energia próximos de 20 MeV e conseqüentemente apresentam maior alcance de profundidade nos tumores e efetividade de tratamento. Nos anos 70 foi introduzida a RDT conformacional tridimensional (3D) e mais atualmente a RDT com modulação da intensidade do feixe (IMRT – *Intensity Modulated Radiation Therapy*), as quais permitem o planejamento tridimensional do campo de radiação e controle da quantidade de radiação em cada região respectivamente (Lee e Terezakis, 2008).

O benefício terapêutico da radiação está relacionado ao seu efeito no DNA das células tumorais. A radiação pode interagir com o DNA da célula diretamente, causando sua fragmentação, principalmente durante a duplicação do seu conteúdo genético no ciclo celular. Ou indiretamente, interagindo com moléculas de água ou oxigênio, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio. Essas moléculas reagem, aleatoriamente, com DNA, RNA e enzimas de forma a romper ou desorganizar seus nucleotídeos ou sequências aminoácidas. De uma forma ou de outra, isto significa que o DNA danificado não consegue ser reparado pelas células malignas, que apresentam defeitos nos mecanismos de controle do ciclo celular, gerando morte celular e diminuição da atividade proliferativa do tumor (Huber e Terezhalmay, 2003).

Considerando as principais complicações da RDT em cabeça e pescoço, o protocolo de tratamento radioterápico costuma ser fracionado em 5 a 7 semanas com doses diárias médias de 2 Gy de radiação, totalizando em torno de 30 a 35 sessões. As doses são administradas 5 vezes por semana e intercaladas por 2 dias sem radiação (correspondentes aos finais de semana) a

fim de que os tecidos saudáveis adjacentes ao tumor possam se recuperar (Huber, Terezhalmay, 2003; Vissink et al., 2003; Kielbassa et al., 2006).

### **2.3 Perfil odontológico dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço**

Os pacientes com CCP apresentam, geralmente, má higiene bucal já no momento do diagnóstico oncológico e possuem muito frequentemente hábitos como tabagismo e etilismo que agravam suas condições bucais e geram, adicionalmente, risco maior de desenvolvimento de segundos primários, doença periodontal e perdas dentárias múltiplas. A título de exemplo, um estudo brasileiro com 207 pacientes pré-RDT, verificou que 12% possuíam cárie, 41% doença periodontal e 21% tinham uma ou mais raízes residuais (Jham et al., 2008). Katsura et al. (2008), encontraram uma média de profundidade de sondagem periodontal de 4,82 mm em um grupo de 242 pacientes no período antecedente à RDT. Lockhart e Clark (1994), por sua vez, encontraram uma alta incidência de perda de inserção óssea alveolar (66%), cáries (71%) e falhas de restaurações dentárias (91%) em 131 pacientes pré-RDT.

Atualmente, entende-se que os pacientes com CCP que serão irradiados na região de cabeça e pescoço, na verdade, tendem a apresentar um aglomerado de sintomas bucais prévios ao início do tratamento, o que favorecerá o aparecimento e a progressão das toxicidades orais secundárias à RDT e deterioração das condições dos pacientes que são, muitas vezes, equivocadamente atribuídas aos efeitos diretos da radiação sobre os dentes (Ribeiro et al., 2013).

### **2.4 Adequação odontológica do paciente com câncer de cabeça e pescoço**

Uma etapa crucial na prevenção e no tratamento das complicações bucais relacionadas à RDT baseia-se na adequação odontológica prévia ao início do tratamento. Este procedimento tem como objetivo precípua a eliminação de focos infecciosos agudos ou crônicos, mediante o controle da doença cárie, de doença periodontal, lesões endodônticas ou lesões de tecido

mole com potencial de gerar complicações sistêmicas durante o tratamento oncológico. Nesta etapa, pontos importantes devem ser considerados para a tomada de decisão, como o prognóstico oncológico do paciente, suas condições médicas e de higiene bucal, o estado geral dos dentes, a presença ou não dos dentes e glândulas salivares maiores no campo de radiação e a expectativa de cada paciente (Hong et al., 2010).

Apesar das manipulações cirúrgicas de tecidos moles e duros, incluindo exodontias, aumentarem a chance de osteorradionecrose nos pacientes expostos a um volume total de radiação acima dos 50 Gy, a remoção de dentes em pacientes que já concluíram a RDT em cabeça e pescoço pode ser indicada, particularmente, quando houver evidência de lesão cariada avançada com viabilidade pulpar questionável, envolvimento pulpar ou invasão de espaço biológico pela cárie, doença periodontal avançada ou sintomática (especialmente com perda óssea severa), mobilidade dentária com envolvimento de furca e raízes residuais não totalmente cobertas por osso alveolar ou mostrando radiolucidez periapical. Acredita-se que estas situações clínicas representem, por si só, um risco aumentado para o desenvolvimento de osteorradionecrose (Lopes et al., 1998; Sulaiman et al., 2003; Koga et al., 2008).

Pelo fato da cárie não tratada representar um fator de risco para a osteorradionecrose, o tratamento odontológico incluindo extração dos dentes não restauráveis deve ser realizado em um período médio de duas semanas antes do início da RDT. Em certas ocasiões, quando os dentes não foram extraídos antes da RDT e existe indicação para extração depois dela, estas devem ser realizadas evitando-se ao máximo procedimentos traumáticos e zelando-se pela manutenção do contorno do osso alveolar, mesmo sabendo que o risco do desenvolvimento de osteorradionecrose induzida por exodontia é semelhante quando os dentes com indicação são extraídos antes ou depois da RDT (Wahl, 2006).

Apesar da dificuldade de manejo das complicações bucais da RDT, sobretudo no caso das CRRs, procedimentos mutiladores como indicação de exodontias de todos os dentes devem ser evitados devido ao impacto negativo

que esses procedimentos geram nos pacientes com CCP. Especialmente, por que as maiores taxas de sobrevida recentemente conseguidas para população exigem a busca da melhor qualidade de vida pós-tratamento.

Como colocado em questão anteriormente, as bases de conhecimentos atuais permitem estabelecer parâmetros importantes na decisão clínica da manutenção ou indicação de extração dos dentes desses pacientes. Finalmente, é importante ressaltar que o prognóstico dos pacientes e a capacidade de acompanhamento dos serviços de odontologia oncológica devem ser considerados durante o planejamento do tratamento odontológico de pacientes que receberão RDT na região de cabeça e pescoço.

## **2.5 Toxicidades bucais da radioterapia**

A RDT isolada, ou associada à QT e à cirurgia, aumentou significativamente a sobrevida dos pacientes portadores de malignidades na região de cabeça e pescoço. Apesar disso, as altas doses de radiação nos campos irradiados contendo pele, mucosa oral, maxila, mandíbula, glândulas salivares, dentes, entre outras estruturas anatômicas, geram toxicidades que se manifestam durante ou após a conclusão da RDT (Vissink et al., 2003).

Os efeitos colaterais provocados pela radiação são tradicionalmente classificados em: agudos e crônicos. Os efeitos agudos são considerados aqueles cujo desenvolvimento se estabelece junto ou imediatamente após o início do tratamento. Os efeitos crônicos são aqueles que podem se desenvolver meses ou anos após a exposição à RDT (Vissink et al., 2003; Kielbassa et al., 2006).

Mucosite, disgeusia, hipossalivação, infecções oportunistas, trismo, osteorradionecrose e CRR, também conhecida como “cárie de radiação”, são os efeitos mais relevantes da RDT na região de cabeça e pescoço que afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes com CCP (Vissink et al., 2003).

A mucosite oral é a toxicidade aguda mais relevante da RDT, em termos de morbidade, e se caracteriza por ulceração da mucosa bucal associada a intensa inflamação e dor. Ela está fortemente relacionada aos

efeitos físicos da radiação sobre os tecidos moles bucais e, portanto, está atrelada ao campo de radiação, à quantidade da dose de radiação e ao esquema de fracionamento da RDT (Denham et al., 1999; Kielbassa et al., 2006). O dano à mucosa ocorre devido à diminuição da renovação das células do epitélio, que leva a atrofia da mucosa e ulceração (Dörr et al, 2002). Na maioria dos casos, pacientes com CCP tratados por meio de RDT experimentam um quadro de mucosite a partir da terceira semana de tratamento radioterápico, quando são atingidos 30 Gy (Hancock et al., 2003).

A mucosite é a toxicidade secundária aguda mais comum em resposta à RDT na região de cabeça e pescoço (Otmani, 2007; Tolentino et al., 2009). Cerca de 80% desses pacientes irradiados desenvolverão mucosite com uma consequente dificuldade de ingerir líquidos, de se alimentar, deglutir e falar. Como consequência desses fatos, observam-se problemas de ordem nutricional, perda de peso e necessidade de dieta à base de alimentos pastosos e alto teor de carboidratos. Nos casos em que a perda ponderal de peso põe em risco a vida dos pacientes, pode-se optar pela implementação de alimentação nasogástrica ou até mesmo pela interrupção da RDT (Kielbassa et al., 2006).

A maioria dos pacientes apresentará algum grau de alteração do paladar (disgeusia) durante a RDT em cabeça e pescoço. Embora a perda completa da percepção gustativa raramente ocorra, a alteração no paladar é uma resposta precoce à radiação (início após 10 Gy) e muitas vezes precede a mucosite. O paladar diminui exponencialmente com um acúmulo da dose de cerca de 30 Gy (Beumer et al, 1979; Kielbassa et al., 2006) e resolve espontaneamente algumas semanas após o final da RDT. A disgeusia afeta a susceptibilidade dos indivíduos à cárie devido ao aumento no consumo de carboidratos motivados pela satisfação provocada pelo reconhecimento facilitado do sabor de açúcares da dieta (Kielbassa et al., 1997).

Limitação da abertura de boca (trismo) pode ser observada em pacientes submetidos à RDT na região de cabeça e pescoço e torna-se um problema importante à medida que dificulta a alimentação e a implementação de medidas de higiene bucal pelos pacientes apresentando esse quadro clínico

(Kielbassa et al., 1997). Os mecanismos pelos quais a hipomobilidade da musculatura da mastigação relacionada à RDT se desenvolve, e os fatores que determinam sua velocidade de progressão, gravidade e extensão, são pouco compreendidos. O desenvolvimento do trismo se dá em três fases: uma fase inicial inflamatória não específica, uma fase celular fibrótica, e uma fase de remodelamento e aumento da densidade da matriz extracelular. A perda de flexibilidade e extensão é vista como sendo decorrente da fibrose desencadeada pela RDT (Delanian et al., 2004). O trismo é considerado um efeito tardio relacionado a altas doses de radiação, e pode ser caracterizado a partir de uma limitação de abertura bucal menor do que 35 mm (Bensadoun et al., 2010).

A RDT altera o parênquima das glândulas salivares inseridas no campo de radiação, gerando uma diminuição no fluxo salivar e modificação de sua composição normal (Dugal, 2003). Deste modo, graus variados de hipossalivação podem ser observados durante o tratamento desses pacientes. A duração da hipofunção salivar varia de acordo com cada paciente, e a recuperação parcial das glândulas salivares, apesar de raramente acontecer, pode durar vários meses. Geralmente, o dano é irreversível, com a perda permanente da habilidade secretória e consequente hipossalivação persistente (Möller et al., 2004; Konings et al., 2005).

A diminuição na quantidade de saliva pode ser observada logo nos primeiros dias da RDT em cabeça e pescoço e progressivamente o fluxo diminui até atingir menos de 10% do valor inicial. O impacto da RDT sobre as glândulas salivares também depende do campo de radiação abrangendo as glândulas salivares maiores e da dose de radiação. Com baixas doses de radiação o dano pode ser reversível às glândulas salivares. A título de exemplo, a dose de tolerância para a glândula parótida, acima da qual a função salivar da glândula torna-se irreversivelmente reduzida, é de 25 a 40 Gy (Eisbruch et al., 1999; Roesink et al., 2001; Kielbassa et al., 2006). Com doses superiores a 60 Gy, acontece uma extensa degeneração irreversível dos ácinos e consequente hipossalivação intensa e permanente (Dreyer et al., 1989; Kielbassa et al., 2006; Jensen et al., 2010).

O dano às glândulas salivares resulta em disfagia e disфонia, sensação de queimação, fissuras labiais e aumento na susceptibilidade a infecções orais oportunistas como a candidose pseudomembranosa (Hancock et al., 2003; Vissink et al., 2003).

A RDT também altera a composição da saliva, com aumento da viscosidade, redução da capacidade tampão, alteração das concentrações dos eletrólitos, e mudança nos sistemas de defesa imune e não imune. Há uma diminuição drástica no pH salivar de 7,0 para 5,0, tornando-a ácida suficiente para prover desmineralização da matriz inorgânica dentária com a dissolução dos minerais do esmalte e da dentina (Kielbassa et al., 1997).

Acredita-se, finalmente, que o incremento de uma dieta rica em carboidratos – naturalmente mais cariogênica – decorrente da dor associada à mucosite e à perda do paladar atuará em sinergia com a desmotivação do paciente para a higienização bucal proporciona pela dor decorrente da mucosite, à limitação de abertura de boca associada ao trismo e às alterações quantitativas e qualitativas da saliva, criando um agregado de sintomas bucais que tornam a boca de pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço um ambiente extremamente cariogênico e aumentam o risco de desenvolvimento da CRR, cujas características clínicas serão discutidas com mais propriedade a seguir (Silva, 2008).

## **2.6 Efeitos da radiação na estrutura dentária**

Embora ainda persista uma grande controvérsia, estudos recentes apontam que efeitos radiogênicos diretos sobre a estrutura dentária atuam coletivamente com os efeitos do agregado de sintomas bucais dos pacientes com CCP e à ação indireta da RDT sobre os dentes (por meio de alterações na quantidade e na composição da saliva), predispondo ao risco aumentado para o desenvolvimento de CRR (Al-Nawas et al., 2000; Açil et al., 2005; Springer et al., 2005; McGuire et al., 2014).

É notório que a CRR pode se tornar evidente poucos meses após a conclusão da RDT e é considerada um dos maiores desafios, do ponto de vista odontológico, no tratamento de pacientes irradiados na região de cabeça e

pescoço (Kielbassa, 2004). A rápida progressão das CRRs pode levar à amputação das coroas dentárias e perda completa da dentição em um curto espaço de tempo. De modo intrigante, este quadro de cárie rampante não é acompanhado por dor intensa e pode inclusive estar associado a resposta negativa aos testes térmicos de sensibilidade pulpar (Kataoka et al., 2012).

Clinicamente, as CRR iniciam-se nas áreas cervicais dos dentes anteriores e nas superfícies incisais e oclusais, afetando inclusive dentes como os incisivos inferiores que são raramente afetados por cárie em pacientes não irradiados (Frank et al., 1965; Silva, 2008). As lesões cariosas progridem de forma a circundar a região cervical dos dentes, o que leva a pensar que essa região é mais susceptível à CRR (Kielbassa, 2004; Silva, 2008). Alterações no padrão de translucidez e coloração podem ser observadas na forma de pigmentação marrom ou castanha sobre as superfícies lisas de esmalte e dentina cervical, principalmente nas porções cervicais; e um aumento da friabilidade com conseqüente perda de estrutura dentária pode ser notado. Posteriormente, a progressão das lesões cervicais e incisais costuma gerar grande prejuízo mecânico ao esmalte e dentina, ocasionando amputação completa da coroa do dente (Kielbassa, 2004).

Em uma revisão sistemática recente, Hong et al. (2010) revelaram que a prevalência de cáries em pacientes pós-RDT, e pós-QT e RDT associadas é de 24% e 21,4%, respectivamente. E que o índice CPOD (Dentes Cariados Perdidos e Obturados) nos pacientes tratados com RDT na região de cabeça e pescoço é de 17,01 (SD 9,1, n=157).

Microscopicamente, não se observaram diferenças entre lesões iniciais de CRR em relação a lesões incipientes de cárie em pacientes não irradiados (Silva et al., 2009). Essas similaridades são verdadeiras tanto para características histológicas do esmalte e da dentina (Jansma et al., 1993; Jongebloed et al., 1988; Kielbassa et al., 1998; Silva et al., 2009) quanto para reações iniciais em relação a aspectos clínicos da desmineralização (Kielbassa et al., 2000; Silva et al., 2009) e remineralização (Kielbassa et al., 2006).

Alguns autores mostraram que o esmalte irradiado sofre destruição da sua estrutura prismática e que o seu padrão de desmineralização é alterado

quando irradiado (Jansma et al., 1993; Grotz et al., 1998). Adicionalmente, foram descritas diferenças micromorfológicas significativas no padrão de desmineralização do esmalte irradiado, indicado como mais vulnerável à dissolução ácida (Grotz et al., 1997; Kielbassa et al., 1997, Kielbassa et al., 2002) e com evidente prejuízo das propriedades biomecânicas (Al-Nawas et al., 2000; Fränzel et al., 2006; Fränzel e Gerlach, 2006).

Perpetuando as dúvidas e controvérsias acerca do potencial da RDT em causar dano direto aos componentes inorgânicos dos dentes, estudos *in vivo* e *in situ* baseados em dentes humanos e bovinos revelaram que o esmalte irradiado não é mais susceptível à desmineralização (Joyston-Bechal, 1985; Kielbassa et al., 2006).

A JAD de dentes irradiados foi considerada difusa, danificada (Grotz et al., 1997) e instável (Pioch et al., 2004, El-Faramawy et al., 2013). Adicionalmente, estudos *in vitro* mostraram que há uma redução da microdureza da dentina afetada pela radiação, que poderia inclusive ser clinicamente observável (Kielbassa et al., 1997; Kielbassa et al., 1998). Estes fatos, de acordo com os autores mencionados, explicariam o início das lesões nas regiões cervicais, oclusais e incisais, já que a destruição da JAD seria capaz de promover microfraturas suficientes para permitir a colonização microbiana da dentina subjacente e rapidamente amplificar a progressão da CRR (Pioch et al., 2004).

Ainda no contexto dos efeitos diretos da RDT sobre os dentes, alguns estudos descreveram alterações degenerativas do tecido pulpar de dentes irradiados, o que comprometeria a vitalidade do complexo dentino-pulpar e geraria diminuição da resistência e microdureza da dentina nesses dentes e contribuiria para o início da CRR. Parte destes estudos mostrou dano direto ao colágeno da polpa, da matriz do esmalte e da dentina, que ao serem degradados aumentariam o risco de desenvolvimento da CRR (Al-Nawas et al., 2000; Açil et al., 2005; Springer et al., 2005). Apesar das evidências supramencionadas, estudos recentes de nossa equipe, baseados em um modelo experimental *ex vivo* de dentes irradiados proveniente de pacientes submetidos à RDT na região de cabeça e pescoço não identificaram alterações

na morfologia da polpa dental, sugerindo que os efeitos diretos da RDT na região de cabeça não são capazes de gerar alterações morfológicamente detectáveis na microvasculatura, na inervação e na matriz extracelular da polpa desses pacientes (Farias 2013; Farias et al., 2014).

