

Ana Gabriela Costa Normando

**Biomarcadores na avaliação de mucosite oral em pacientes
com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática**

Brasília
2016

Ana Gabriela Costa Normando

Biomarcadores na avaliação de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

Brasília
2016

À minha família

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Álvaro e Silvânia, por me amarem incondicionalmente, por sempre me apoiarem e por acreditarem em mim quando nem mesmo eu acreditava mais. Vocês são a minha inspiração e o motivo pra eu continuar tentando.

Aos meus irmãos, Thadeu e Ana Luísa, pelos conselhos, cumplicidade e compartilhamento que vocês me proporcionaram. Muito obrigada por todas as lembranças felizes da nossa infância, vocês foram essenciais para o meu crescimento.

Ao meu namorado, Christian, por estar presente em quase todos os momentos do meu dia-a-dia, sendo meu companheiro de vida e de clínica, trazendo alegria aos dias de atendimento. Obrigada por toda a paciência, ajuda e companheirismo ao longo dos anos de UnB.

Aos meus amigos, pelos momentos de alegria vividos, pelos momentos de tristeza compartilhados e pelas memórias dos momentos inesquecíveis que tivemos juntos. Em especial minhas amigas da Turma 62, meus irmãos de intercâmbio da família G1, os “Coleguinhas Felizes” e os amigos da Turma 64.

À minha orientadora, Professora Eliete, que me recebeu de braços abertos quando retornei do intercâmbio, me dando a oportunidade de desenvolver um trabalho de excelência sob sua orientação. Obrigada pelas palavras de incentivo, pela paciência e pela disponibilidade ao longo desses meses.

Ao meu co-orientador, Professor Paulo Tadeu, que me recebeu e me apoiou no CACON, me dando a chance de ver na prática tudo aquilo que eu admirava na teoria. Obrigada por toda a ajuda e por acreditar no meu potencial.

RESUMO

NORMANDO, Ana Gabriela Costa. Biomarcadores na avaliação de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade dos biomarcadores de predizerem o risco de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, assim como avaliar a correlação entre estes biomarcadores e a severidade da mucosite.

Métodos: Foram identificados estudos clínicos relevantes através de pesquisa eletrônica nas seguintes bases de dados: LILACS, PubMed, Science Direct, Scopus e Web of Science. A busca da literatura cinzenta foi realizada no Google Acadêmico, OpenGrey e ProQuest. Foram considerados estudos que avaliaram biomarcadores para predizer o risco de ocorrência de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia ou quimioradioterapia ou para avaliar a severidade da mucosite oral. A qualidade metodológica dos estudos incluídos foi avaliada usando a ferramenta *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument* (MAStARI) e a qualidade de evidência foi avaliada pelo sistema *Grading of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation* (GRADE).

Resultados: De 1.028 citações identificadas, 26 estudos preencheram os critérios de elegibilidade e foram incluídos nesta revisão. No total, foram avaliados 27 tipos de biomarcadores, sendo que os mais frequentes foram o EGF (Fator de Crescimento Epidérmico), a CRP (Proteína C-Reativa), os Polimorfismos Genéticos, o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa) e a ESR (Taxa de Sedimentação de Eritrócitos).

Conclusão: Dosar biomarcadores antes de iniciar a radioterapia é um método promissor para prever o risco de desenvolver mucosite e permite que pacientes radiosensíveis tenham um tratamento personalizado com menores chances de interrupção. Os marcadores inflamatórios CRP e ESR e o fator de crescimento EGF provaram ser mais eficazes em prever o risco de mucosite oral.

ABSTRACT

NORMANDO, Ana Gabriela Costa. Biomarkers in the assessment of oral mucositis in head and neck cancer patients: a systematic review. 2016. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasilia.

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the capability of biomarkers to predict the risk of oral mucositis in head and neck cancer patients, as well as to assess the correlation between these biomarkers and the severity of mucositis.