É oportuno mencionar que a maioria dos trabalhos dedicados a investigar o impacto da RDT sobre a estrutura dental é baseada em modelos experimentais de RDT *in vitro*, muitas vezes lançando mão de doses e protocolos de fracionamento que não reproduzem adequadamente a RDT em pacientes com CCP. Possivelmente, esta dificuldade de reprodução de todas as variáveis envolvidas no processo de início e progressão da cárie em pacientes oncológicos pós-RDT seja a base para explicar os resultados contraditórios descritos acima e vigentes na literatura científica pertinente a este assunto. Neste sentido, é imperioso estimular o desenvolvimento de novos modelos experimentais mais fidedignos ao complexo ambiente bucal de pacientes com CCP e aos protocolos de RDT direcionados aos pacientes em questão, permitindo uma melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos na etiologia da CRR.

## **2.7 Tratamento odontológico restaurador em pacientes submetidos à RDT na região da cabeça e pescoço**

A prevalência da cárie dentária em pacientes que se submeteram à RDT na região de cabeça e pescoço pode ser tão elevada quanto 25%. Mesmo após o término da RDT, tais pacientes estão expostos a um risco constante e permanente de desenvolvimento de CRR. Em adição a este já desafiador contexto, sabe-se que o tratamento da CRR está associado a altas taxas de recidiva e que os materiais dentários restauradores disponíveis no mercado atualmente apresentam uma longevidade reduzida quando utilizados em pacientes oncológicos que concluíram RDT na região de cabeça e pescoço (Hu et al., 2005). Quando tomados em conjunto, estas circunstâncias tem um grande impacto negativo sobre a qualidade de vida dos pacientes com CCP.

Muito se especula a respeito do potencial dos efeitos diretos da RDT em cabeça e pescoço em causar instabilidade da interface dente-restauração e

explicar esta sobrevida reduzida das restaurações odontológicas pós-RDT. Entretanto, um estudo prévio de nossa equipe observou que as falhas precoces na longevidade de restaurações adesivas de dentes acometidos por CRR compartilham os mesmos fatores etiológicos e padrões de desmineralização de falhas de dentes restaurados não expostos à radiação e com cárie convencional (Silva et al., 2010). Aparentemente, esta alta incidência de falha precoce das restaurações dentárias é decorrente de sobrecontornos exagerados, cárie residual não removida durante o preparo cavitário e cárie secundária nas margens das restaurações. Sendo assim, protocolos restauradores para CRR e a escolha dos materiais restauradores para este fim, atualmente, são baseados na experiência clínica pessoal e no empirismo, em detrimento de evidências científicas.

É oportuno esclarecer que, o tratamento desta toxicidade crônica da RDT é desafiador, tendo em vista a inexistência de protocolos validados cientificamente que indiquem qual a técnica e o material restaurador mais adequado a ser aplicado em pacientes pré ou pós-RDT (Jansma, 1993). Poucos estudos clínicos se concentraram nesta problemática e parte deles indica a aplicação de ionômero de vidro como material restaurador de escolha, enquanto Hu et al. (2005), após acompanharem durante 2 anos o desempenho clínico de restaurações de ionômeros de vidro em dentes pós-RDT mostrou que este tipo de material apresentou 82% de falhas em função do deslocamento do material da cavidade, sugerindo sua contra-indicação para pacientes irradiados.

De modo semelhante às controvérsias relacionadas à origem da CRR, a escolha dos tipos de material odontológico restaurador também é discutível – do ponto de vista de literatura científica – sendo que estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que compósitos resinosos apresentam resultados superiores de resistência de união a sistemas adesivos em dentina irradiada (Genhardt et al., 2001). Entretanto, já foi sugerido que a RDT pode danificar o colágeno da matriz orgânica dentinária e prejudicar a formação da camada híbrida, comprometendo a capacidade de adesão entre a dentina e resinas

compostas e diminuindo a longevidade de restaurações odontológicas adesivas pós-RDT (Hu et al., 2002).

Um estudo recente desenvolvido por nossa equipe revelou que a RDT *in vivo* durante o tratamento do CCP não parece afetar a força de união da dentina para materiais adesivos. Foram testados adesivos convencionais e auto-condicionantes, onde nenhuma diferença significativa entre dentes irradiados e não irradiados foi encontrada, tornando-os materiais confiáveis para utilização em protocolos de restauração de dentes de pacientes submetidos à RDT na região de cabeça e pescoço (Galetti et al., 2013).

## **2.8. Metaloproteinases de matriz**

As MMPs compõem um grupo de endopeptidases cálcio-zinco-dependentes, capazes de degradar componentes da matriz extracelular e membrana basal. Elas foram identificadas inicialmente em vertebrados em 1962 por Jerome Gross e Charles M. Lapiere, durante um estudo sobre a degradação do colágeno tri-helicoidal na metamorfose da cauda do girino (Gross e Lapiere, 1962). Elas são classificadas em collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10, e MMP-11), MMPs tipo membrana (MT-MMPs) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, e MMP-25), MMPs de mínimo domínio (MMP-7 e MMP-26) e outras MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27, e MMP-28), segundo suas especificidades por substratos e estrutura molecular (Palosaari et al., 2003). Contudo, esta classificação tem sido repensada atualmente devido à afinidade por diferentes substratos que algumas MMPs demonstram (Chow et al., 2007).

Coletivamente, estas enzimas são geralmente sintetizadas em formas zimogênicas latentes, e requerem a ligação de um íon zinco no sítio catalítico e a clivagem de um domínio propeptídeo para se tornar cataliticamente competente. Esses íons são essenciais para manter sua estrutura terciária e sua atividade funcional (Visse et al., 2003).

A maioria das MMPs é expressa por indução, enquanto que um número pequeno é expresso constitutivamente. A atividade biológica das

MMPs pode ser regulada pós-transcricionalmente, ou por interação com inibidores teciduais específicos das metaloproteinases (TIMPs) (Sternlicht et al., 2001).

Essas enzimas regulam eventos fisiológicos e patológicos como: organogênese, remodelação tecidual e o reparo de feridas, onde exercem a função de regulação da comunicação celular do processamento de moléculas bioativas, como receptores de superfície celular, citocinas, hormônios, moléculas de adesão e fatores de crescimento (Visse et al., 2003).

Assim como outros tecidos colagenizados, a matriz dentinária também possui MMPs em sua composição. A dentina é composta por aproximadamente 70% de matéria inorgânica (principalmente cristais de hidroxiapatita), 18% de matéria orgânica (principalmente de fibras colágenas) e 12% de água, apesar de haver variações desta composição inclusive em diferentes regiões do dente (Ferraris e Muñoz, 2006). Aproximadamente 30% do volume total de matriz orgânica da dentina consistem em colágeno tipo I (90%), em associação a proteínas não colágenas como glicoproteínas, proteoglicanos e fosfoproteínas.

Por meio de sua ampla atividade em substratos contra praticamente todas as proteínas de matriz extracelular, incluindo o colágeno tipo I e outras proteínas da matriz dentinária, as MMPs possuem um papel fundamental no desenvolvimento e remodelação tecidual do complexo dentino-pulpar (Tjäderhane et al., 2001; Hannas et al., 2007).

MMPs podem estar envolvidas em vários processos fisiológicos do complexo dentino-pulpar, incluindo a organização da matriz antes da mineralização, controle da mineralização, formação da dentina peritubular, e alterações da matriz durante o envelhecimento (Martin-de Las Heras et al., 2000; Tjäderhane et al., 2001; Hannas et al., 2007). MMPs também têm sido identificadas tanto na inflamação pulpar quanto na inflamação periapical (Gusman et al., 2002).

As MMPs encontradas nos tecidos dentários são responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno vital ou desnaturado (Birkedal-Hansen et al., 1993; Visse et al., 2003). Em virtude de

sua observação em lesões de cárie e dentina sadia, essas enzimas tem mostrado importância em seu possível papel no colapso da matriz orgânica envolvendo a progressão de lesões de cárie (Tjaderhane et al., 1998; Chaussain Miller et al., 2006). Em adição a este fato, estudos *in vitro* confirmaram a presença de MMP-2, MMP-8 e MMP-9 em lesões desmineralizadas de dentina (Tjaderhane et al., 1998).

Foi observada a produção de MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-20 por odontoblastos após o fim da odontogênese (Tjaderhane et al., 1998; Palosaari et al., 2003). Tanto a presença de atividade colagenolítica quanto gelatinolítica (Mazzoni et al., 2007) assim como especificamente as MMPs (MMP-2, -8 e -9) (Martin-De Las Heras et al., 2000; Mazzoni et al., 2007), que estão envolvidas na formação da dentina, apresentam-se armazenadas dentro da dentina sadia mineralizada. Mazzoni et al. (2009) revelaram por meio de estudos imunoistoquímicos utilizando anticorpos monoclonais dirigidos contra MMP-2 e MMP-9 e conjugados a nanopartículas de ouro coloidal, que gelatinases são componentes endógenos da matriz orgânica dentinária e encontram-se conjugadas à trama colágena.

Atualmente entende-se que a dissolução dos cristais da parte mineral da dentina permite a exposição da matriz orgânica que é composta principalmente por colágeno I. As MMPs, por sua vez, estão envolvidas no processo de degradação da matriz de colágeno, embora seu papel específico na progressão da cárie ainda não esteja totalmente esclarecido (Chaussain Miller et al., 2006). As MMPs na dentina com ação proteolítica ativa durante o processo da cárie incluem colagenases (MMP-1 e MMP-8), gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e outras matrilisinas (MMP-20 e MMP-3) (Tjäderhane et al., 1998; Van Strijp et al., 2003; Chaussain-Miller et al., 2006; Sulkala et al., 2007; Toledano et al., 2010).

As MMPs foram detectadas nos tecidos moles e duros durante a formação dentária. Após a mineralização da matriz orgânica dentinária todas as proteínas não colágenas ligadas ao colágeno, incluindo as MMPs, são cobertas por nanocristais de hidroxiapatita tornando-se imóveis e não funcionais (Heikinheimo et al., 1995; Tjäderhane et al., 2001). Assim, o ataque ácido

utilizado previamente a restaurações dentárias adesivas, além de promover a desmineralização de aproximadamente 1-8 µm da matriz orgânica mineralizada e a remoção da *smear layer*, permite que as MMPs sejam liberadas e ativadas. As MMPs mostram potencial enzimático mesmo após a formação da camada híbrida entre os monômeros resinosos e as fibrilas colágenas e assim como outras hidrolases adicionam água a ligações peptídicas do colágeno gerando sua fragmentação. Dessa forma, presume-se que MMPs endógenas da camada híbrida sejam responsáveis pela degradação do colágeno e perda da força de adesão, levando a falhas de adesão e insucesso de restaurações adesivas (Pashley et al., 2004; Tay et al., 2006).

Desta forma, a busca por inibidores da ação das MMPs em dentina se tornou alvo de grande interesse e descobriu-se que a clorexidina apresenta um potencial de inibição das MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (Gendron et al., 1999). Mais recentemente, o sucesso na utilização da clorexidina para preservação da camada híbrida foi descrito por Brackett et al. (2009) e Loguercio et al., (2009). Tezvergil-Mutluay et al. (2010) também provou que alguns alcoóis podem inibir tanto MMP-9 recombinantes humanas solúveis e MMPs conjugadas à matriz. Além dessas substâncias um inibidor sintético específico para MMPs, o Galardin, tem se mostrado mais efetivo em baixas concentrações, e apresenta uma potente atividade contra MMP-1, -2, -3, -8 e -9, sendo um possível produto de interesse comercial aplicado ao aprimoramento das restaurações odontológicas adesivas (Hao et al., 1999).

Tendo em vista o exposto e o fato da RDT ter sido diretamente associada à regulação e ativação de MMPs nos pulmões e cérebro (Araya et al., 2001; Zhai et al., 2006; Gogineni et al., 2009; Lee et al., 2010), é possível conjecturar que a RDT poderia ativar MMPs dentro da matriz dentinária causando degradação da trama de fibras colágenas presentes na JAD ou demais componentes orgânicos, o que contribuiria para a fratura do esmalte e colapso estrutural, contribuindo para a rápida progressão da CRR. Seguindo esta linha de raciocínio, Walker et al. (2011) comentaram a possibilidade da ação dessas enzimas no desenvolvimento e progressão das CRRs, fato que poderia explicar – ao menos em parte – as características clínicas singulares

desta cárie rampante em pacientes oncológicos. Somam-se a isto, as evidências de um estudo recente avaliando a expressão de MMP-20 em extratos de dentina irradiados *in vivo* que mostrou níveis elevados dessa enzima, sugerindo sua possível inter-relação com o processo de CRR (McGuire et al., 2014).

## **2.9. Zimografia *in situ***

Três métodos diferentes podem ser utilizados para avaliar a atividade de gelatinases em dentina: a zimografia de substrato, o western blot e a imunoistoquímica (Sulkala et al., 2007; Boushell et al., 2008; Niu et al., 2011). A zimografia de substrato e o western blot requerem pulverização da dentina seguida por extração de proteínas. Estas técnicas permitem a avaliação da presença ou a atividade de algumas MMPs pelo peso molecular e conjugação com anticorpo respectivamente. Entretanto, não é possível saber a exata localização das proteases extraídas da dentina. A imunoistoquímica, por sua vez, apesar de identificar a localização específica de diferentes proteases na dentina não discrimina as formas zimogênicas das enzimas ativas, e dessa forma nenhuma informação sobre a atividade enzimática pode ser inferida. Além disso, os resultados dependem, em grande parte da especificidade do anticorpo, e em se tratando da dentina os componentes orgânicos ou minerais podem potencialmente mascarar os epítomos, com a possibilidade de uma superexpressão ou subexpressão da proteína (Boushell et al., 2011a; Boushell et al., 2011b).

Na zimografia *in situ* (ZIS) um suporte ou cobertura que utiliza base de substrato enzimático para detecção e localização específica da atividade de protease em cortes histológicos é utilizado. Neste tipo de ensaio experimental, um substrato enzimático protease específico é depositado sobre a superfície de uma secção de tecido. Durante o período de incubação, o substrato é clivado em um processo tempo e dose-dependente por enzimas ativas apropriadas em sua localização nativa. Após o período de incubação, a lise do substrato marcado pode ser detectada por microscopia de luz ou fluorescência em função do tipo de substrato, permitindo a localização da atividade de protease

específica nos cortes histológicos (Kupai et al., 2010). A localização de gelatinases ativas pela ZIS foi demonstrada em vários tecidos, incluindo osso e dentina após descalcificação (Porto et al., 2009).

No geral, a importância deste estudo foi avaliar o possível efeito da radiação nos componentes morfológicos dos tecidos dentários e na expressão e atividade de metaloproteinases de matriz, já relacionadas à degradação da matriz orgânica dentinária em cáries convencionais; no sentido de estabelecer um paralelo entre essas potenciais alterações radiogênicas relatadas na literatura e o peculiar padrão de desenvolvimento e progressão das CRRs.

### **3 PROPOSIÇÃO**

As finalidades desta dissertação encontram-se fundamentadas nos seguintes objetivos:

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo precípua foi investigar a presença de efeitos diretos da RDT na arquitetura micromorfológica da matriz inorgânica e da composição química da matriz orgânica dos tecidos dentários irradiados *in vivo*, durante o tratamento do CCP.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- i. Caracterizar o perfil clínico-patológico dos pacientes submetidos à RDT na região de cabeça e pescoço analisados neste estudo;
- ii. Avaliar, por meio de cortes histológicos preparados por desgaste, os padrões morfológicos da microestrutura do esmalte, da dentina, da JAD e do cemento e a atividade gelatinolítica dentinária;
- iii. Avaliar, por meio de cortes histológicos preparados por descalcificação, os padrões morfológicos da dentina, da polpa, do cemento e do ligamento periodontal, bem como os padrões de progressão da CRR; além da expressão imunoistoquímica de MMP-2, MMP-9 e MMP-20 nos tecidos dentários.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos gerais

A seleção dos pacientes e a coleta dos dentes foram realizadas com base nos protocolos descritos por Silva et al., (2009). Para a utilização dos dentes humanos, o projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP, sob o protocolo 272.098 (Anexo 1) e pelo Núcleo de Pesquisa do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP) sob registro NP 499/14.

Os pacientes oncológicos que doaram os dentes para esta pesquisa realizaram extrações dentais com base em indicações clínicas tomadas de modo independente da consecução deste estudo e todos os dentes foram obtidos de pacientes tratados no Serviço de Odontologia Oncológica do ICESP.

Logo após as extrações, os dentes foram identificados e acondicionados em recipientes plásticos, com solução tamponada de formol a 10% e fixados por pelo menos 72 horas a 4°C.

O delineamento experimental desta dissertação se baseou numa análise retrospectiva de 22 dentes que receberam RDT *in vivo* durante o tratamento de CCP e de 17 dentes não irradiados. O conjunto das 39 amostras foi distribuído em dois grupos experimentais, da seguinte maneira: (1). Grupo experimental I (n=23) baseou-se em análises de cortes histológicos preparados por desgaste; (2). Grupo experimental II (n=16) baseou-se em análises de cortes histológicos preparados por desmineralização. No grupo I, investigou-se a preservação da micromorfologia do esmalte, da dentina, da JAD e do cimento; bem como a atividade gelatinolítica da dentina e da JAD por meio da ZIS. No grupo II, investigou-se a preservação da micromorfologia da JAD, da dentina, da polpa, do cimento e do ligamento periodontal; bem como a expressão imunoistoquímica dos anticorpos anti-MMP-2, MMP-9 e MMP-20.

## **4.2 Análise demográfica e dos parâmetros clínicos dos pacientes da amostra**

Para caracterização clínica dos pacientes cujos dentes foram utilizados nesta dissertação, foi consultado o sistema de prontuário eletrônico do ICESP (Tasy). O planejamento da RDT de todos os pacientes foi verificado, por meio do sistema CMS XiO (Elekta CMS Software, St. Louis, Missouri, USA) version 4.60, para estudo do campo de radiação e a dose total direcionada para o tumor primário. Foram utilizados apenas aqueles dentes que estavam dentro do campo de radiação. Foram consultados e coletados os seguintes dados ou informações: idade, gênero, cor da pele, local do tumor primário, etilismo, tabagismo, tipo histológico do tumor, estadiamento clínico (TNM), quantidade total de radiação durante tratamento em Gy, tipo de planejamento radioterápico, protocolos de QT de indução ou QRDT utilizados, dentes extraídos, período de tempo entre o término da RDT e a extração dentária, além do campo de radiação.

## **4.3 Análise macroscópica e radiográfica dos dentes**

Os dentes inicialmente foram catalogados e fotografados em câmera profissional em diferentes ângulos. Os espécimes foram radiografados de maneira padronizada, cada dente sendo posicionado individualmente em uma película radiográfica periapical para adultos, Kodak Ultra-speed (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA), com a coroa voltada para o picote do filme. Foi utilizado um aparelho de raios-X (Toshiba XR 6010, 127V, 60KV, 10mAs, 60Hz), com tempo de exposição de 0,32s, e distância foco-filme de 15 cm, e as tomadas radiográficas reveladas em processador automático (Flat CO. LTD. JAPAN, Level 300).

## **4.4 Análise dos componentes micromorfológicos dos espécimes preparados por desgaste**

Vinte e três dentes (grupo experimental I), sendo 14 irradiados e 9 não irradiados, foram inspecionados e, posteriormente, foram removidos restos de tecido mole e cálculos dentários por meio de raspagem com curetas

periodontais manuais. As amostras foram seccionadas no sentido de seus longos eixos com auxílio de um disco diamantado (Extec, Enfield, CT, USA) em cortadeira de precisão (Isomet 1000- Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, USA), passando-se pelo centro da região mais profunda das lesões de cárie nos dentes ou dividindo-os ao meio no plano vestibulo-lingual nos casos de dentes hígidos. Cada metade obtida nessa primeira etapa posteriormente sofreu novo corte obtendo-se duas fatias semelhantes com espessura de 1,0 mm aproximadamente.

Os cortes foram desgastados até uma espessura aproximada de 200 nm com lixas de carbetto de silício (SiC) com granulação 600, 1200, 2000 e 4000, e verificados com auxílio de paquímetro digital (Standard Gage).

O objetivo desta análise foi avaliar os componentes micromorfológicos do esmalte e dentina conforme sua presença, ausência ou características de preservação em relação aos tecidos dentários normais. Os parâmetros analisados no esmalte dentário foram os tufos, lamelas, fusos, estrias de Retzius, esmalte nodoso, JAD. Na dentina foram investigadas dentina interglobular, linhas incrementais, camada granulosa de Tomes, dentina terciária, cáries na região incisal/oclusal (I/O), cáries na região cervical (C) e junção amelocementária (JAC).

#### **4.5 Análise da atividade gelatinolítica por meio da técnica da zimografia *in situ*.**

Cortes de 1,0 mm obtidos conforme o item 4.4 foram submetidos a polimento das superfícies de interesse com lixas de carbetto de silício (SiC) nas granulações 600, 1.200, 2.000 e 4.000, respectivamente, para planificação durante 5 minutos em cada lixa. Nas trocas entre as lixas, os espécimes foram colocados em cuba ultrassônica para remoção da *smear layer* produzida durante as etapas e, posteriormente, foram armazenados em solução tampão fosfato (PBS 1x) a 4°C. A fim de detectar a atividade de gelatinases na dentina, um protocolo com base em Porto et al. (2009) foi utilizado. Após lavagem copiosa dos cortes com água destilada e secagem com papéis absorventes estéreis, 60 ml de DQ- gelatin 1:12 (DQ-gelatin, E12055; Molecular Probes,

Eugene, OR, EUA) em 50 mM Tris-CaCl<sub>2</sub> foram aplicados sobre os cortes de tecido e incubados a 37°C *overnight* em uma câmara úmida. A atividade gelatinolítica foi observada como fluorescência verde (máxima absorção, de aproximadamente 495 nm; emissão de fluorescência máxima, de aproximadamente 515 nm) em microscópio confocal de fluorescência (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). Secções de controle negativo foram incubadas com 60 ml de 50 mM Tris-CaCl<sub>2</sub> como descrito acima, porém sem DQ-gelatin para todas as reações realizadas.

O objetivo dessa análise foi avaliar a presença de atividade gelatinolítica nas diferentes regiões dos tecidos dentários, incluindo – além das estruturas normais – as zonas de cárie e os componentes normais do esmalte, da dentina, da JAD e do cimento.

#### **4.6 Análise dos componentes micromorfológicos dos espécimes preparados por descalcificação**

Dezesseis dentes (grupo experimental II), sendo 8 dentes irradiados e 8 não irradiados, foram descalcificados em solução de Ana Morse (citrato de sódio 20% associado ao ácido fórmico 50%, 1:1 a 4°C) durante 3 semanas, com trocas de solução a cada dois dias. A descalcificação total foi monitorada e confirmada por meio de tomadas radiográficas periapicais semanais. Os espécimes foram cortados ao meio no sentido de seus longos eixos com auxílio de navalhas histológicas descartáveis, passando-se pelo centro da região mais profunda das lesões de cárie ou dividindo-os ao meio no plano vestibulo-lingual nos casos de dentes hígidos. As duas metades obtidas foram incluídas em paraplast para realização de cortes de 5 µm de espessura que foram obtidos em micrótomo (Leica, Nussloch, Germany). Os cortes foram inseridos em lâminas silanizadas e corados por meio da técnica da hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação morfológica em microscópio óptico de luz (Nikon Eclipse E200, Japão).

O objetivo desta análise foi avaliar os componentes micromorfológicos não mineralizados da dentina, da polpa, do cimento e do

ligamento periodontal conforme sua presença, ausência e preservação morfológica em relação aos tecidos dentários normais.

#### **4.7 Avaliação imunoistoquímica**

Um corte histológico de cada um dos 16 espécimes do grupo experimental II foram desparafinizados em xilol por 20 minutos e hidratados em soluções decrescentes de álcool (100%, 85%, 70%, 50%), durante 5 segundos em cada solução. As lâminas foram posteriormente lavadas em água destilada durante 3 minutos. Em seguida a inibição da peroxidase endógena foi realizada por imersão em peróxido de hidrogênio 10 volumes por 15 minutos em 3 banhos de 5 minutos cada. Os cortes, então, foram lavados em 3 banhos consecutivos de PBS (pH 7,4) de 5 minutos cada. Para melhor expor os epítomos, os corte histológicos foram submetidos à recuperação antigênica com tripsina 0,5% durante 1 hora em câmara úmida a 37°C.

Os cortes foram incubados com albumina soro bovina (BSA 3%) durante 30 minutos à temperatura ambiente e lavados durante 1 minuto com PBS (pH 7,4). Cada lâmina foi então incubada com 40 µl dos anticorpos primários analisados, anti-MMP-2 (Clone 42-5D11, EMD Milipore Corporation, Temecula, CA, EUA), anti-MMP-9 (Clone 56-2A4, EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Alemanha) e anti-MMP-20 (policlonal, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), diluídos em 1:50 em PBS, no caso dos anticorpos anti-MMP-2 e anti-MMP-9, e 1:100 no caso do anticorpo anti-MMP-20 (tabela 1). As incubações foram realizadas *overnight* a 4°C em um umidificador. Após os anticorpos primários, os cortes foram lavados em 3 banhos de 5 minutos cada com PBS e foram incubados com 40 µl dos anticorpos secundários biotinilados (LSAB-Link, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) no primeiro momento e posteriormente lavados com o sistema estreptavidina/peroxidase (Labeled streptavid-Biotin, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). O produto da reação foi visualizado com auxílio de 3,3-deaminobenzidina (DAB Substrate Kit®, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), aplicado durante 90 segundos e a reação foi evidenciada com o desenvolvimento de uma coloração castanha.

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer durante 4 minutos e lavadas em água corrente durante 5 minutos. Por fim, foram desidratados em soluções crescentes de álcool (50%, 70%, 85%, 100%) por 5 segundos cada, e diafanizados em 2 banhos de xilol de 5 minutos cada para serem montados com lamínulas e bálsamo do Canadá. Foram utilizados controles negativos e positivos (placentas humanas) para todas as reações, sendo os controles negativos realizados com a omissão do anticorpo primário.

As análises das reações imunoistoquímicas foram realizadas de modo independente por 2 examinadores previamente calibrados e classificadas em positivas e negativas. Quando houve discordância em algum caso, o mesmo foi reavaliado em conjunto até que se chegasse a um consenso.

O objetivo desta análise foi avaliar a marcação dos anticorpos anti-MMP-2, MMP-9 e MMP-20 nos diferentes componentes micromorfológicos não mineralizados da dentina, da polpa, do cimento e do ligamento periodontal.

**Tabela 1.** Anticorpos primários utilizados na análise imunoistoquímica.

Anticorpo	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Marca
Anti-MMP-2	42-5D11	1:50	Tripisina	Milipore
Anti-MMP-9	56-2A4	1:50	Tripisina	Milipore
Anti-MMP-20	policlonal	1:100	Tripisina	Sigma-Aldrich

#### 4.8. Análise estatística

Os dados do perfil clínico e epidemiológico dos pacientes da amostra, assim como os dados macroscópicos e radiográficos dos espécimes foram apresentados descritivamente por meio de números absolutos e porcentagens. Os resultados das análises dos estudos micromorfológicos, da atividade gelatinolítica e das reações imunoistoquímicas foram analisados estatisticamente por meio do software NCSS 2000 e comparados pelo Teste Exato de Fisher, com nível de significância de  $p$  estipulado em 0,05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise demográfica e dos parâmetros clínicos dos pacientes da amostra

#### Grupo experimental I

A média de idade dos 14 pacientes do subgrupo de dentes irradiados estudados foi de 55 anos, variando entre 39 e 74 anos. Onze pacientes (78,6%) eram do gênero masculino e 3 (21,4%) do gênero feminino. Dentre os 9 pacientes do subgrupo não irradiado, a média de idade foi de 58 anos, variando de 44 a 70 anos. Cinco (55,6%) dos pacientes eram do gênero masculino e 4 (45,4 %) do gênero feminino.

Dois pacientes do subgrupo irradiado (Figura 1) relataram etilismo (14,3%) no momento do diagnóstico do tumor primário, 8 (57,1%) relatam terem descontinuado o hábito previamente, e 4 (28,6%) negaram consumir bebidas alcoólicas com frequência. Cinco (35,7%) pacientes revelaram tabagismo, 6 (42,9%) cessaram o hábito anteriormente e 3 (21,4%) negaram tabagismo prévio ao diagnóstico. Nove (64,3%) pacientes fizeram ou faziam uso concomitante de álcool e tabaco no momento do diagnóstico, e apenas 2 indivíduos negaram ambos os hábitos. No subgrupo dos pacientes não irradiados, 3 (75%) negaram etilismo e 1 (25%) confirmou ser ex-etilista; enquanto 3 (75%) confirmaram ser ex-tabagistas e 1 (25%) negou tabagismo.

Os sítios anatômicos de maior frequência para o CCP na amostra estudada foram a orofaringe com 5 (35,7%) casos, afetando a orofaringe propriamente dita, base de língua e palato mole; a cavidade bucal com 4 (28,6%) casos, todos afetando a língua; e a laringe, com 2 (14,3%) casos. Três casos (18,75%) se localizavam em face, fossas nasais e o seio maxilar. Todos os tumores analisados estendiam-se para a cavidade bucal ou incluíam parte dela no planejamento do campo de radiação durante o tratamento radioterápico.

Doze pacientes (85,8%) foram diagnosticados com CEC, 1 (7,1%) com carcinoma metastático de mama e 1 (7,1%) com linfoma (LNHE NK/T tipo nasal). Dez (76,92%) casos diagnosticados apresentavam-se no estágio IV da

doença e 2 (15,39%) no estágio III. Adicionalmente, 1 (7,69%) caso referente ao LNHE NK/T tipo nasal encontrava-se no estágio ECIB e 1 outro caso não apresentava informação disponível sobre o estadiamento clínico do tumor.

Doze pacientes (85,8%) foram tratados por meio da associação de quimioterapia e radioterapia (QRDT), incluindo tanto protocolos de QT de indução como concomitantes. Os protocolos de quimioterapia foram baseados em Cisplatina, Carboplatina ou Paclitaxel. Dois casos (14,2%) foram tratados exclusivamente com RDT. Todos os pacientes irradiados do grupo experimental I foram submetidos a tratamento radioterápico conformacional tridimensional (3D) por meio de aceleradores lineares Sinergy Plataforma (Elekta AB, Estocolmo, Suécia), 6 MeV, com dose média de 60 Gy, variando de 40 a 70 Gy. Todos os pacientes deste estudo receberam radiação cérvico-facial bilateral (2 campos opostos laterais), sob planejamento conformacional 3D.

No grupo experimental I, o tempo médio entre o término da RDT e as extrações foi de 8 meses, variando de 3 a 21 meses. O resumo destas informações está apresentado na tabela 2.

## **Grupo experimental II**

A média de idade dos 8 pacientes do subgrupo de dentes irradiados foi de 60 anos, variando entre 52 e 75 anos. Cinco (62,5%) pacientes eram do gênero masculino e 3 (37,5%) do gênero feminino. Dentre os 8 pacientes do subgrupo não irradiado, a média de idade foi de 56 anos, variando de 23 a 70 anos. Sete (87,5%) pacientes eram do gênero masculino e 1 (12,5%) do gênero feminino.

Dois (25%) pacientes do grupo teste relataram etilismo no momento do diagnóstico do tumor primário, 4 (50%) relatam descontinuidade do hábito previamente ao diagnóstico, e 2 (25%) negaram. Dois (25%) pacientes revelaram tabagismo, 4 (50%) relataram ser ex-tabagistas e 2 (25%) negaram. Cinco (55,6%) pacientes fizeram ou faziam uso concomitante de álcool e tabaco no momento do diagnóstico, e apenas 1 indivíduo negou ambos os hábitos durante a vida. No subgrupo dos pacientes não irradiados, 1 (12,5%) relatou etilismo, 4 (50%) confirmaram ex-etilismo e 3 (37,5%) negaram. Quatro

(50%) pacientes afirmaram ser ex-tabagistas, 2 (25%) negaram o hábito e 2 (50%) confirmaram tabagismo.

Os sítios anatômicos de maior frequência para o CCP na amostra estudada foram a cavidade bucal com 5 (62,5%) casos, afetando a língua e palato duro; a orofaringe com 1 (12,5%) caso afetando o palato mole, a nasofaringe com 1 (12,5%) caso e 1 (12,5%) caso afetando os níveis I e II da região cervical.

Seis pacientes (75%) foram diagnosticados com CEC, 1 (12,5%) com CEC metastático de primário oculto e 1 (12,5%) com um linfoma não-Hodking de grandes células B difuso (LNHGCB). Cinco (71,4%) casos diagnosticados apresentavam-se no estágio IV e 2 (28,6%) casos no estágio III. No caso do LNHGCB as informações sobre o estágio clínico da doença não estavam disponíveis.

Sete (87,5%) pacientes foram tratados por QRDT, incluindo tanto protocolos de QT de indução quanto concomitante. As associações mais comuns utilizavam doses de Cisplatina Carboplatina e Paclitaxel. Apenas 1 (12,5%) caso foi tratado exclusivamente com RDT. Todos os pacientes foram submetidos a tratamento radioterápico conformacional tridimensional (3D) por meio de aceleradores lineares Sinergy Plataforma (Elekta AB, Estocolmo, Suécia), 6 MeV, com dose média de 60 Gy, variando de 40 a 70 Gy. Todos os pacientes deste estudo receberam radiação cérvico-facial bilateral (2 campos opostos laterais), sob planejamento conformacional 3D.

O tempo médio entre a conclusão da RDT e as extrações dos espécimes utilizados neste grupo foi de 13 meses, com intervalos variando entre 6 e 16 meses. O resumo das informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes irradiados do grupo experimental II encontram-se apresentados na tabela 3.

**Tabela 2.** Perfil clínico dos pacientes irradiados do grupo experimental I.

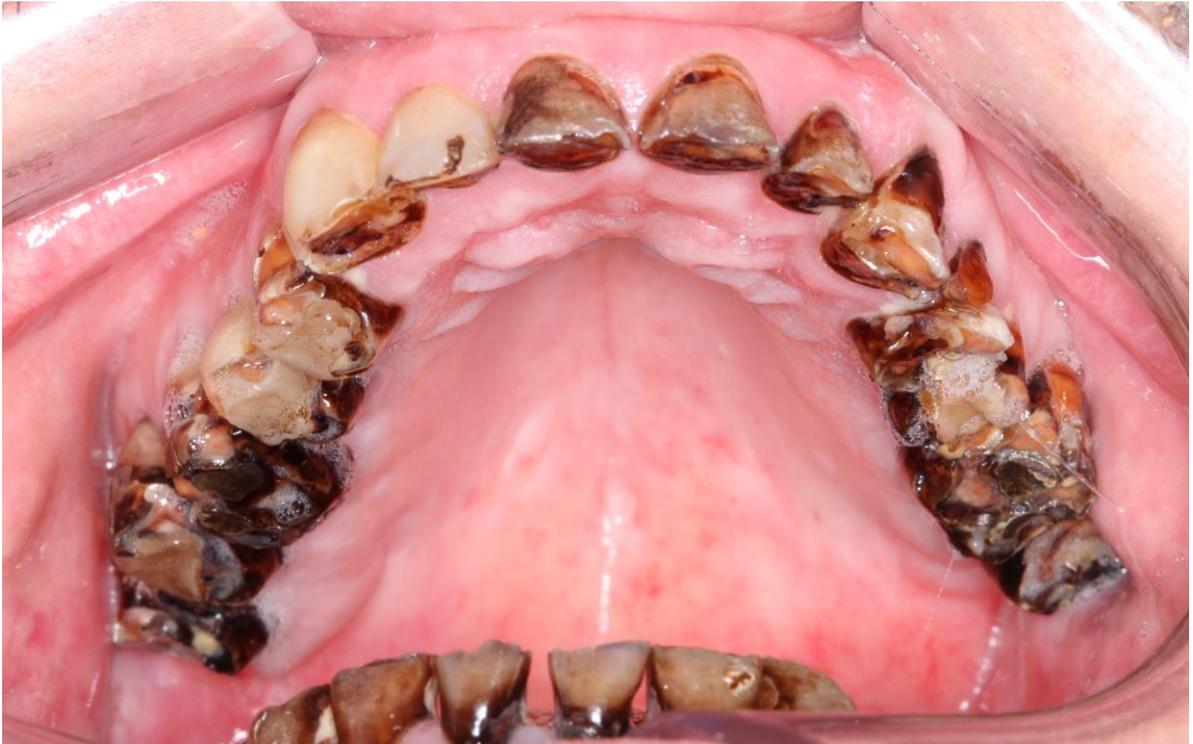
Paciente	Gênero	Cor	Idade	Etilismo	Tabagismo	Sítio anatômico	Tumor	Tratamento	Estadiamento	Planejamento	Dose	Tempo de Extração
1	F	B	39	Nega	Ex-tabagista	Face	Carcinoma Metastático de Mama	QRDT	NA	3D	40 Gy	3 meses
2	M	B	70	Ex-etilista	Ex-tabagista	Orofaringe	CEC	QRDT	T4N3M0	3D	70Gy	4 meses
3	M	B	36	Ex-etilista	Tabagista	Orofaringe	CEC	QRDT	T4N1Mx	3D	70 Gy	6 meses
4	M	B	44	Ex-etilista	Ex-tabagista	Língua	CEC	QRDT	T4NxMx	3D	60Gy	12 meses
5	M	B	73	Ex-etilista	Ex-tabagista	Laringe	CEC	QRDT	T4N2M0	3D	66 Gy	10 meses
6	M	B	68	Nega	Nega	Base de língua	CEC	QRDT	T1N2M0	3D	70 Gy	14 meses
7	F	B	44	Nega	Nega	Fossa nasal	LNHE NK/T tipo nasal	QRDT	ECIIB	3D	46 Gy	3 meses
8	F	B	63	Nega	Ex-tabagista	Laringe	CEC	RDT	T4N2M0	3D	63 Gy	4 meses
9	M	B	74	Ex-etilista	Ex-tabagista	Língua	CEC	RDT	T3N2M0	3D	66 Gy	6 meses
10	M	P	54	Etilista	Tabagista	Base de língua	CEC	QRDT	T4N2M0	3D	70 Gy	4 meses
11	M	P	45	Ex-etilista	Tabagista	Seio maxilar	CEC	QRDT	T4N2M0	3D	70 Gy	IND
12	M	B	58	Etilista	Nega	Língua	CEC	QRDT	T4N2Mx	3D	70 Gy	12 meses
13	M	P	58	Ex-etilista	Tabagista	Orofaringe	CEC	QRDT	T3N3M0	3D	70 Gy	21 meses
14	M	P	44	Ex-etilista	Tabagista	Língua	CEC	QRDT	T4N2M0	3D	70 Gy	11 meses

M = masculino; F = feminino; B = branco; P = pardo; CEC = carcinoma espinocelular; LNHE NK/T = linfoma não-Hodgkin extranodal NK/T; QRDT = quimiorradioterapia; RDT = radioterapia; 3D = tridimensional (conformacional); Dose = dose total prescrita para o volume tumoral; Gy = Gray (unidade de medida); NA = Não se aplica; IND = Indisponível.