Methods: Relevant clinical studies were identified through electronic search of the following databases: LILACS, PubMed, Science Direct, Scopus and Web of Science. A search of the grey literature was performed on Google Scholar, OpenGrey and ProQuest. Studies that evaluated biomarkers to predict the risk of occurrence of oral mucositis in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy or chemoradiotherapy or to assess the severity of oral mucositis were considered. The methodological quality of the included studies was assessed using the *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument* (MAStARI) tool and the evidence quality was assessed by the *Grading of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation* (GRADE) system.

Results: Of 1,028 identified citations, 26 studies met the eligibility criteria and were included in this review. In total, 27 types of biomarkers were evaluated, and the most frequent were the EGF (Epidermal Growth Factor), the CRP (C-Reactive Protein), the Genetic Polymorphisms, the TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) and the ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate).

Conclusion: Dosing biomarkers before starting radiation therapy is a promising method to predict the risk of developing mucositis

and allow radiosensitive patients to have a customized treatment that might have less chances of interruption. The inflammatory markers CRP and ESR and the growth factor EGF markers have proven to be more effective in predict the risk of oral mucositis.

SUMÁRIO

Artigo Científico	15
Folha de Título	17
Resumo	19
Abstract	21
Introdução	23
Métodos	25
Resultados	30
Discussão.....	43
Conclusão	49
Referências	50
Anexos	59
Normas da Revista.....	59
Apêndices.....	63
Apêndice 1	63
Apêndice 2	64
Apêndice 3	65
Apêndice 4	67
Apêndice 5	70

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:

NORMANDO, Ana Gabriela; ROCHA, Camila; DE TOLEDO, Isabela *et al.* Biomarcadores na avaliação de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática.

Apresentado sob as normas de publicação da revista International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics

FOLHA DE TÍTULO

Biomarcadores na avaliação de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática

Biomarkers in the assessment of oral mucositis in head and neck cancer patients: a systematic review

Ana Gabriela Costa Normando¹

Camila Lopes Rocha²

Isabela Porto de Toledo³

Paulo Tadeu de Souza Figueiredo⁴

Paula Elaine Diniz dos Reis⁵

Graziela de Luca Canto⁶

Eliete Neves da Silva Guerra⁷

¹ Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

² Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

³ Mestranda em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

⁴ Professor Adjunto do Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

⁵ Professora Adjunta do Departamento de Enfermagem da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

⁶ Professora Adjunta da Universidade Federal de Santa Catarina

⁷ Professora Adjunta do Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Correspondência: Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília - DF
E-mail: elieteneves@unb.br / Telefone: (61) 33072514

RESUMO

Biomarcadores na avaliação de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade dos biomarcadores de predizerem o risco de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, assim como avaliar a correlação entre estes biomarcadores e a severidade da mucosite.

Métodos: Foram identificados estudos clínicos relevantes através de pesquisa eletrônica nas seguintes bases de dados: LILACS, PubMed, Science Direct, Scopus e Web of Science. A busca da literatura cinzenta foi realizada no Google Acadêmico, OpenGrey e ProQuest. Foram considerados estudos que avaliaram biomarcadores para predizer o risco de ocorrência de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia ou quimioradioterapia ou para avaliar a severidade da mucosite oral. A qualidade metodológica dos estudos incluídos foi avaliada usando a ferramenta *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument* (MAStARI) e a qualidade de evidência foi avaliada pelo sistema *Grading of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation* (GRADE).

Resultados: De 1.028 citações identificadas, 26 estudos preencheram os critérios de elegibilidade e foram incluídos nesta revisão. No total, foram avaliados 27 tipos de biomarcadores, sendo que os mais frequentes foram o EGF (Fator de Crescimento Epidérmico), a CRP (Proteína C-Reativa), os Polimorfismos Genéticos, o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa) e a ESR (Taxa de Sedimentação de Eritrócitos).

Conclusão: Dosar biomarcadores antes de iniciar a radioterapia é um método promissor para predizer o risco de desenvolver mucosite e permite que pacientes radiosensíveis tenham um

tratamento personalizado com menores chances de interrupção. Os marcadores inflamatórios CRP e ESR e o fator de crescimento EGF provaram ser mais eficazes em prever o risco de mucosite oral.