**Tabela 3.** Perfil clínico dos pacientes irradiados do grupo experimental II.

Paciente	Gênero	Cor	Idade	Etilismo	Tabagismo	Sítio anatômico	Tumor	Tratamento	Estadiamento	Planejamento	Dose	Tempo de extração
1	F	B	52	Nega	Nega	Nasofaringe	CEC	QRDT	T4N2Mx	3D	70Gy	IND
2	M	B	58	Ex-etilista	Ex-tabagista	Língua	CEC	QRDT	T3N0M0	3D	70Gy	14 meses
3	M	P	63	Ex-etilista	Tabagista	Palato	CEC	QRDT	T3N0M0	3D	70Gy	IND
4	M	B	58	Etilista	Nega	Língua	CEC	QRDT	T4N2M0	3D	70Gy	12 meses
5	F	N	59	Etilista	Tabagista	Língua	CEC	QRDT	T4N2M0	3D	70Gy	14 meses
6	M	B	60	Ex-etilista	Ex-tabagista	Região Cervical	CEC metastático	QRDT	TxN2Mx	3D	70Gy	16 meses
7	F	B	58	Nega	Ex-tabagista	Palato	LNHGCB	QRDT	IND	3D	40Gy	15 meses
8	M	B	75	Ex-etilista	Ex-tabagista	Língua	CEC	RDT	T3N2M0	3D	70Gy	6 meses

M = masculino; F = feminino; B = branco; P = pardo; CEC = carcinoma espinocelular; LNHGCB = linfoma não-Hodgkin de grandes células B difuso; QRDT = quimiorradioterapia; RDT = radioterapia; 3D = tridimensional (conformacional); Dose = dose total prescrita para o volume tumoral; Gy = Gray (unidade de medida); IND = indisponível.



**Figura 1.** Imagem intra-bucal de paciente afetado por CRR que participou deste estudo. Notam-se pigmentações acastanhadas escuras afetando esmalte e dentina e predileção da CRR pelas regiões cervicais, incisais e oclusais dos dentes que foram afetados de modo generalizado.

## **5.2 Análise macroscópica e radiográfica dos dentes do grupo experimental I**

A análise macroscópica revelou que 10 (71,4%) dos dentes do subgrupo irradiado apresentavam CRR caracterizada por intensidade variável de pigmentações acastanhadas envolvendo as faces lisas de esmalte e cavitação de profundidade variável afetando as regiões cervicais, incisais/oclusais e proximais das amostras (Figura 2). Desses casos, 7 afetavam a região oclusal/incisal, 6 a região cervical e 4 as áreas proximais. Quatro casos apresentavam pigmentação acastanhada como marco de lesões incipientes de cárie de esmalte e 5 (35,7%) apresentavam restaurações em alguma das faces. Cinco (35,7%) dentes da amostra eram caninos, 4 (28,6%) eram incisivos, 3 (21,4%), eram molares e 2 (14,3%) pré-molares.

No subgrupo de dentes não irradiados, 7 (77,8%) apresentavam cárie, sendo 4 na região cervical, 3 na região incisal/oclusal e 3 nas áreas proximais. Quatro (44,4%) dentes eram incisivos, 3 (33,3%) caninos, 2 (22,2%) molares e 1 (11,1%) pré-molar. Dois (22,2%) dentes apresentavam restaurações e 4 (44,4%) dentes apresentavam pigmentações semelhantes aos dentes irradiados em lesões cervicais já cavitadas. Todos os dentes analisados mostraram padrões radiográficos convencionais de esmalte, dentina e cemento. Imagens radiolúcidas associadas às áreas afetadas macroscopicamente pelas lesões de CRR e de cárie convencional puderam ser notadas em todas as amostras afetadas (Figura 3).

O resumo dos resultados da análise macroscópica é apresentado nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4.** Características macroscópicas dos dentes irradiados do grupo experimental I.

Paciente	Dente	CRR	Restauração	Pigmentação acastanhada
1	PM	P, O	Não	Não
2	MO	P	Não	Sim
3	MO	C, P, O	Não	Sim
4	PM	Não	Não	Não
5	CA	I	Não	Não
6	IN	Não	Sim	Não
7	CA	Não	Sim	Não
8	IN	Não	Não	Não
9	IN	C, P	Sim	Não
10	CA	C, I	Não	Sim
11	MO	O	Não	Não
12	IN	C, I	Sim	Não
13	CA	C	Sim	Sim
14	CA	C, I	Não	Não

IN = incisivo; CA = canino; PM = pré-molar; MO = molar; CRR = cárie relacionada à radioterapia; C = cervical; I = incisal; P = proximal; O = oclusal.

**Tabela 5.** Características macroscópicas dos dentes não irradiados do grupo experimental I.

Paciente	Dente	Cárie	Restauração	Pigmentação acastanhada
1	MO	Não	Não	Não
2	PM	P	Não	Não
3	IN	C, P, I	Não	Sim
4	IN	P, I	Sim	Sim
5	CA	C, I	Não	Sim
6	IN	C, I	Não	Sim
7	IN	I	Não	Não
8	CA	C	Não	Não
9	MO	Não	Sim	Não

IN = incisivo; CA = canino; PM = pré-molar; MO = molar; C = cervical; I = incisal; P = proximal; O = oclusal.

### **5.3 Análise macroscópica e radiográfica dos dentes do grupo experimental II**

A análise macroscópica revelou que 8 (100%) dentes do subgrupo irradiado apresentaram CRR caracterizada por intensidade variável de pigmentações acastanhadas envolvendo as faces lisas de esmalte e cavitação de profundidade variável afetando as regiões cervicais, incisais/oclusais e proximais das amostras (Figura 2). Desses casos, 8 afetavam a região cervical, 7 a região incisal/oclusal e 3 as áreas proximais. Todos os 8 casos apresentavam pigmentação acastanhada como marco de lesões incipientes de cárie em esmalte e dentina. Quatro (50%) dentes da amostra eram incisivos (2 incisivos centrais superiores, 1 incisivo lateral superior e 1 incisivo lateral inferior), 2 (25%) dentes eram pré-molares (ambos inferiores), 1 (12,5%) dente era molar (molar inferior) e 1 (12,5%) dente canino. Em 5 (62,5%) casos, restaurações puderam ser observadas.

No subgrupo de dentes não irradiados, 6 (75%) apresentavam cáries. Todos os dentes analisados mostraram padrões radiográficos convencionais de esmalte, dentina e cimento. Imagens radiolúcidas associadas às áreas afetadas macroscopicamente pelas lesões de CRR e de cárie convencional puderam ser notadas em todas as amostras afetadas (Figura 3).

O resumo dos resultados da análise macroscópica é apresentado na Tabela 6 e 7.

**Tabela 6.** Características macroscópicas dos dentes irradiados do grupo experimental II.

<b>Paciente</b>	<b>Dente</b>	<b>CRR</b>	<b>Restauração</b>	<b>Pigmentação</b>
1	CA	C, P, I	Não	Sim
2	MO	C, P	Sim	Sim
3	PM	C, O	Sim	Sim
4	IN	C, I	Sim	Sim
5	PM	C,P,O	Não	Sim
6	IN	C, I	Não	Sim
7	IN	C, I	Sim	Sim
8	IN	C, I	Sim	Sim

IN = incisivo; CA = canino; PM = pré-molar; MO = molar; CRR = cárie relacionada à radioterapia; C = cervical; I = incisal; P = proximal; O = oclusal.

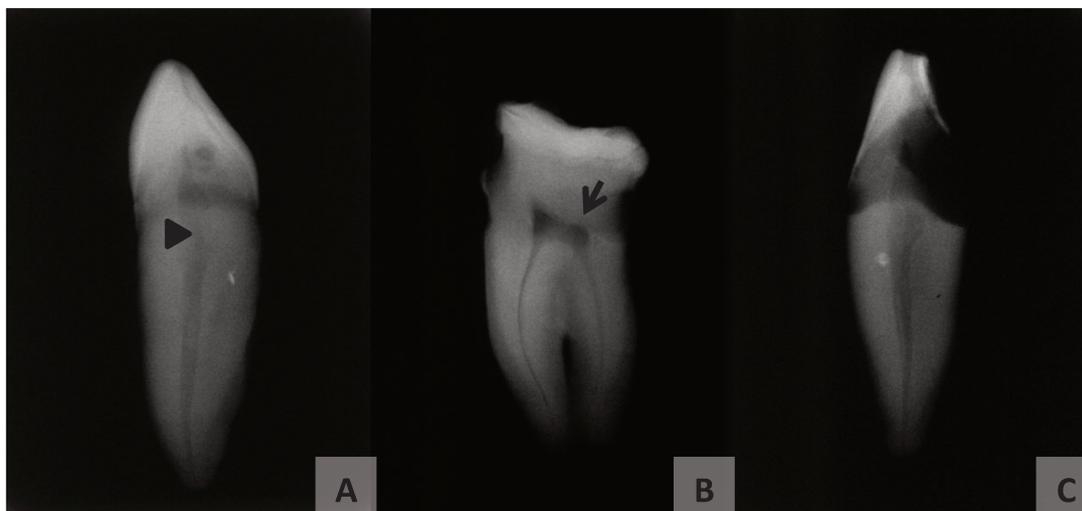
**Tabela 7.** Características macroscópicas dos dentes não irradiados do grupo experimental II.

<b>Paciente</b>	<b>Dente</b>	<b>Cárie</b>	<b>Restauração</b>	<b>Pigmentação</b>
1	CA	C, I	Não	Sim
2	MO	Não	Não	Não
3	MO	O	Não	Não
4	IN	Não	Sim	Não
5	PM	P, O	Não	Sim
6	CA	C, I	Não	Não
7	PM	C	Não	Sim
8	PM	C	Não	Sim

IN = incisivo; CA = canino; PM = pré-molar; MO = molar; C = cervical; I = incisal; P = proximal; O = oclusal.



**Figura 2.** Aspectos macroscópicos da amostra. **A.** Canino afetado por CRR. Note a predileção da CRR pela região cervical, incisal (**B** e **C**) e o padrão de desprendimento do esmalte cervical a partir da dentina subjacente (**D**).



**Figura 3.** Aspectos radiográficos da amostra de dentes afetados por CRR. **A.** Canino apresentando cárie superficial na região cervical e com aparente sinal de formação de dentina terciária no terço médio da raiz (cabeça de seta). **B.** Molar inferior com cáries extensas cervicais que comprometem conjuntamente ambas as regiões proximais do dente. Nota-se a redução do corno pulpar distal (seta) em relação ao corno mesial devido à deposição de dentina terciária reacional relacionada à extensa cárie nessa face. **C.** Estágio avançado de CRR acometendo toda extensão cervical e lingual de um incisivo inferior. Observa-se exposição da câmara pulpar coronária em uma fase na qual o colapso da estrutura dentária compromete a estabilidade do remanescente, gerando risco de fratura e amputação coronária.

#### **5.4 Análise dos componentes micromorfológicos dos espécimes preparados por desgaste**

Os resultados da investigação dos componentes micromorfológicos do esmalte (lamelas, tufos, fusos e estrias de Retzius), da JAD (padrão festonado ou liso), da dentina (linhas incrementais, dentina interglobular e camada granulosa de Tomes), da presença e padrões de desmineralização da CRR e da JAC nos espécimes avaliados no grupo experimental I estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. Casos ilustrativos destes eventos morfológicos estão apresentados nas Figuras 4, 5, 6, 7 e 8. Nenhum dos resultados obtidos nesta análise foi estatisticamente significativo quando se comparou espécimes irradiados e não irradiados.

**Tabela 8.** Análise micromorfológica do esmalte e JAD no grupo experimental I.

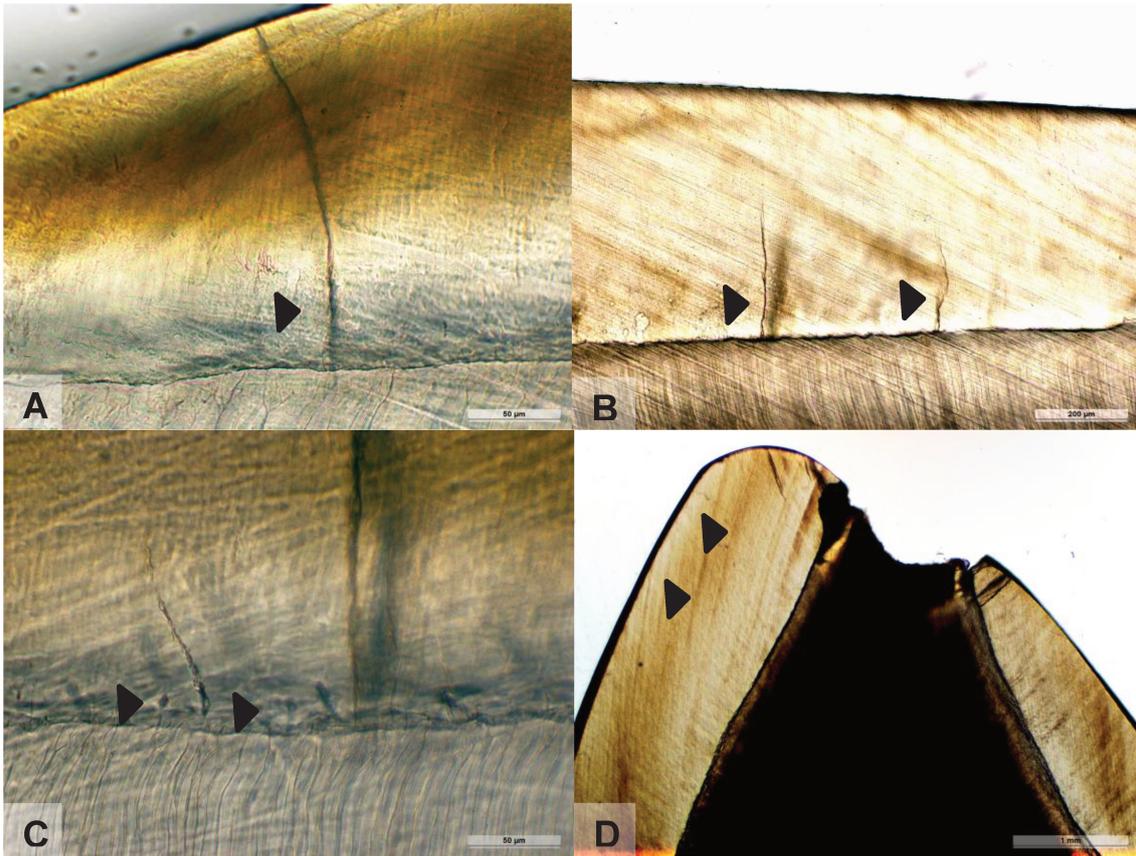
	<b>Irradiados (n=14)</b>	<b>Não irradiados (n=9)</b>	<b>p</b>
<b>Fusos</b>			
<i>Cervical</i>	9/10 (90%)	5/8 (62,5%)	0,262
<i>Média</i>	10/13 (76,9%)	8/9 (88,9%)	0,630
<i>Incisal/oclusal</i>	12/13 (92,3%)	8/9 (88,9%)	0,428
<b>Tufos</b>			
<i>Cervical</i>	8/10 (80%)	8/8 (100%)	0,485
<i>Média</i>	11/13 (84,6%)	9/9 (100%)	0,432
<i>Incisal/oclusal</i>	13/14 (92,7%)	8/9 (88,9%)	0,262
<b>Lamelas</b>			
<i>Cervical</i>	9/10 (90%)	8/8 (100%)	0,485
<i>Média</i>	8/13 (61,5%)	7/9 (77,8%)	0,657
<i>Incisal/oclusal</i>	10/13 (76,9%)	8/9 (92,5%)	0,360
<b>Estrias de Retzius</b>	7/13 (53,8%)	7/9 (77,8%)	0,380
<b>Esmalte nodoso</b>	8/14 (57,1%)	5/9 (55,6%)	1,000
<b>JAD</b>			
<i>Cervical</i>	11/12 F (91,7%) – 1/12L (8,3%)	5/9 F (55,6%) – 4/9 L (44,4%)	0,177
<i>Média</i>	13/13 F (100%) – 0/0 L (0%)	9/9 F (100%) – 0/0 L (0%)	NA
<i>Incisal/oclusal</i>	12/12 F (100%) – 0/0 L (0%)	8/8 F (100%) – 0/0 L (0%)	NA
<b>Pigmentação</b>	8/14 (57,1%)	6/9 (66,7%)	0,691

JAD = junção amelodentinária, F = festonada, L = lisa, NA = não avaliada.

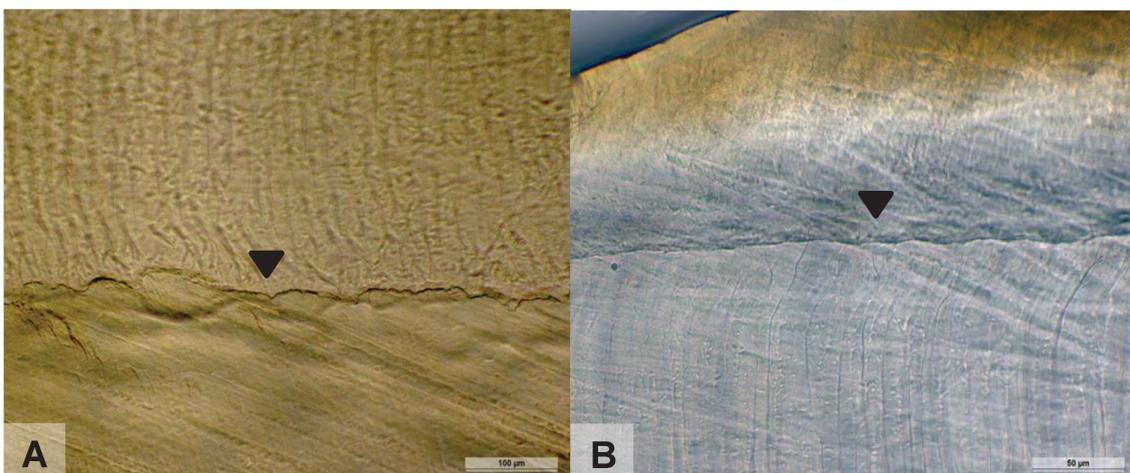
**Tabela 9.** Micromorfologia da dentina e JAC no grupo experimental I.

	<b>Irradiados (n=14)</b>	<b>Não irradiados (n=9)</b>	<b>p</b>
<b>Dentina interglobular</b>	12/14 (85,7%)	5/9 (55,6%)	0,161
<b>Linhas incrementais</b>	3/14 (21,4%)	5/9 (55,6%)	0,179
<b>Camada granulosa de Tomes</b>	11/14 (78,6%)	7/9 (77,8%)	1,000
<b>Dentina terciária</b>	3/14 (21,4%)	3/9 (33,3%)	0,655
<b>Cárie (I/O)</b>	10/14 (71,4%)	7/9 (77,8%)	1,000
<b>Cárie (C)</b>	10/14 (71,4%)	6/9 (66,7%)	1,000
<b>JAC</b>	3/6 S (50%) – 2/6 J (33,3%) – 1/6 D (16,7%)	2/4 S (50%) – 1/4 J (25%) – 1/4 D (25%)	NA

I = incisal, O = oclusal, C = cervical, JAC = junção amelocementária, S = sobreposição entre esmalte e cimento ou cimento e esmalte, J = justaposição entre esmalte e cimento, A = descontinuidade entre esmalte e cimento, NA = não avaliada.