Palavras-chave

Biomarcadores; Câncer de Cabeça e Pescoço; Mucosite Oral; Radioterapia; Predição de Risco; Revisão Sistemática.

Relevância Clínica

Identificar pacientes suscetíveis à mucosite oral severa, portadores de câncer de cabeça e pescoço, utilizando a avaliação da presença de biomarcadores para proporcionar um plano de tratamento personalizado com menos chances de interrupção do tratamento oncológico.

ABSTRACT

Biomarkers in the assessment of oral mucositis in head and neck cancer patients: a systematic review

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the capability of biomarkers to predict the risk of oral mucositis in head and neck cancer patients, as well as to assess the correlation between these biomarkers and the severity of mucositis.

Methods: Relevant clinical studies were identified through electronic search of the following databases: LILACS, PubMed, Science Direct, Scopus and Web of Science. A search of the grey literature was performed on Google Scholar, OpenGrey and ProQuest. Studies that evaluated biomarkers to predict the risk of occurrence of oral mucositis in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy or chemoradiotherapy or to assess the severity of oral mucositis were considered. The methodological quality of the included studies was assessed using the *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument* (MAStARI) tool and the evidence quality was assessed by the *Grading of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation* (GRADE) system.

Results: Of 1,028 identified citations, 26 studies met the eligibility criteria and were included in this review. In total, 27 types of biomarkers were evaluated, and the most frequent were the EGF (Epidermal Growth Factor), the CRP (C-Reactive Protein), the Genetic Polymorphisms, the TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) and the ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate).

Conclusion: Dosing biomarkers before starting radiation therapy is a promising method to predict the risk of developing mucositis and allow radiosensitive patients to have a customized treatment that might have less chances of interruption. The inflammatory

markers CRP and ESR and the growth factor EGF markers have proven to be more effective in predict the risk of oral mucositis.

Keywords

Biomarkers; Head and Neck Cancer; Oral Mucositis; Radiotherapy; Risk Prediction; Systematic Review.

Clinical Relevance

Identify patients susceptible to severe oral mucositis, with head and neck cancer, using the evaluation of biomarkers presence, in order to provide a customized treatment plan with less chances of interruption in the oncologic treatment.

1. INTRODUÇÃO

Câncer de cabeça e pescoço (HNC) é o termo usado para tumores localizados na cavidade oral, faringe, laringe e seios paranasais [1-4]. A incidência dos carcinomas oral e orofaríngeo é maior no sul da Ásia, América Latina, Papua Nova Guiné e outras ilhas do Pacífico [1-3]. A etiologia do HNC está relacionada a fatores como o tabaco, o consumo excessivo de álcool e infecção por HPV [2-4]. O risco de desenvolver esse tipo de carcinoma aumenta com a idade do paciente, sendo maior após os 50 anos de idade, com o pico entre 60 e 70 anos [1-3].

O tratamento do HNC deve ter como objetivo maximizar a probabilidade de cura enquanto minimiza os riscos de toxicidade que comprometem a função e a qualidade de vida do paciente [5]. Nos estágios iniciais do câncer, apenas a cirurgia ou apenas a radioterapia (RT) são geralmente considerados equivalentes quanto à eficácia [5,6]. Em tumores localmente avançados, a ressecção primária seguida de RT ou quimioradioterapia (QRT) é o tratamento padrão em pacientes com HNC. A escolha do tratamento deve ser baseada em qual causará menos comprometimento funcional, variando de acordo com a localização anatômica do tumor primário [5].