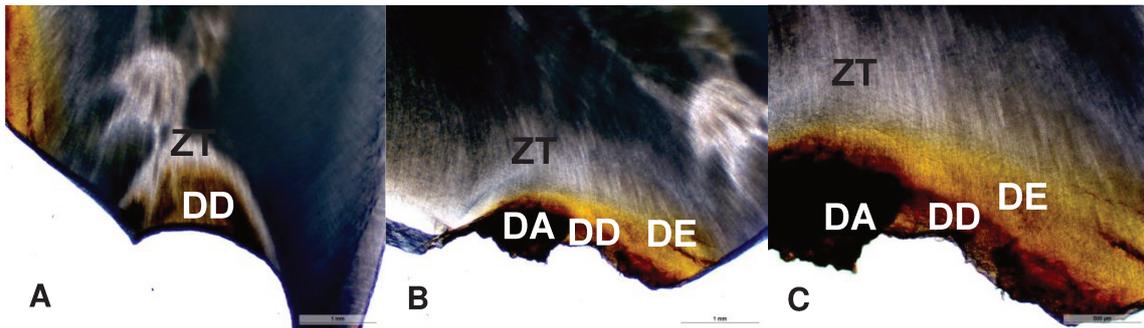
**Figura 4.** Aspectos micromorfológicos da amostra. **A.** Lamelas (cabeças de seta). **B.** Tufos (cabeças de seta). **C.** Fusos (cabeças de seta). **D.** Estrias de Retzius (cabeça de seta). Cortes histológicos obtidos pela técnica do desgaste.



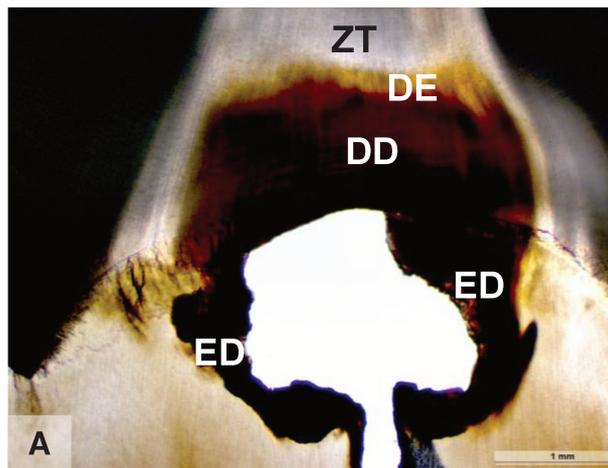
**Figura 5.** Aspectos micromorfológicos da amostra. **A.** Padrão de festonamento da JAD em região média da coroa (cabeça de seta). **B.** Padrão liso da JAD em região cervical (cabeça de seta). Cortes histológicos obtidos pela técnica do desgaste.



**Figura 6.** Aspectos micromorfológicos da amostra. **A.** Linhas incrementais evidenciadas por áreas de ondulações no padrão de deposição da dentina (cabeças de seta). **B.** Dentina interglobular na região mais externa da dentina (cabeças de seta). **C.** Camada granulosa de Tomes preservada nos espécimes irradiados (cabeças de seta). Cortes histológicos obtidos pela técnica do desgaste.



**Figura 7.** Imagens de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando diferentes zonas de cárie. **A.** CRR incisal mostrando zona de dentina desmineralizada (DD) na porção mais externa e zona translúcida (ZT) abaixo. **B.** Menor aumento de lesão de CRR mostrando dentina amolecida (DA) superficialmente, DD, dentina esclerótica (DE) e ZT em padrão de meia lua. **C.** Maior aumento mostrando em detalhe as zonas de cárie.



**Figura 8. A.** Imagem de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando diferentes zonas de cárie oclusal em formato de pirâmides invertidas de bases opostas. Superficialmente nota-se a zona de esmalte desmineralizado (ED), seguidas pelas camadas em dentina de DD, DE e de ZT contornando as laterais e a zona mais profunda da DD.

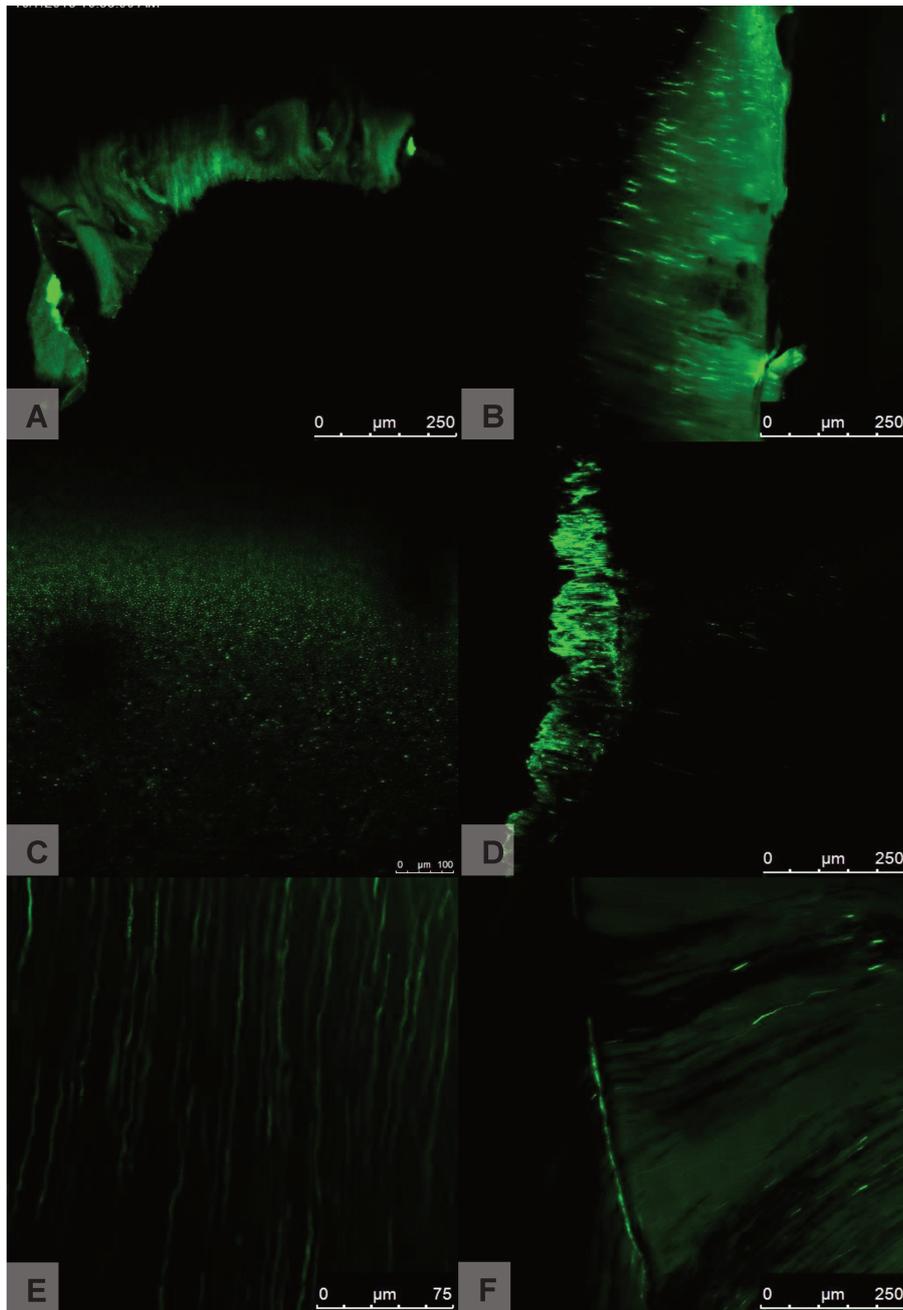
### **5.5 Análise da atividade gelatinolítica por meio da técnica da zimografia *in situ*.**

O resumo dos resultados referentes à detecção da atividade gelatinolítica está apresentado na Tabela 10 e imagens representativas deste experimento estão apresentadas nas Figuras 9 e 10. Nenhum dos resultados obtidos nesta análise foi estatisticamente significativo quando se comparou espécimes irradiados e não irradiados.

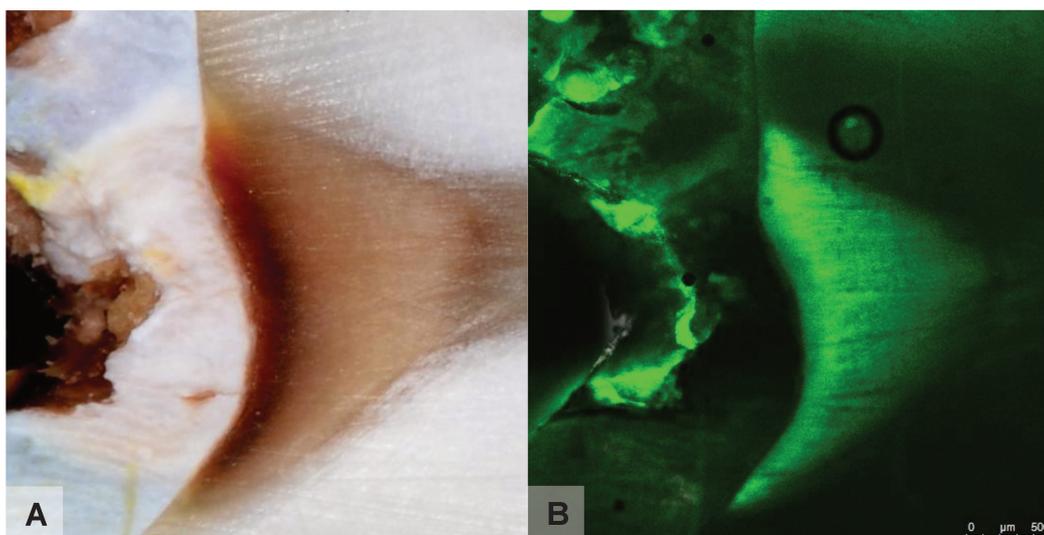
**Tabela 10.** Avaliação da atividade gelatinolítica dos espécimes do grupo experimental I.

	<b>Irradiados</b>	<b>Não irradiados</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Cárie (I/O)</b>	6/9 (66%)	4/7 (57,1%)	1,000
<b>Cárie (C)</b>	5/9 (55,6%)	2/7 (28,6%)	0,357
<b>Pré-dentina</b>	1/9 (11,1%)	2/7 (28,6%)	0,550
<b>Túbulos dentinários</b>	6/9 (66,7%)	5/7 (71,4%)	1,000
<b>JAD</b>	0/9 (0%)	1/7 (14,3%)	0,437
<b>Dentina terciária</b>	2/3 (66,7%)	1/3 (33,3%)	1,000

I = incisal; O = oclusal; C = cervical; JAD = junção amelodentinária.



**Figura 9.** Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência pela técnica da ZIS. **A.** Atividade gelatinolítica em região de cárie incisal. **B.** Atividade gelatinolítica em região de cárie cervical. **C.** Atividade ao redor dos tubos dentinários cortados axialmente. **D.** Atividade gelatinolítica em região de pré-dentina de espécime com cárie cervical. **E.** Atividade gelatinolítica evidenciada no interior dos túbulos dentinários (prolongamentos odontoblásticos). **F.** Atividade gelatinolítica ao longo da JAD.



**Figura 10.** **A.** Imagem macroscópica após corte transversal de espécime afetado pela CRR. **B.** Imagem da área correspondente à imagem macroscópica, obtida por microscopia confocal de fluorescência, ilustrando atividade gelatinolítica nas áreas de desmineralização correspondentes às zonas de dentina desmineralizada e esclerótica.

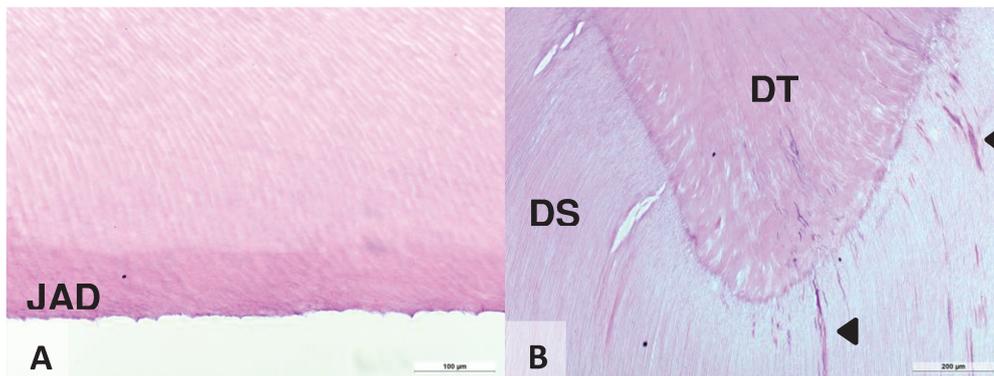
## **5.6 Análise dos componentes micromorfológicos em espécimes descalcificados**

O resumo dos resultados obtidos durante as análises da micromorfologia da dentina, JAD, polpa e ligamento periodontal estão apresentados na Tabela 11. As Figuras 11, 12 e 13 ilustram casos representativos das análises supramencionadas. Nenhum dos resultados obtidos nesta análise foi estatisticamente significativo quando se comparou espécimes irradiados e não irradiados.

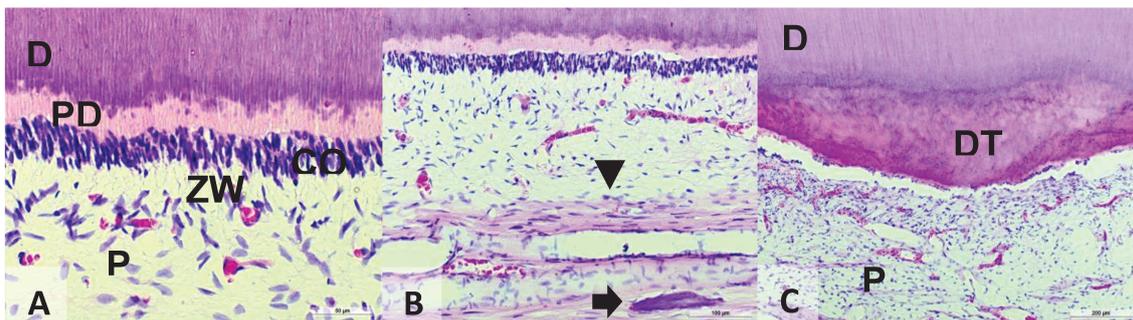
**Tabela 11.** Análise morfológica dos espécimes do grupo experimental II.

<b>Parâmetros</b>	<b>Irradiados (n=8)</b>	<b>Não irradiados (n=8)</b>
<b>JAD</b>	7/8 D (87,5%) - 1/8 C (12,5%)	6/8 D (75%) - 2/8 C (25%)
<b>Dentina</b>		
<i>Cárie</i>	8/8 (100%)	6/8 (75%)
<i>Colônias bacterianas</i>	7/8 (87,5%)	4/8 (50%)
<i>Dentina Secundária</i>	8/8 (100%)	8/8 (100%)
<i>Dentina Terciária</i>	5/8 (62,5%)	5/8 (62,5%)
<i>Pré-dentina</i>	8/8 (100%)	7/7 (100%)
<b>Polpa</b>		
<i>Camada odontontoblástica</i>	6/6 P (100%) - 0/7 D (0%)	4/6 P (66,7%) - 2/6 D (33,3%)
<i>Zona subodontoblástica (Weiss)</i>	3/5 (60%) P - 2/5 (40%) A	5/5 (100%) P - 0/5 (0%)
<i>Matriz extracelular e fibroblastos</i>	4/6 (66,7%) P - 2/6 (33,3%) A	5/7 (71,4%) P - 2/7 (28,6%) A
<i>Calcificação</i>	2/8 (25%)	6/7 (85,7%)
<i>Feixes nervosos</i>	5/6 (83,3%)	6/7 (85,7%)
<i>Vasos sanguíneos</i>	6/6 (100%)	7/7 (100%)
<b>Ligamento periodontal</b>		
<i>Cemento</i>	8/8 (100%) P	8/8 (100%) P
<i>Fibras periodontais</i>	8/8 (100%) P	8/8 (100%) P

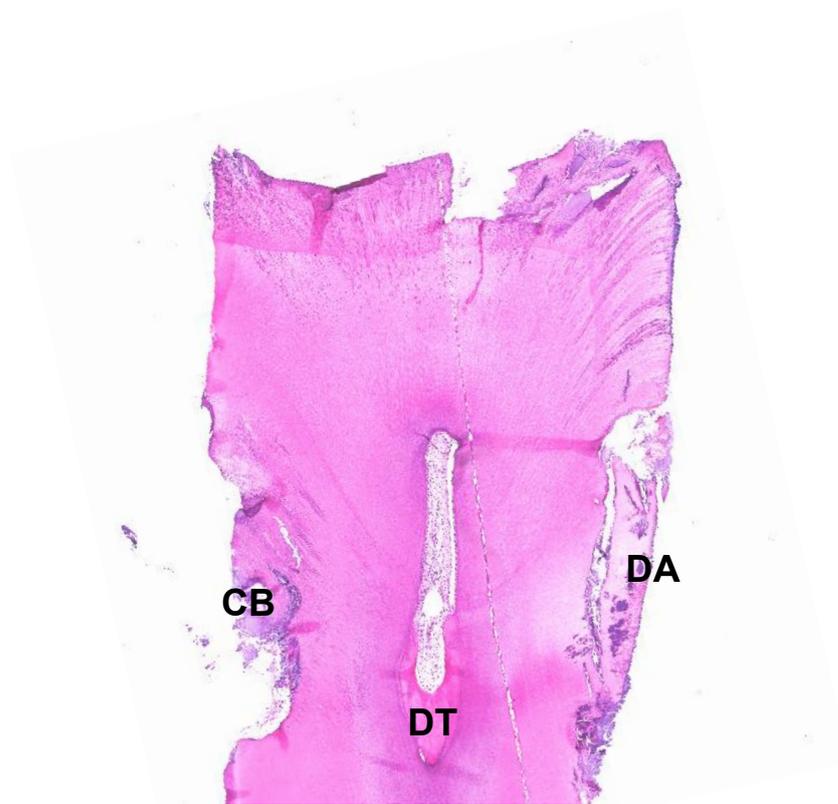
D = descontínua; C = contínua; P = preservada; A = alterada.



**Figura 11.** Imagem de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando componentes morfológicos dos espécimes descalcificados e corados em H&E. **A.** Padrão festonado da JAD e dentina primária (DP) mostrando túbulos preservados. **B.** Dentina secundária (DS) mostrando áreas de microinfiltração bacteriana (cabeças de seta) e formação de dentina terciária (DT) na região afetada próxima a polpa.



**Figura 12.** Imagem de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando componentes morfológicos dos espécimes descalcificados e corados em H&E. **A.** Dentina (D) e pré-dentina (PD), camada odontoblástica (CO) de células em paliçada dispostas ao longo da região periférica da polpa (P) e zona subodontoblástica ou zona de Weiss (ZW) apresentando hipocelularidade. **B.** Feixe vásculo-nervoso (cabeça de seta) ao longo da porção central da polpa e calcificação distrófica (seta) adjacente. **C.** Dentina terciária (DT) atubular em área adjacente a CRR e de descontinuidade da camada odontoblástica.



**Figura 13.** Imagem de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando espécime afetado por CRR em região cervical (H.E., 4X). Nota-se, superficialmente, dentina amolecida (DA) que se desprende do tecido dentinário hígido, colônias bacterianas (CB) e deposição de dentina terciária (DT) sendo formada em resposta à infiltração bacteriana.

### **5.7 Análise imunoistoquímica anti-MMP-2**

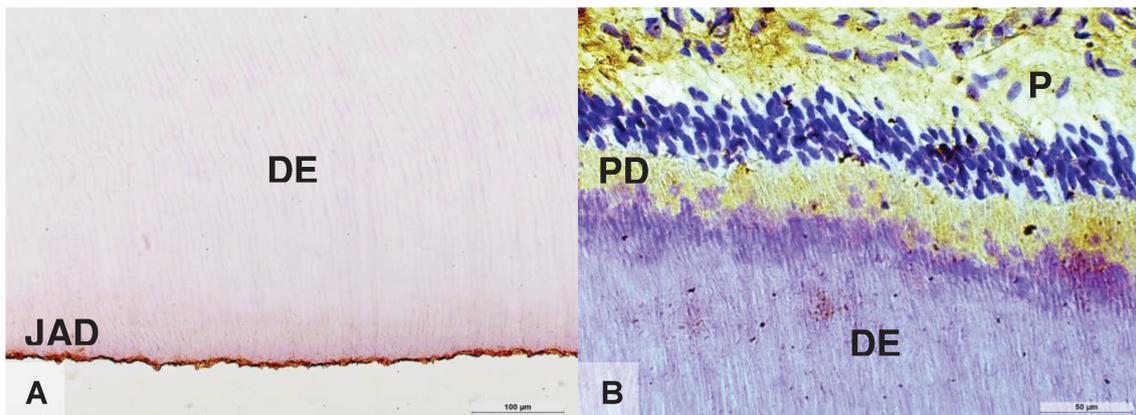
O resumo dos resultados referentes à análise imunoistoquímica anti-MMP-2 está apresentada na Tabela 12. Imagens ilustrativas deste experimento estão apresentadas nas Figuras 14 e 15. Nenhum dos resultados obtidos nesta análise foi estatisticamente significativo quando se comparou espécimes irradiados e não irradiados.

**Tabela 12.** Análise imunoistoquímica anti-MMP-2.

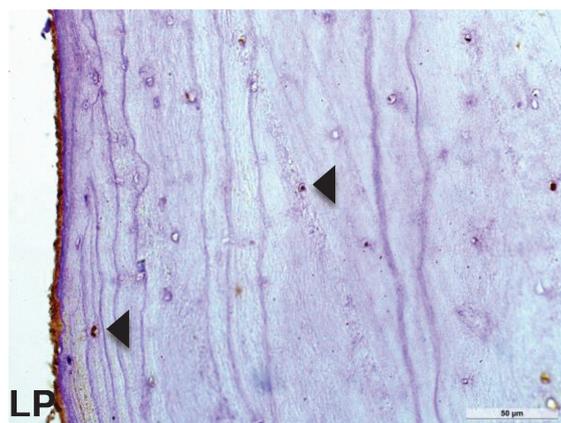
	<b>Irradiados (n=8)</b>	<b>Não irradiados (n=8)</b>	<b>P*</b>
<b>JAD</b>	8/8(100%)	8/8(100%)	NA
<b>Cárie</b>	7/8 (87,5%)	7/7 (100%)	0,608
<b>Dentina não cariada</b>	7/8 (87,5%)	5/8 (62,5%)	1,000
<b>Dentina terciária</b>	2/5 (40%)	2/6 (33,3%)	0,627
<b>Pré-dentina</b>	7/8 (87,5%)	7/8 (87,5%)	1,000
<b>Camada odontoblástica</b>	2/5 (40%)	3/7 (42,9%)	0,292
<b>Polpa (MEC)</b>	3/5 (60%)	5/6 (83,3%)	0,592
<b>Cimento</b>	6/7 (85,8%)	7/8 (87,5%)	0,608
<b>Ligamento</b>	8/8 (100%)	8/8 (100%)	NA

MEC = matriz extracelular, NA = não avaliado.

\*Valor de *p* referente a comparação da positividade de marcação entre as amostras irradiadas e não irradiadas.



**Figura 14.** Imagem de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando análise imunoistoquímica para MMP-2 de espécime afetado por CRR. **A.** Intensa marcação ao longo da JAD. **B.** Intensa marcação na região de pré-dentina e matriz extracelular da polpa. DE = Dentina; JAD = Junção Amelodentinária; PD = Pré-dentina; P = Polpa.



**Figura 15.** Imagem de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando análise imunoistoquímica para MMP-2 de espécime irradiado. **A.** Nota-se o detalhe da marcação focal de cementócitos (cabeças de seta) e do remanescente de ligamento periodontal (LP) aderido ao cimento radicular.

### **5.8 Análise imunoistoquímica anti-MMP-9**

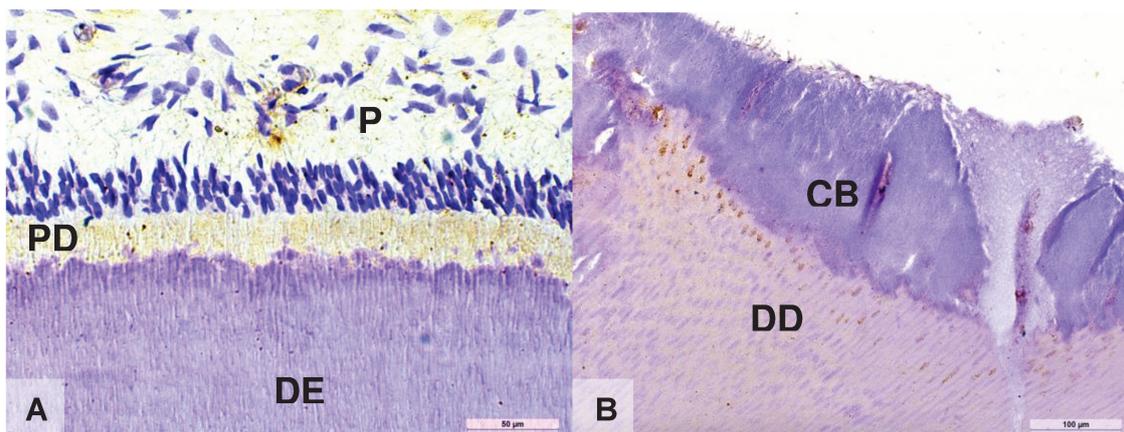
O resumo dos resultados referentes à análise imunoistoquímica anti-MMP-9 está apresentada na Tabela 13. Imagens ilustrativas deste experimento estão apresentadas na Figura 16. Nenhum dos resultados obtidos nesta análise foi estatisticamente significativo quando se comparou espécimes irradiados e não irradiados.

**Tabela 13.** Análise imunoistoquímica anti-MMP-9.

	<b>Irradiados (n=8)</b>	<b>Não irradiados (n=8)</b>	<b>P*</b>
<b>JAD</b>	8/8(100%)	8/8(100%)	NA
<b>Cárie</b>	6/8 (75%%)	4/7 (57,1%)	0,608
<b>Dentina não cariada</b>	5/8 (62,5%)	5/8 (62,5%)	1,000
<b>Dentina terciária</b>	1/5 (20%)	2/7 (28,6%)	1,000
<b>Pré-dentina</b>	6/7 (85,7%)	7/7 (100%)	1,000
<b>Camada odontoblástica</b>	1/5 (20%)	4/7 (57,1%)	0,608
<b>Polpa (MEC)</b>	3/6 (50%)	5/7 (71,4%)	0,592
<b>Cimento</b>	4/8 (50%)	5/7 (71,4%)	0,608
<b>Ligamento</b>	8/8 (100%)	8/8 (100%)	NA

MEC = matriz extracelular; NA = não avaliado.

\*Valor de *p* referente a comparação da positividade de marcação entre as amostras irradiadas e não irradiadas.



**Figura 16.** Imagem de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando análise imunoistoquímica para MMP-9 de espécime afetado por CRR. **A.** Nota-se marcação de intensidade fraca em pré-dentina e em regiões focais da MEC da polpa. **B.** Intenso padrão de marcação no interior de túbulos dentinários adjacentes à região de desmineralização por CRR cervical e em dentina peritubular. DE = Dentina; JAD = Junção Amelodentinária; PD = Pré-dentina; P = Polpa; DD = Dentina Desmineralizada; CB = Colônias Bacterianas.

### **5.9 Análise imunoistoquímica anti-MMP-20**

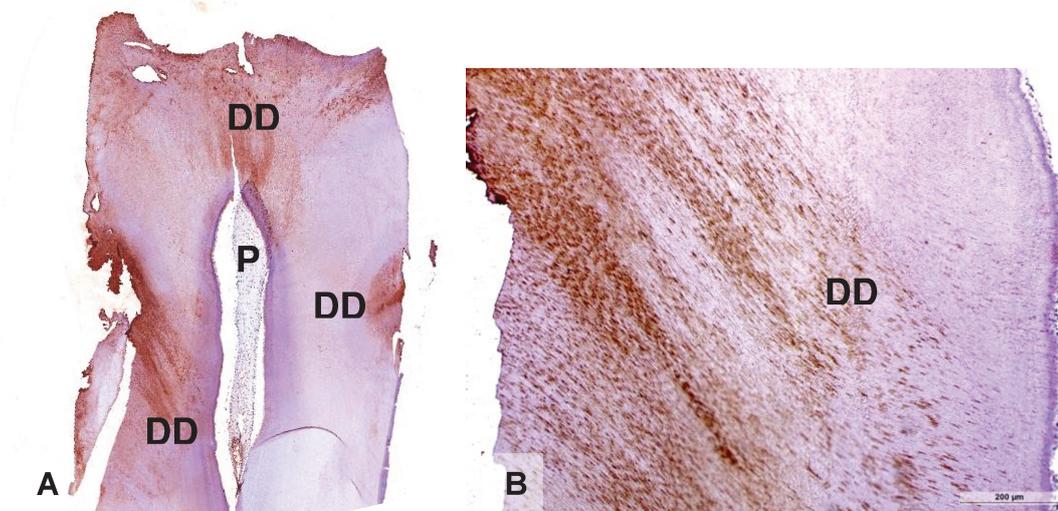
O resumo dos resultados referentes à análise imunoistoquímica anti-MMP-20 está apresentada na Tabela 14. Imagens ilustrativas deste experimento estão apresentados nas Figuras 17 e 18. Nenhum dos resultados obtidos nesta análise foi estatisticamente significativo quando se comparou espécimes irradiados e não irradiados.

**Tabela 14.** Análise imunoistoquímica anti-MMP-20.

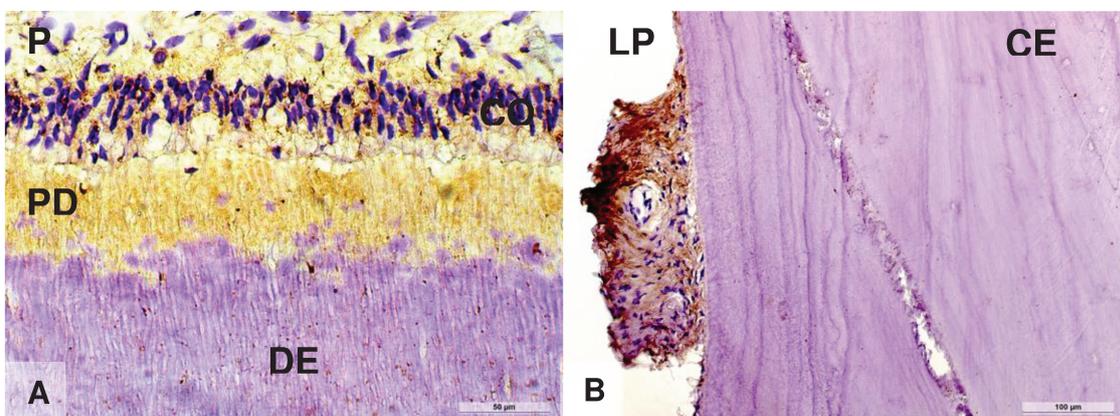
	<b>Irradiados (n=8)</b>	<b>Não irradiados (n=8)</b>	<b>P*</b>
<b>JAD</b>	8/8 (100%)	8/8 (100%)	NA
<b>Cárie</b>	8/8 (100%)	5/7 (71,4%)	0,200
<b>Dentina não cariada</b>	8/8 (100%)	8/8 (100%)	NA
<b>Dentina terciária</b>	1/4 (25%)	4/5 (80%)	0,206
<b>Pré-dentina</b>	3/6 (50%)	4/7 (57,1%)	1,000
<b>Camada odontoblástica</b>	5/5 (100%)	4/6 (66,7%)	0,454
<b>Polpa (MEC)</b>	3/5 (60%)	3/5 (60%)	1,000
<b>Cimento</b>	5/8 (62,5%)	4/8 (50%)	1,000
<b>Ligamento</b>	8/8 (100%)	8/8 (100%)	NA

MEC = matriz extracelular, NA=não avaliado.

\*Valor de *p* referente a comparação da positividade de marcação entre as amostras irradiadas e não irradiadas.



**Figura 17.** Imagem de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando análise imunoistoquímica para MMP-20 de espécime afetado por CRR. **A.** Nota-se intensa marcação nas zonas correspondentes aos fronts de desmineralização das cáries incisal e cervical (4X). **B.** Maior aumento evidenciando intensa marcação no interior dos túbulos dentinários. DD = Dentina desmineralizada; P = Polpa.



**Figura 18.** Imagem de microscopia de luz óptica de campo claro mostrando análise imunoistoquímica para MMP-20 de espécime irradiado. **A.** Intenso padrão de marcação ao longo da camada odontoblástica e pré-dentina. **B.** Forte marcação em remanescente de ligamento periodontal aderido à superfície externa do cimento radicular. DE = Dentina; PD = Pré-dentina; P = Polpa; CO = Camada Odontoblástica; LP = Ligamento Periodontal; CE = Cimento.



## 6 DISCUSSÃO

O CCP é considerado a sexta neoplasia maligna mais comum na maior parte do mundo. No contexto do CCP, os tumores malignos afetando a cavidade bucal são os mais frequentes, seguidos pela laringe e nasofaringe. Aproximadamente 90% destas lesões correspondem à variante histológica CEC e os hábitos relacionados ao estilo de vida dos pacientes, como tabagismo e etilismo, são os agentes etiológicos mais relevantes (Scully e Felix, 2006; Warnakulasuriya et al., 2007). O perfil de pacientes mais acometidos pelo CCP encontra-se em níveis socioeconômicos mais baixos, sendo os adultos entre a 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> décadas de vida e do gênero masculino os mais comumente afetados. Outro importante fator relacionado aos CECs de cabeça e pescoço, cujo impacto prognóstico se torna de notório interesse, é que essas neoplasias são diagnosticadas predominantemente em estágios clínicos avançados (estágios III e IV) (Scully e Felix, 2006; Warnakulasuriya et al., 2007).

Os pacientes analisados nesta dissertação apresentaram perfil clínico e epidemiológico semelhantes ao observado em estudos de diferentes regiões do mundo (Scully e Felix, 2006; Kowalski et al., 2005). A média geral de idade, incluindo os dois grupos experimentais analisados, foi de 57 anos e 16 (72,7%) pertencem a pacientes do gênero masculino. Do total de 22 pacientes, 16 (72,7%) e 17 (77,3%) foram etilistas e tabagistas durante alguma etapa da vida, respectivamente. Dezoito (81,8%) casos correspondiam a CECs primários de cabeça e pescoço, e o sítio anatômico mais comum foi a cavidade bucal com 10 (45,5%) casos, seguido pela orofaringe com 6 (27,3%) casos. Quinze (68,2%) casos apresentavam-se em estágios clínicos avançados III e IV.

Evidências científicas confirmam a impressão clínica já estabelecida de que pacientes com CCP possuem saúde bucal deficiente previamente ao diagnóstico e ao tratamento dos tumores. Esse fato se deve, principalmente, ao baixo nível socioeconômico e cultural dos pacientes somado aos hábitos de tabagismo e alcoolismo a longo prazo, que geram descaso com a saúde da

boca (Lockhart e Clark et al., 1994; Bonan et al., 2006; Jham et al., 2007). A título de exemplo, dois estudos envolvendo indivíduos brasileiros revelaram que 12-46% dos pacientes com CCP avaliados previamente ao início do tratamento radioterápico apresentavam cáries, 41-93% doença periodontal, 21% apresentavam uma ou mais raízes residuais e 91% mostravam falhas nas restaurações dentais. Além disso, 50-82% dos pacientes necessitaram de exodontias antes do início da RDT, com uma média de 8,6-11 dentes extraídos por paciente. Tratamento restaurador e periodontal também foram demandados para a maior parte dos pacientes, assim como protocolos de instruções de higiene oral e uso de fluoretos tópicos (Bonan et al., 2006; Jham et al., 2007).

Existem evidências clínicas de que o risco ao desenvolvimento de CRR, após o tratamento por RDT, é permanente e segue por toda vida do paciente (Hong et al., 2010). Em termos epidemiológicos, estudos brasileiros encontraram uma taxa de 11% de pacientes que desenvolveram CRR após a conclusão do tratamento radioterápico em um tempo médio de 1,38 anos após esse evento (Jham et al., 2007). Nos casos analisados nesta pesquisa, o tempo médio transcorrido entre a conclusão da RDT e as extrações foi de 10 meses, variando entre 3 e 21 meses. Esses dados sugerem que mesmo pacientes que receberam adequação odontológica previamente ao tratamento oncológico continuam em alto risco para desenvolvimento de CRR e progressão de doença periodontal, as principais causas de indicação de exodontia após à RDT. Além disso, a variação na duração de tempo entre o término da RDT e as exodontias realizadas confirma que o risco para desenvolvimento de CRR é potencialmente permanente. No entanto, nenhum estudo mostrou até o momento efetivamente o tempo real de progressão das CRR.

As lesões de CRR são caracterizadas por acometer principalmente as faces lisas vestibulares e linguais, principalmente na região cervical e incisal dos dentes anteriores, zonas que normalmente são menos comumente acometidas por cáries devido ao efeito da autolimpeza das mucosas e da língua em conjunto com o alto fluxo salivar na região. Nos estágios seguintes ao início da desmineralização, um aspecto marcante das CRR é a alteração no padrão de translucidez do esmalte e o desenvolvimento de pigmentações

acastanhadas em toda extensão das lesões de cárie e lesões incipientes de esmalte (Kielbassa et al., 2006; Silva et al., 2009). Esse quadro, porém, pode se estender ou progredir rapidamente até que os dentes posteriores e toda dentição sejam acometidos. As CRRs, não raramente, quando não tratadas, progridem para completa amputação das coroas dentárias que se tornam altamente fragilizadas conforme o tempo.