Muitas complicações podem resultar da terapia não-cirúrgica do câncer, sendo as mais comuns a mucosite, dermatite, alteração do paladar, xerostomia, disfagia, anorexia e fadiga [5,6]. A mucosite oral (MO) é uma resposta inflamatória da mucosa orofaríngea que ocorre devido à terapia do câncer, sendo considerada um dos mais significantes efeitos colaterais na região de cabeça e pescoço. Geralmente trata-se de um fator limitante para a intensificação da terapia, podendo levar à interrupção do tratamento, comprometendo sua eficácia [5-9]. A MO acomete aproximadamente 20 a 40% dos pacientes recebendo quimioterapia convencional, e quase todos os pacientes submetidos à radioterapia para HNC [9]. Os primeiros

sinais clínicos da MO em pacientes recebendo quimiorradioterapia geralmente começam ao final da primeira semana, com o surgimento de eritema, dor e sensação de queimação na mucosa oral. Ao final da segunda semana, começa a formação de úlceras com dor ainda mais severa. À medida que a radiação se acumula, as lesões ulceradas tornam-se mais difusas e dolorosas, ficando presentes durante todo o tratamento radioterápico, até melhorarem espontaneamente 2 a 4 semanas após a conclusão da terapia [9]. Além disso, existem diferentes níveis de severidade da MO que podem variar entre os pacientes, podendo ser mais severa quando há uma associação da quimioterapia (QT) e RT [8,10,11]. A MO é uma condição dolorosa que afeta a qualidade de vida do paciente, pois prejudica a capacidade de comer, engolir e falar. Além disso, aumenta os custos do tratamento porque requer hospitalizações devido à necessidade de controle de dor, uso de nutrição parenteral e controle da infecção [7,9,12]. O grau da mucosite é determinado pela dose do tratamento, tamanho da área irradiada e planejamento de fracionamentos prescrito para cada paciente, e parece ser modificado pela presença de algumas substâncias como o EGF (Fator de Crescimento Epidérmico) e o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa) [8].

A heterogeneidade na resposta à RT em tecidos normais é observada entre pacientes tratados com doses idênticas de radiação. Compreender os detalhes moleculares da etiopatogênese da MO permite a identificação precoce de pacientes predispostos a desenvolver MO severa, assim como facilita o monitoramento e caracterização desse efeito adverso [13]. Estudos clínicos têm sido realizados a fim de se obter um biomarcador capaz de prever o risco do paciente, para que protocolos de tratamentos personalizados possam ser planejados [6,13]. Um biomarcador é geralmente uma substância secretada pelo tumor, via metabólica ou processo inflamatório, que pode ser usado para diagnóstico, prognóstico e predição. As proteínas

são os principais biomarcadores, podendo ser detectadas em fluidos como sangue e saliva ou tecidos corporais [14]. Dessa forma, saber que um paciente tem um risco elevado de desenvolver MO, ajudará a planejar uma intervenção customizada com cirurgia curativa, RT periférica ou QT de baixa dosagem, para prevenir o desenvolvimento da condição [12].

Dessa maneira, o objetivo desta revisão sistemática foi responder à seguinte pergunta focada: “Os biomarcadores têm a capacidade de prever o risco de ocorrência de mucosite oral em pacientes com HNC?”

2. MÉTODOS

Esta revisão sistemática foi realizada de acordo com o *check-list* PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) [15]. O protocolo foi registrado na base de dados *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO) sob o número de registro CRD42016037299 [16].

2.1 Delineamento do Estudo

Uma revisão sistemática de estudos em humanos foi realizada para avaliar a capacidade dos biomarcadores de prever o risco de ocorrência de MO.. A partir da pergunta focada, criou-se uma estratégia de busca a fim de se identificar os estudos que seriam incluídos na revisão. Uma vez selecionados os estudos, as informações contidas nos artigos foram organizadas de forma tabular e gráfica, para se acessar mais facilmente os dados relevantes e se chegar a uma conclusão.

2.2 Critérios de Elegibilidade

2.2.1 Critérios de Inclusão

Artigos em humanos que avaliaram biomarcadores de pacientes com HNC submetidos à RT ou QRT para prever o risco de ocorrência de MO ou para avaliar a severidade da MO relacionada ao tratamento do câncer. Apenas estudos no alfabeto Latino (Romano) foram considerados.

2.2.2 Critérios de Exclusão

Os estudos foram excluídos de acordo com os seguintes critérios: (1) diferentes tipos de mucosa, que não mucosa oral, foram avaliadas; (2) pacientes com outros tipos de câncer, diferentes de HNC; (3) dados não individualizados para HNC; (4) apenas quimioterapia foi usada como tratamento do câncer; (5) nenhuma correlação entre biomarcadores e severidade/risco de desenvolvimento de mucosite oral; (6) revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livro, e resumos de conferência; (7) associação entre biomarcadores e MO em estudos experimentais (ensaios clínicos, estudos *in vitro* ou estudos *in vivo* em animais); (8) restrições de linguagem.

2.3 Fontes de Informação e Estratégia de Busca

Estudos que foram considerados para inclusão foram identificados usando estratégia de busca individual para cada uma das seguintes bases de dados: LILACS, PubMed, Science Direct, Scopus e Web of Science (Apêndice 1). A busca parcial na literatura cinzenta foi realizada usando Google Acadêmico, OpenGrey e ProQuest Dissertations & Theses Global. A busca nas bases de dados incluiu todos os artigos publicados até 25 de janeiro de 2016, e a pesquisa da literatura cinzenta incluiu todos

os artigos publicados até 01 de fevereiro de 2016, sem restrição de tempo. Referências duplicadas foram removidas com um gerenciador de referências (*EndNote*[®], Thomson Reuters). Além disso, as listas de referências dos estudos selecionados foram manualmente rastreadas para potenciais estudos relevantes que poderiam ter sido perdidos durante as buscas nas bases de dados eletrônicas.

2.4 Seleção dos Estudos

A seleção dos estudos foi realizada em duas fases. Na fase 1, duas autoras (AGCN e CLR) independentemente revisaram títulos e resumos identificados em todas as bases de dados eletrônicas. Estas autoras selecionaram artigos que pareciam atender aos critérios de inclusão baseados em seus títulos e resumos e quaisquer estudos que não cumpriam os critérios de inclusão foram descartados. Na fase 2, as mesmas autoras (AGCN e CLR) independentemente leram os textos completos de todos os artigos selecionados e excluíram estudos que não atendiam aos critérios de inclusão (Apêndice 2). Divergências entre as duas avaliadoras iniciais foram resolvidas por consenso. Quando elas não chegaram a um consenso, uma terceira revisora (ENSG) foi envolvida para tomar uma decisão final. As listas de referências de todos os artigos incluídos foram criticamente avaliadas por AGCN. Os artigos que foram selecionados das listas de referências foram lidos por AGCN e CLR.

2.5 Processo de Coleta de Dados

Uma autora (AGCN) coletou as principais informações de cada artigo selecionado. A segunda revisora (CLR) verificou as informações coletadas e confirmou sua precisão. Mais uma vez, qualquer divergência entre elas foi resolvida por discussão e

acordo mútuo entre AGCN, CLR e ENSG. Para todos os estudos incluídos, as seguintes informações foram registradas: ano de publicação, autor(es), país, tamanho da amostra (casos de HNC e controles), tipos de biomarcadores, classes, métodos do estudos e principais conclusões.

2.6 Risco de Viés em Estudos Individuais

O risco de viés dos estudos selecionados foi avaliado usando a ferramenta padronizada de avaliação crítica para risco de viés *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument* (MAStARI) [17]. O risco de viés foi categorizado como **Alto** quando o estudo atingisse até 49% de pontuação “sim”, **Moderado** quando o estudo atingisse entre 50% e 69% de pontuação “sim”, e **Baixo** quando o estudo atingisse mais que 70% da pontuação “sim”. AGCN e CLR pontuaram cada item como “sim”, “não”, “indefinido” ou “não aplicável” e avaliaram independentemente a qualidade de cada estudo incluído (Apêndice 3). Desacordos foram resolvidos por uma terceira revisora (IPT).

2.7 Resumo dos Desfechos

O desfecho primário desta revisão sistemática foi a capacidade dos biomarcadores predizerem o risco de ocorrência de MO em pacientes com HNC submetidos à RT ou QRT. Um desfecho secundário foi a capacidade dos biomarcadores avaliarem a severidade da MO em pacientes com HNC. Qualquer tipo de medida de resultado foi considerada nesta revisão (variáveis categóricas e contínuas).