Na presente amostra, a maior parte dos dentes irradiados analisados eram anteriores incluindo incisivos e caninos superiores e inferiores. CRR afetando as regiões cervicais, incisais e oclusais estiveram presentes na maior parte dos espécimes e pigmentações acastanhadas estavam presentes em mais da metade dos dentes analisados. Dentro dessa perspectiva, esses aspectos reforçam a maior susceptibilidade dessas áreas ao desenvolvimento de CRR e a natureza agressiva dessas cáries, ainda pouco compreendida.

Do ponto de vista clínico, os efeitos da radiação sobre os dentes são notoriamente um problema devido ao impacto negativo nas funções mastigatórias e na qualidade de vida dos pacientes afetados pelas CRRs, que quando instaladas tornam-se um problema de difícil manejo (Kielbassa et al., 2006). Apesar disso, as reais causas e os principais meios de prevenção ou tratamento da CRR continuam incertos e são focos de interesse científico.

Dois teorias básicas se concentram em explicar a origem da CRR. A primeira defende a hipótese que a CRR é decorrentes dos efeitos radiogênicos diretos sobre a estrutura dentária, sugerindo que os dentes incluídos nos campos de radiação sofrem prejuízo que predisporia ao início e progressão das CRRs, em mecanismos aos conhecidos para osteorradionecrose e hipossalivação. A segunda linha de pensamento sugere que dos efeitos indiretos da RDT aos dentes, conferidos pela hipossalivação, alterações qualitativas salivares (alterações na microbiota bucal) e os hábitos deficientes de dieta e higiene bucal são os responsáveis pelo desenvolvimento da CRR, em mecanismo semelhante ao das cáries em geral. Por consequência desta controvérsia, diversos estudos utilizando diferentes metodologias (*in vitro* e *in situ*) e modelos experimentais, obstinadamente, tentaram entender ou apontar os reais efeitos da radiação sobre a estrutura dentária e correlacionar

esses resultados com a predisposição dos dentes ao desenvolvimento de CRR sem, contudo, atingir resultados universalmente aceitos (Al-Nawas et al., 2000; Açil et al., 2005; Springer et al., 2005; McGuire et al., 2014; Silva et al., 2009; Silva et al., 2010).

Em se tratando das propriedades mecânicas dos tecidos dentários, Jansma et al., (1988) encontraram uma solubilidade mineral aumentada e resistência diminuída do esmalte quando irradiado *in vitro*. Além disso, as propriedades biomecânicas mostraram-se mais afetadas e reduzidas (Joyston-Bechal, 1985; Al-Nawas et al., 2000; Fränzel et al., 2006; Fränzel et al., 2009; Soares et al., 2010). Esta evidência, porém, foi questionada por outros dois estudos que mostraram, também em modelos *in vitro*, que o esmalte não se apresentava menos resistente e que os tecidos dentários mineralizados não seriam mais susceptíveis à cárie em comparação a dentes não irradiados (Kielbassa et al., 2000; Kielbassa et al., 2002).

Outro ponto importante, referindo-se mais especificamente a possíveis efeitos radiogênicos sobre a JAD, sugere que a distinta propensão a fraturas do esmalte dentário (Gernhardt et al., 2001; Kielbassa et al., 2002; Fränzel et al., 2009) e sua instabilidade pós-RDT (Jansma et al., 1993; Grotz et al., 1998; Al-Nawas et al., 2000; Kielbassa et al., 2002; Fränzel et al., 2006; Fränzel et al., 2009; Soares et al., 2010) são consequências da radiação sobre os componentes orgânicos da JAD que reduziriam o potencial de ancoragem entre o esmalte e a dentina, permitindo a exposição da dentina subjacente, colonização de bactérias cariogênicas da microbiota bucal e consequente desmineralização (Pioch et al., 1992; Grotz et al., 1998). Alguns estudos *in vitro*, inclusive, revelaram que a JAD de dentes irradiados mostraram-se difusas, danificadas e instáveis (Pioch et al., 1992; Grotz et al., 1998, El-Faramawy et al., 2013). Em contraste com estas observações, as avaliações micromorfológicas do presente estudo revelaram que o padrão da JAD dos dentes irradiados *in vivo* manteve-se preservado em comparação aos dentes não irradiados, mostrando suas características normais de festonamento, além da alta preservação morfológica dos componentes constitutivos do esmalte que incluem as lamelas, os fusos e os tufos do esmalte, que desempenham papel

central na capacidade de microembricamento mecânico e resistência entre o esmalte e a dentina.

Diferenças também foram encontradas no comportamento da desmineralização do esmalte irradiado. O esmalte irradiado mostrou-se mais vulnerável ao pH ácido do que o esmalte não irradiado (Grotz et al., 1998). Apesar disso, outros estudos utilizando dentes humanos e bovinos contradizem estas observações. Eles concluem que o esmalte irradiado não é mais susceptível à desmineralização do que o esmalte não irradiado (Joyston-Bechal, 1985; Kielbassa et al., 2006). E que a mesma quantidade de perda mineral e profundidade das lesões cariosas podem ser verificadas em ambos os grupos (Kielbassa et al., 2000). As amostras avaliadas nesta dissertação, em sua totalidade, mostraram padrões histológicos de desmineralização e progressão das CRRs semelhantes em ambos os subgrupos de dentes irradiados e não irradiados, favorecendo a prerrogativa de que os eventos referentes à desmineralização dos dentes irradiados, tanto em esmalte quanto em dentina, seguem o mesmo padrão das cáries convencionais e, portanto, não podem explicar o comportamento clínico notoriamente rampante desta doença.

Quando analisada a resposta do complexo dentino-pulpar à radiação, alguns estudos mostraram uma diminuição dramática da microdureza em relação à dentina não irradiada (Kielbassa et al., 1997; Kielbassa et al., 1998; Kielbassa et al., 2002). Um estudo *in vivo* concluiu ser possível observar obliteração dos túbulos dentinários, precedida por uma degeneração dos processos odontoblásticos pós-RDT (Grotz et al., 1997) e outros estudos refutaram esses resultados ao detectar formação normal de dentina reacional e esclerose intra-tubular, sugerindo que a atividade dos odontoblastos se mantém normal frente aos estímulos cariogênicos da CRR (Anneroth et al., 1985, Silva et al., 2009).

Springer et al. (2005), avaliaram terceiros molares extraídos e irradiados *in vitro* até 31,5 Gy. Em suas análises não observou indícios de destruição da matriz de colágeno, morfologicamente detectáveis. Os resultados do presente trabalho de pesquisa corroboram com essa perspectiva, à medida

que os padrões de resposta dentinária à cárie puderam ser observados nos espécimes irradiados, confirmando a manutenção da capacidade de reação dos odontoblastos mesmo após a radiação, além da preservação dos componentes micromorfológicos dentários.

Apesar disso, o estudo de Springer et al. (2005) identificou alterações evidentes na matriz extracelular das polpas irradiadas *in vitro*, observadas pela diminuição na quantidade de colágeno disponível. Adicionalmente, estudos baseados em experimentação animal evidenciaram alterações pulpares relacionadas à radiação, incluindo degenerações fibróticas e inflamatórias (Kalnis et al., 1954; Meyer et al., 1962). Contudo, Hutton et al., (1974), Vier-Pelisser et al., (2007) e um estudo piloto recente de nossa equipe de pesquisadores não encontraram alterações morfológicas ou imunoistoquímicas nos componentes pulpares após RDT *in vivo* que mostram ampla preservação das características morfológicas das polpas dos dentes irradiados (Faria et al., 2013). De modo semelhante, os resultados apresentados neste estudo não encontraram alterações na vascularização, na inervação ou MEC da polpa de dentes de pacientes irradiados durante o tratamento do CCP, quando comparados a dentes não irradiados.

Fränzel et al., (2009) demonstraram que as propriedades mecânicas do esmalte e da dentina, principalmente do esmalte dentário, estariam fortemente alteradas em doses acima de 60 Gy quando comparadas a dentes não irradiados, apresentando diminuição da resistência. Outro estudo que reforça essa teoria foi conduzido por Walker et al. (2011), mostrando que doses abaixo de 30 Gy causariam mínimo dano à estrutura dentária, doses entre 30-60 Gy aumentariam duas ou três vezes o risco de dano, e que doses acima de 60 Gy estariam relacionadas a um risco até dez vezes maior de dano direto aos dentes. Considerando as amostras avaliadas nesta dissertação, embora não tenha sido possível realizar um estudo dosimétrico individual para cada um dos espécimes, todos os dentes estavam dentro do campo de radiação cujas doses totais estavam quase que invariavelmente acima dos 60 Gy. Em outras palavras, a maior parcela das amostras aqui avaliadas receberam diretamente altas doses de radiação.

Adicionalmente, em 2011, Gomez et al. revelaram, em um estudo retrospectivo, que o índice de CRR está diretamente relacionado à dose de radiação aplicada sobre as glândulas salivares. Um estudo mais recente reforçou esta evidência, mostrando uma correlação entre maiores doses de radiação nas glândulas parótidas, menor fluxo salivar e um maior risco de cárie (Hey et al., 2013). Este último estudo revela que doses até 20 Gy, em planejamentos radioterápicos que poupam ao máximo a inclusão das parótidas nos campos de radiação, são consideradas de menor risco para CRR e requerem protocolos de tratamento e prevenção menos invasivos do que comparadas a doses acima desse patamar, cujo curso clínico está atrelado ao acometimento avançado da dentição por lesões de CRR. Ambos os estudos corroboram para o pensamento de que a CRR deveria ser predominantemente atribuída aos efeitos indiretos da RDT sobre o esmalte e a dentina, causados por alterações salivares. O fato do estudo aqui discutido ter falhado ao encontrar evidência de destruição radiogênica direta em esmalte, dentina e polpa, reforça a hipótese dos efeitos indiretos da RDT sobre os dentes, em detrimento à teoria dos efeitos diretos, na etiologia principal da CRR.

Recentemente, o tratamento de malignidades na região de cabeça e pescoço nos grandes centros mundiais tem utilizado a técnica da IMRT, ao invés dos planejamentos convencionais ou conformacionais 3D. Com esta técnica de RDT, o alvo principal recebe o valor total da radiação necessária para o tratamento, enquanto que a dose para as demais estruturas e órgãos adjacentes saudáveis é restringida (Jonhston et al., 2011; Nutting et al., 2011). Com a IMRT, é possível reduzir a quantidade de irradiação das parótidas para um máximo de 24-26 Gy, reduzindo consideravelmente a incidência de hipossalivação nesses pacientes (Seikaly et al., 2004). Doses de 25-40 Gy parecem gerar danos irreversíveis às glândulas salivares (Eisbruch et al., 1999; Roesink et al., 2001; Walker et al., 2001). Embora este método tenha grandes vantagens, é considerado de alto custo no Brasil e por isso uma quantidade significativa de pacientes tratados em países em desenvolvimento ou hospitais de menor porte ainda é tratada pelas técnicas menos sofisticadas. Acresce mencionar que ainda não existem estratégias para que os planejamentos de

RDT direcionados para o CCP diminuem a dose de radiação para os dentes, nem mesmo no contexto da IMRT.

No que diz respeito à composição morfológica dos tecidos dentários, a dentina é um tecido mineralizado, que possui aproximadamente 30% de matriz orgânica em volume, contendo 90% de colágeno e 10% de proteínas não colágenas. No desenvolvimento da cárie, a parte mineral da dentina dissolve-se, expondo a matriz orgânica à decomposição enzimática. A seguir à dissolução da hidroxiapatita, a parte orgânica da dentina composta por uma rede de colágeno torna-se exposta à degradação enzimática. Apesar de, tradicionalmente, se pensar que enzimas produzidas por bactérias cariogênicas seriam as responsáveis pela destruição da matriz orgânica dentinária, estudos *in situ* e *in vitro* tem questionado o papel dessas moléculas no processo de desmineralização (Van Strijp et al., 1994; Kawasaki e Featherstone, 1997).

Alguns estudos *in vitro* demonstraram que, no pH neutro, estas enzimas foram capazes de clivar tanto moléculas de colágenos quanto proteínas não-colágenas da dentina cariada (Goldberg e Keil , 1989; Nyvad e Fejerskov, 1990). No entanto, outras experiências *in vitro* demonstraram que bactérias cariogênicas foram capazes de causar a desmineralização somente da superfície de dentina e que, depois do desafio ácido, elas demonstraram atividade proteolítica fraca, e incapaz de digerir a matriz de colágeno (Van Strijp et al., 1994). O fato das colagenases bacterianas não resistirem à acidificação do meio (pH 4,3) durante a fase de desmineralização (Kawasaki e Featherstone, 1997) sugere que a contribuição destas enzimas na degradação da matriz orgânica dentária pode ser menos importante do que se pensava inicialmente. Isto implica que enzimas proteolíticas derivadas do hospedeiro, como as MMPs localizadas tanto na dentina quanto na saliva, podem ter um papel importante na degradação da matriz orgânica da dentina durante o início e a progressão da cárie (Dung et al., 1995). Não por acaso, a presença e a atividade de algumas MMPs, como as MMP-2, MMP-8, e MMP-9, foram identificadas em lesões desmineralizadas de dentina por diferentes métodos (Tjäderhane et al., 1998). Estas evidências valorizam o desenho e as estratégias de investigação de dentes irradiados aqui apresentada.

A expressão das MMPs nas zonas de cárie dos espécimes analisados confirmou que essas enzimas possuem um provável papel importante na degradação da matriz orgânica dentinária, podendo ser essencial para a progressão da cárie. Apesar, deste estudo ser limitado em quantificar as MMPs identificadas e o nível de atuação das enzimas, os resultados para CRR e dentina irradiada são compatíveis com estudos que correlacionam a atividades das MMPs com a progressão de cáries convencionais (Tjäderhane et al., 1998; Sulkala et al., 2002; Chaussain Miller et al., 2006). Outro ponto relevante a ser considerado é que a presença de marcação para as MMPs analisadas em componentes morfológicos das amostras avaliadas, como JAD, pré-dentina, dentina e cementócitos sugere que essas moléculas estão envolvidas em outros processos fisiopatológicos e essas podem inclusive serem recrutadas ou ativadas mediante estímulos ainda pouco conhecidos.

Justificando e valorizando a proposta do presente estudo, evidências recentes mostraram que a RDT, por meio de suas ações diretas, é capaz de regular e ativar MMPs nos pulmões e no cérebro (Araya et al., 2001; Zhai et al., 2006; Gogineni et al., 2009; Lee et al., 2010). Estes estudos mostraram aumento da expressão de gelatinases e aumento da atividade gelatinolítica em diferentes tecidos. Dessa forma, também poderia ser possível que a RDT pudesse aumentar a expressão de MMPs produzidas pelos odontoblastos ou ativá-las dentro da matriz dentinária causando degradação da trama de fibras colágenas presentes na JAD e na dentina, o que contribuiria para a fratura do esmalte e colapso estrutural. Ou seja, é oportuno compreender se a ação direta da RDT poderia ativar as MMPs constitutivas da dentina e participar do início ou da progressão da CRR.

Várias MMPs, incluindo MMP-2 e MMP-9, foram identificadas em dentina amolecida cariada por análises de Western blot e zimografia. E as gelatinases foram detectadas em ambas as suas formas latente e ativa (Tjäderhane et al., 1998). Entretanto, o presente estudo parece ser o primeiro a descrever a presença das gelatinases MMP-2 e MMP-9 e da atividade gelatinolítica por meio da ZIS em dentes irradiados, tentando compreender seu papel na CRR. Apesar da ausência de resultados estatísticos significantes em

indicar uma maior expressão dessas enzimas nos espécimes irradiados, pode-se notar a manutenção da expressão dessas MMPs nos componentes morfológicos dentários e nas zonas de cárie mesmo após a RDT.

A MMP-20, considerada uma enamelinina, foi observada por análise imunistoquímica no interior de túbulos dentinários dilatados afetados por cárie, embora nenhuma reatividade pudesse ser detectada por Western blot (Sulkala et al., 2002). Estes autores concluíram que a MMP-20, produzida durante os estágios iniciais da dentinogênese pelo complexo dentino-pulpar, encontra-se incorporada à dentina, embora possa ser liberada e possivelmente ativada durante a progressão da cárie. De modo que a alta expressão de MMP-20 nos túbulos dentinários adjacentes às zonas de desmineralização da CRR nos espécimes de ambos os grupos avaliados neste trabalho de pesquisa confirma essa evidência de que a MMP-20, apesar do seu papel importante durante a dentinogênese, pode ser um importante componente na ativação de outras MMPs ou na própria degradação enzimática da matriz orgânica dentinária em cáries convencionais e na CRR.

Diferente dos resultados aqui apresentados, um estudo recente revelou que extratos obtidos de dentes provenientes de pacientes com câncer bucal que receberam doses acima de 70 Gy continham relativamente maior quantidade de MMP-20, nas formas de 24 e 22 kDa, do que dos dentes do grupo controle. Este estudo recentemente publicado também concluiu que a MMP-20 é resistente à radiação e especulou que ela poderia ser responsável por parte da catalisação e degradação da matriz orgânica nos sítios de cárie, levando à delaminação do esmalte observada clinicamente nos casos de CRRs (McGuire et al., 2014).

Finalmente, é oportuno mencionar que a doença cárie, considerada de natureza multifatorial, depende de uma série de fatores que incluem o meio bucal, a susceptibilidade do hospedeiro, a dieta e o tempo no qual os fatores atuam nesse processo. Neste sentido, o desenvolvimento da CRR também parece estar predominantemente associado às modificações na quantidade e na composição salivar, bem como do agregado de sintomas bucais dos pacientes com CCP pós-RDT que incluem alterações na dieta, nos hábitos de

higiene bucal (já limitados por natureza) e nas toxicidades agudas e crônicas que geram um ambiente extremamente cariogênico e contribuem para o comportamento agressivo da CRR.

Em suma, de acordo com os resultados dos experimentos realizados neste estudo, os padrões micromorfológicos, a atividade gelatinolítica e a expressão imunistoquímica das MMPs 2, 9 e 20 são semelhantes entre dentes irradiados *in vivo* e dentes não irradiados. A hipótese nula teste desta dissertação não foi rejeitada, sugerindo que a ação direta da RDT não é capaz de gerar destruição radiogênica da matriz inorgânica ou alterações qualitativas na matriz orgânica dos dentes de pacientes com CCP. Contudo, outros estudos nesse sentido são necessários para a completa compreensão das causas para o padrão peculiar de progressão das CRRs e potenciais efeitos da radiação na estrutura dentária.



## **7 CONCLUSÃO**

1. Os efeitos diretos da RDT não foram capazes de alterar os componentes micromorfológicos estruturais do esmalte, da JAD, da dentina, da polpa, do cemento, do ligamento periodontal ou dos padrões de desmineralização da cárie;
2. Os efeitos diretos da RDT não foram capazes de alterar a atividade gelatinolítica da dentina ou de seus componentes micromorfológicos;
3. Os efeitos diretos da RDT não foram capazes de alterar a expressão imunistoquímica de MMP-2, MMP-9 ou MMP-20 na JAD, dentina, polpa, cemento, ligamento periodontal ou dentina desmineralizada.