2.8 Síntese dos Resultados

Se os estudos incluídos na revisão tivessem dados suficientes e se os dados fossem considerados homogêneos, uma meta-análise seria realizada.

2.9 Risco de Viés entre Estudos

Heterogeneidade clínica (comparando a variabilidade entre as características dos participantes e resultados estudados), heterogeneidade metodológica (comparando a variabilidade no delineamento do estudo e risco de viés), e heterogeneidade estatística foram consideradas.

2.10 Confiança na evidência cumulativa

O instrumento *Grading of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation* (GRADE) [18,19] avaliou a qualidade da evidência e grau de recomendação nos 26 estudos incluídos na síntese qualitativa. Essa avaliação foi baseada no delineamento do estudo, risco de viés, inconsistência, evidência indireta, imprecisão e outras considerações. Qualidade de evidência foi caracterizada como alta, moderada, baixa ou muito baixa [18,19]. O GRADE foi avaliado usando o website <http://gradepro.org>.

3. RESULTADOS

3.1 Seleção dos Estudos

Na fase um de seleção dos estudos, 1.028 citações foram identificadas através das cinco bases de dados eletrônicas. Após os artigos duplicados serem removidos, 893 citações permaneceram. Avaliação completa dos títulos e resumos foi realizada e 857 artigos foram excluídos, restando 36 artigos após a fase um. A busca no Google Acadêmico forneceu 296 referências, das quais apenas uma foi incluída para análise de texto completo e incluída na coleta de dados. Seis artigos adicionais foram identificados nas listas de referências dos artigos incluídos, sendo que apenas dois deles foram incluídos na análise. Vinte artigos foram identificados usando o ProQuest e quatro artigos foram identificados usando o OpenGrey mas nenhum desses estudos foi incluído.

Uma revisão dos textos completos foi realizada nos 43 artigos encontrados na primeira fase de seleção. Esse processo levou à exclusão de 17 estudos (Apêndice 2) [20-36]. No fim, 26 artigos foram selecionados para análise descritiva [6,13,37-60]. Um fluxograma detalhando o processo de identificação, inclusão e exclusão dos estudos é apresentado na Figura 1.