## REFERÊNCIAS\*

Açil Y, Mobasser AE, Warnke PH, Terheyden H, Wiltfang J, Springer J. Detection of Mature Collagen in Human Dental Enamel. *Calcif Tissue Int.* 2005; 76 (2): 121–26.

Al-Nawas B, Grotz KA, Rose E, Duschner H, Kann P, Wagner W. Using ultrasound transmission velocity to analyse the mechanical properties of teeth after in vitro, in situ, and in vivo irradiation. *Clin Oral Invest.* 2000; 4 (3): 168–72.

Anneroth G, Holm LE, Karlsson G. The effect of radiation on teeth. A clinical, histologic and microradiographic study. *Int J Oral Surg.* 1985; 14 (3): 269–74.

Araya J, Maruyama M, Sassa K, et al. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 production in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280 (1): 30-8.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008; 371 (9625): 1695-709.

Bensadoun RJ, Riesenbeck D, Lockhart PB, Elting LS, Spijkervet FK, Brennan MT. A systematic review of trismus induced by cancer therapies in head and neck cancer patients. *Support Care Cancer.* 2010; 18 (8): 1033–38.

Beumer J, Curtis T, Harrison R. Radiation therapy of the oral cavity: sequelae and management, part 1. *Head Neck Surg.* 1979; 1 (4): 301–12.

\*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do Internacional Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4 (2): 197–250.

Bonan PRF, Lopes MA, Pires FR, Almeida OPD. Dental management of low socioeconomic level patients before radiotherapy of the head and neck with special emphasis on the prevention of osteoradionecrosis. *Braz Dent J.* 2006; 17 (4): 336–342.

Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrixmetalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol.* 2008; 53 (2): 109–116.

Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Int J Oral Sci.* 2011a; 3 (4): 192–99.

Boushell LW, Nagaoka H, Nagaoka H, Yamauchi M. Increased matrix metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. *Caries Res.* 2011b; 45 (5): 453–9.

Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, Pashley DH. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent.* 2009; 34 (4): 379–83.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Brener S, Franca AJ, Barbosa AA, Grandinetti HAM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007; 53 (1): 63–9.

Bucheler BM, Ehnes A, Kavsadze M, Langenberg S, Wilhelm-Buchstab T, Zipfel M, et al. Quality of life after treatment of head and neck tumors: Longitudinal comparison after operation and adjuvant radio(chemo)therapy. *HNO*. 2012; 60 (12): 1053–9.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *Journal of Dental Research*. 2006; 85 (1): 22–32.

Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol*. 2007; 152 (2): 189–205.

Cooper JS, Porter K, Mallin K, et al. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck*. 2009; 31 (6): 748–58.

Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol*. 2004; 73 (2): 119–31.

Denham JW, Peters LJ, Johansen J, et al. Do acute mucosal reactions lead to consequential late reactions in patients with head and neck cancer? *Radiother Oncol*. 1999; 52 (2): 157–64.

Denham JW, Steigler A, Kilmurray J, Wratten C, Burmeister B, Lamb DS, et al. Relapse patterns after chemo-radiation for carcinoma of the oesophagus. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2003; 15 (3): 98–108.

Dörr W, Hamilton CS, Boyd T, Reed B, Denham JW. Radiation-induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002; 52 (4): 911–17.

Dreyer JO, Sakuma Y, Seifert G. Die Strahlen-Sialadenitis. Stadieneinteilung und Immunhistologie *Pathologie*. 1989; 10 (3): 165–70.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007; 356 (19): 1944–56.

Dung SZ, Gregory RL, Li Y, Stookey GK. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries Res*. 1995; 29 (6): 483–9.

Duvvuri U, Myers JN. Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide. *Curr Probl Surg*. 2009; 46 (2): 114–7.

Eisbruch A, Ten Haken RK, Kim HM, et al. Dose, volume, and function relationships in parotid salivary glands following conformal and intensity-modulated irradiation of head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999; 45 (3): 577–87.

El-Faramawy N, Ameen R, El-Haddad K, El-Zainy M. Effects of gamma radiation on hard dental tissues of albino rats: investigation by light microscopy. *Radiat Environ Biophys*. 2013; 52 (3): 375–87.

Farias KM. Avaliação dos efeitos diretos da radioterapia sobre a microvascularização, a inervação e a matriz extracelular da polpa dental de pacientes oncológicos [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2013.

Farias KM, Brandão TB, Ribeiro ACP, Vasconcellos AF, Carvalho IT, Arruda FF, et al. Micromorphology of the dental pulp is highly preserved in cancer patients who have undergone head and neck radiotherapy. *J of Endod* (Accepted for publication, 2014).

Ferraris MEG, Muñoz AC. *Histologia e embriologia bucodental*. São Paulo: Editora Guanabara Koogan; 2006.

Frank RM, Herdly J, Philippe E. Acquired dental defects and salivary gland lesions after irradiation for carcinoma. *J Am Dent Assoc*. 1965; 70: 868–83.

Fränzel W, Gerlach R, Hein HJ, Schaller HG. Effect of tumour therapeutic irradiation on the mechanical properties of teeth tissue. *Z Med Phys*. 2006; 16 (2): 148–54.

Fränzel W, Gerlach R. The irradiation action on human dental tissue by X-rays and electrons a nanoindenter study. *Z Med Phys*. 2009; 19 (1): 5–10.

Galetti R, Santos-Silva AR, Antunes A, Alves FA, Lopes MA, Goes MF. Radiotherapy does not impair dentin adhesive properties in head and neck cancer patients. *Clin Oral Invest*. 2013. (Accepted for publication, 2013).

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinic Diagn Lab Immunol*. 1999; 6 (3): 437–439.

Gernhardt CR, Kielbassa AM, Hahn P, Schaller HG. Tensile bond strengths of four different dentin adhesives on irradiated and non-irradiated human dentin in vitro. *J Oral Rehabil.* 2001; 28 (9): 814–20.

Gogineni VR, Kargiotis O, Klopfenstein JD, et al. RNAi-mediated downregulation of radiation-induced MMP-9 leads to apoptosis via activation of ERK and Akt in IOMM-Lee cells. *Int J Oncol.* 2009; 34 (1): 209–18.

Goldberg M, Keil B. Action of a bacterial *Achromobacter* collagenase on the soft carious dentine: An in vitro study with the scanning electron microscope. *J Biol Buccale.* 1989; 17 (4): 269–274.

Gomez DR, Estilo CL, Wolden SL, Zelefsky MJ, Kraus DH, Wong RJ, et al. Correlation of osteoradionecrosis and dental events with dosimetric parameters in intensity-modulated radiation therapy for head and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 81 (4): 207–13.

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc natl acad sci.* 1962; 48 (6):1014–22.

Grotz KA, Duschner H, Kutzner J, et al. Neue Erkenntnisse zur Ätiologie der sogenannten Strahlenkaries. *Strahlenther Onkol.* 1997; 173 (12): 668–76.

Grotz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W. Histographic study of the direct effects of radiation on dental enamel. *Mund Kiefer Gesichts Chir.* 1998; 2 (2): 85–90.

Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110 (5): 353–7.

Hancock PJ, Epstein JB, Sadler GR. Oral and dental management related to radiation therapy for head and neck cancer. *J Can Dent Assoc.* 2003; 69 (9): 585–90.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65 (1): 1–13.

Hao JL, Nagano T, Nakamura M, Kumagai N, Mishima H, Nishida T. Galardin inhibits collagen degradation by rabbit keratocytes by inhibiting the activation of pro-matrix metalloproteinases. *Exp Eye Res.* 1999; 68 (5): 565–572.

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18 (2): 541–50.

Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res.* 1995; 74 (5): 1226–34.

Hey J, Seidel J, Schweyen R, Paelecke-Habermann Y, Vordermark D, Gernhardt C, Kuhnt T. The influence of parotid gland sparing on radiation damages of dental hard tissues. *Clin Oral Investig.* 2013; 17 (6): 1619–1625.

Hong CH, Napeñas JJ, Hodgson BD, et al. A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. *Support Care Cancer.* 2010; 18(8): 1007–21.

Hu JY, Chen XC, Li YQ, Smales RJ, Yip KH. Radiation-induced root surface caries restored with glass ionomer cement placed in conventional and ART cavity preparations: Results at two years. *Aust Dent J.* 2005; 50 (3): 186–90.

Hu JY, Li Q, Smales RJ, Yip KH. Restoration of teeth with more-viscous glass ionomer cements following radiation-induced caries. *Int Dent J.* 2002; 52 (6): 445–8.

Huber MA, Terezhalmay GT. The head and neck radiation oncology patient. *Quintessence Int.* 2003; 34 (9): 693–717.

Hutton MF, Patterson SS, Mitchell DF, Chalian VA, Hornback NB. The effect of cobalt-60 radiation on the dental pulps of monkeys. *Cancer.* 1974; 42 (6): 2581–90.

Jansma J, Vissink A, Jongebloed WL, et al. Natural and induced radiation caries. A SEM study. *Am J Dent.* 1993; 6 (3): 130–6.

Jham BC, Reis PM, Miranda EL, et al. Oral health status of 207 head and neck cancer patients before, during and after radiotherapy. *Clin Oral Investig.* 2008; 12 (1): 19–24.

Jensen SB, Pedersen AML, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, 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.* 2010; 18 (8): 1039–60.

Jonhston M, Clifford S, Bromley R, Back M, Oliver L, Eade T. Volumetric-modulated arc therapy in head and neck radiotherapy: a planning comparison using simultaneous integrated boost for nasopharynx and oropharynx carcinoma. *Clin Oncol.* 2011; 23 (8): 503–11.

Jongebloed WL, Gravenmade EJ, Retief DH. Radiation caries. A review and SEM study. Am J Dent. 1988; 1 (4): 139–46.

Joyston-Bechal S. The effect of X-radiation on the susceptibility of enamel to an artificial caries-like attack in vitro. J Dent. 1985; 13 (1):41–4.

Kalnis V. The indirect effect of X-ray irradiation on the dental pulp of the dog. J Dent Res. 1954; 33 (3): 389–99.

Kataoka SH, Setzer FC, Fregnani ER, Pessoa OF, Gondim E Jr, Caldeira CL. Effects of 3-dimensional conformal or intensity-modulated radiotherapy on dental pulp sensitivity during and after the treatment of oral or oropharyngeal malignancies. J Endod. 2012; 38 (2): 148–52.

Katsura K, Sasai K, Sato K, Saito M, Hoshina H, Hayashi T. Relationship between oral health status and development of osteoradionecrosis of the mandible: A retrospective longitudinal study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 105 (6): 731–8.

Kawasaki K, Featherstone JDB. Effects of collagenase on root demineralization. J Dent Res. 1997; 76 (1): 588–95.

Kielbassa AM, Schilli K. Betreuung des tumortherapeutisch bestrahlten Patienten aus Sicht der Zahnerhaltung. Zahnärztl Mitt. 1997; 87: 2636–47.

Kielbassa AM, Schaller HG, Hellwig E. Qualitative Befunde bei *in situ* erzeugter Initialkaries in tumortherapeutisch bestrahltem Dentin. Eine kombiniert rasterelektronenmikroskopische und mikroradiographische Studie. Acta Med Dent Helv. 1998; 3: 161–168.

Kielbassa AM. *In situ* induced demineralization in irradiated and non-irradiated human dentin. Eur J Oral Sci. 2000; 108 (3): 214–21.

Kielbassa AM, Munz I, Bruggmoser G, Schulte-Mönting J. Effect of demineralization and remineralization on microhardness of irradiated dentin. J Clin Dent. 2001; 13 (3): 104–110.

Kielbassa AM. Die Radiatio im Kopf-/Halsbereich, Auswirkungen auf die Kariesentstehung. In: Kielbassa AM, ed. Strahlentherapie im Kopf- und Halsbereich. Implikationen für Zahnärzte, HNO-Ärzte und Radiotherapeuten. Schlütersche: Hannover, 2004.

Kielbassa AM, Hellwig E, Meyer-Lueckel H. Effects of irradiation on *in situ* remineralization of human and bovine enamel demineralized *in vitro*. Caries Res. 2006; 40: (2) 130–5.

Koga DH, Salvajoli JV, Alves FA. Dental extractions and radiotherapy in head and neck oncology: review of the literature. Oral Dis. 2008; 14 (1): 40–4.

Konings AW, Coppes RP, Vissink A. On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005; 62 (4): 1187–94.

Kowalski LP, Carvalho AL, Priante AVM, Magrin J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2005; 41 (5): 534–41.

Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: importance of zymography. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010; 61 (2): 205–9.

Lee NY, Terezakis SA. Intensity-modulated radiation therapy. *J Surg Oncol*. 2008; 97 (8): 691–6.

Lee WH, Warrington JP, Sonntag WE, Lee YW. Irradiation Alters MMP-2/TIMP-2 System and Collagen Type IV Degradation in Brain. *Int J Radiation Oncol Biol Phys*. 2012; 82 (5): 1559–66.

Lefebvre JL. Laryngeal preservation in head and neck cancer: multidisciplinary approach. *Lancet Oncol*. 2006; 7 (9): 747–55.

Lockhart PB, Clark J. Pretherapy dental status of patients with malignant conditions of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; 77 (3): 236–41.

Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin–dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci*. 2009; 117 (5): 587–96.

Lopes MA, Della Coletta R, Alves FA, Abbade N, Rossi Jr A. Reconhecendo e controlando os efeitos colaterais da radioterapia. *Revista da APCD*. 1998; 52 (3): 241–4.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol*. 2000; 45 (9): 757–65.

Matzinger O, Zouhair A, Mirimanoff RO, Ozsahin M. Radiochemotherapy in locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Oncol*. 2009; 21 (7): 525–31.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res*. 2007; 86 (5): 436–40.

Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: Correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mat Res A*. 2009, 88 (3): 697–703.

McGuire JD, Mousa AA, Zhang BJ, Todoki LS, Huffman NT, Chandrababu KB, et al. Extracts of irradiated human tooth crowns contain MMP-20 protein and activity. *J Dent*. 2014; 42 (5): 626-35.

Meyer I, Shklar G, Turner J. A comparison of the effects of 200 kV radiation and cobalt-60 radiation on the jaws and dental structure of the white rat. A preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1962; 15: 1098-108.

Möller P, Perrier M, Ozsahin M, Monnier P. A prospective study of salivary gland function in patients undergoing radiotherapy for squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97 (2): 173-89.

Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, et al. Localization of MMP-2, MMP-9 TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent*. 2011; 39 (8): 536–42.

Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, Urbano TG, Bhide SA, Clark C, et al. Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2011; 12 (2): 127–36.

Nyvad B, Fejerskov O. Structure of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries. *Caries Res.* 1990; 23 (3): 151–8.

Otmani N. Oral and maxillofacial side effects of radiation therapy on children. *J Can Dent Assoc.* 2007; 73 (3): 257–61.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111 (2): 117–27.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55 (2): 74–108.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83 (3): 216–21.

Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver *Eur J Cancer Prev.* 2008; 17 (4): 340-4.

Pioch T. Veränderungen der Zahnhartsubstanzen. In: Kielbassa AM, ed. *Strahlentherapie im Kopf- und Halsbereich. Implikationen für Zahnärzte, HNO-Ärzte und Radiotherapeuten.* Schlütersche: Hannover, 2004.

Porto IM, Rocha LB, Rossi MA, Gerlach RF. *In situ* zymography and immunolabeling in fixed and decalcified craniofacial tissues. *J Histochem Cytochem* 2009; 57 (7): 615–22.

Silva, ARS. Análise morfológica e conteúdo mineral da cárie de radiação. Estudo por microscopia de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2008.

Silva ARS, Alves FA, Antunes A, et al. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation related caries. *Caries Res.* 2009; 43 (1): 43–9.

Silva ARS, Alves FA, Berger SB, Giannini M, Goes MF, Lopes MA. Radiation-related caries and early restoration failure in head and neck cancer patients. A polarized light microscopy and scanning electron microscopy study. *Support Care Cancer.* 2010; 18(1), 83–87.

Springer IN, Niehoff P, Warnke PH, Bocek G, Kovacs G, Suhr M, et al. Radiation caries-radiogenic destruction of dental collagen. *Oral Oncol.* 2005; 41 (7): 723–8.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology.* 2001; 17: 463–516.

Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 2007; 110 (7): 1429–35.

Sulaiman F, Huryn JM, Zlotolow IM. Dental extractions in the irradiated head and neck patient: A retrospective analysis of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center protocols, criteria, and end results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61 (10): 1123–31.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase- 8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007; 52 (2):121–7.

Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod.* 2006; 32 (9): 862–8.

Tarvainen L, Kyyrönen P, Kauppinen T, Pukkala E. Cancer of the mouth and pharynx, occupation and exposure to chemical agents in Finland. *Int J Cancer.* 2008; 123 (3): 653–9.

Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, et al. Inhibition of MMPs by alcohols. *Dent Mater.* 2010; 27 (9): 926–33.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Research.* 1998; 77 (8): 1622–9.

Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res.* 2001; 15 (1): 55–8.

Toledano M, Nieto-Aguilar R, Osorio R, Campos A, Osorio E, Tay FR, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase- 2 in human coronal and radicular sound and carious dentin. *J Dent.* 2010; 38 (8): 635–40.

Tolentino ES, Centurion BS, Ferreira LHC, Souza AP, Damante JH, Izabel Rubira-Bullen RF. Oral adverse effects of head and neck radiotherapy:care guideline for irradiated patients. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19 (5): 448–54.

Van Strijp AJP, Jansen DC, DeGroot J, Ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res.* 2003; 37 (1): 58–65.

Van Strijp AJP, Van Steenberghe TJM, De Graaff J, Ten Cate JM. Bacterial colonization and degradation of demineralized dentin matrix in situ. *Caries Res.* 1994; 28 (1): 21–7.

Vier-Pelisser FV, Figueiredo MAZ, Cherubini K, Braga-Filho A, Figueiredo JA. The effect of head-fractionated teletherapy on pulp tissue. *Int Endod J.* 2007; 40 (11): 859–65.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circular Research.* 2003; 92(8): 827–39.

Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14 (3): 199-212.

Walker MP, Wichman B, Cheng AL, Coster J, Williams KB. Impact of radiotherapy dose on dentition breakdown in head and neck cancer patient. *Pract Radiat Oncol.* 2011; 1 (3): 142–8.

Warnakulasuriya S, Mak V, Möller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol.* 2007; 43 (10); 982–6.

Wahl MJ. Osteoradionecrosis prevention myths. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 64 (3): 661–9.

Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics. *Cancer.* 1995; 45 (1): 8–30.

Wittekind CH, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH. International Union Against Cancer (UICC): TNM Supplement. A commentary on uniform use. 2nd ed. New York; 2001.

Zhai GG, Malhotra R, Delaney M, et al. Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *J Neurooncol.* 2006; 76 (3): 227–37.



## ANEXO

### Anexo 1 Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da FOP-UNICAMP



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Avaliação das alterações morfológicas, imunoistoquímicas e da atividade gelatinolítica em dentes expostos à radioterapia na região de cabeça e pescoço**", protocolo nº 012/2013, dos pesquisadores Wagner Gomes da Silva e Alan Roger dos Santos Silva, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 14/05/2013.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "**Evaluation of morphological, immunohistochemistry and gelatinolytic activity changes in teeth undergone radiotherapy in head and neck**", register number 012/2013, of Wagner Gomes da Silva and Alan Roger dos Santos Silva, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on May 14, 2013.

**Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

**Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta**  
Coordenadora  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.