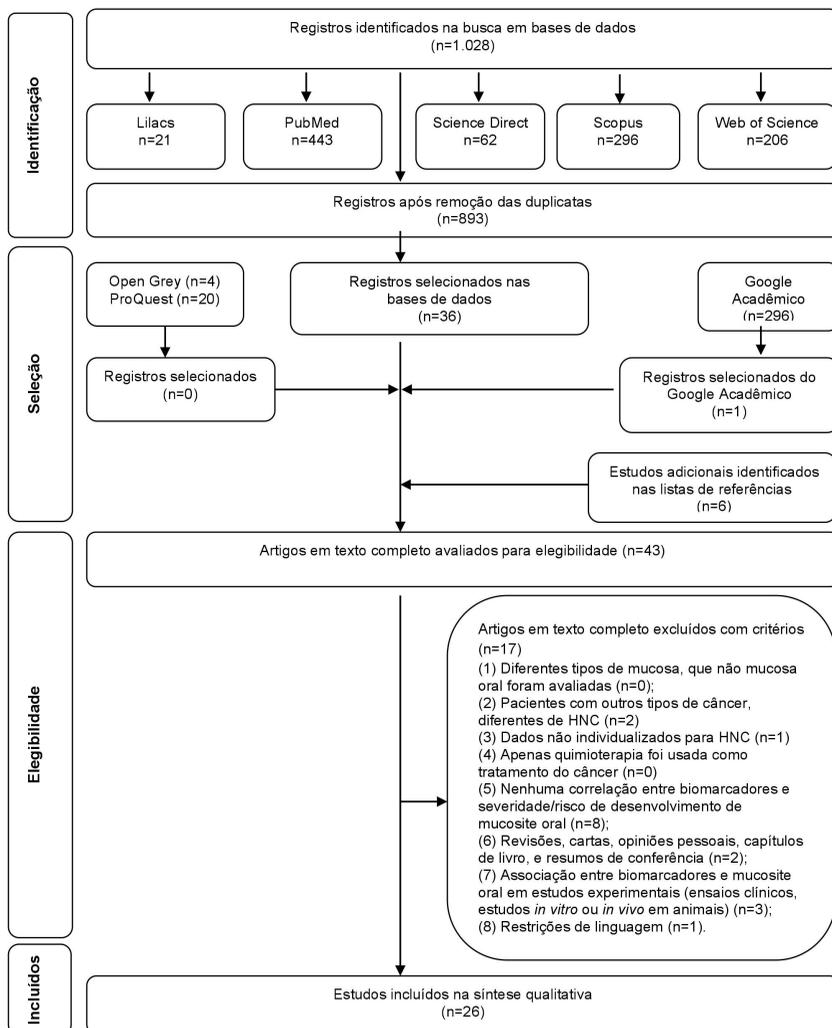


Figura 1. Fluxograma de busca da literatura e critérios de seleção adaptado do PRISMA [15].

3.2 Características dos Estudos

Os estudos foram conduzidos em dezesseis países diferentes: Alemanha [13,42,44,45], Bélgica [59], Brasil [47], Canadá [45,54], China [51], Coreia [50], EUA [41, 42, 44], Finlândia [52,57], Grécia [60], Índia [6, 37, 40], Irã [56], Israel [53], Itália [55], Reino Unido [58], Suécia [43] e Taiwan [38,39]. Todos os estudos foram publicados entre 1994 e 2015, três dos 26 estudos incluídos foram conduzidos antes de 2000, e os outros 23 foram publicados após o ano 2000. Todos eles foram publicados na língua inglesa.

A amostra total dos 26 estudos selecionados incluiu 1.007 indivíduos afetados pelo HNC. O tamanho das amostras variou de 10 [44] a 183 [6] pacientes com HNC. Todos os estudos avaliaram pacientes submetidos à RT, mas alguns estudos avaliaram pacientes que realizaram tanto RT quanto QRT. Dezesseis estudos avaliaram biomarcadores sanguíneos, sete estudos avaliaram biomarcadores salivares e os três estudos restantes avaliaram os biomarcadores em amostras de biópsia e exames citológicos.

O resumo das características descritivas dos estudos incluídos é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=26)

Autor, Ano, País	# de pacientes com HNC	Controles	Biomarcadores	Classe	Métodos	Principais Conclusões
Bhattathiri et al. 1994 Índia	13	NA	(Plasma) GSH	Proteína	Método de Beutler	Foi demonstrada a associação entre o nível de GSH plasmático e mucosite oral aguda. Pacientes com níveis mais baixos de GSH plasmático tiveram reação à radiação mais severa (Grau 5), o que demonstra o papel radioprotetor do GSH.
Chen et al. 2005 Taiwan	18	NA	(Plasma) TGF- β 1	Proteína	ELISA	Os níveis de TGF- β 1 eram significativamente altos quando a toxicidade à radiação era severa. Os tecidos danificados, além do tumor em si, também contribuem para o alto nível plasmático de TGF- β 1.
Chen et al. 2008 Taiwan	39	NA	(Plasma) TGF- β 1	Proteína	ELISA	O nível plasmático de TGF- β 1 era elevado quando a toxicidade à radiação era severa, sugerindo que mucosite aguda causada por RT e CT concomitante estava relacionada a altos níveis plasmáticos de TGF- β 1.
Chethana et al. 2015 Índia	30	30 pessoas saudáveis	(Soro) CRP e ESR	Proteínas	ND	Os níveis de CRP aumentaram significativamente no fim da RT. Houve uma correlação entre CRP e grau de mucosite apenas nas primeiras semanas de tratamento. Os níveis de ESR apresentaram um aumento significativo até o 14 ^o dia de tratamento, seguido de uma diminuição no fim da RT. Essa variação estava relacionada ao grau de mucosite.
Citrin et al. 2012 EUA	11	NA	(Salivar) IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α , VEGF e EGF	Proteínas	Tecnologia Luminex Fluorescente	Os níveis de IL-6, IL-8, MCP-1 e TNF- α aumentaram de acordo com a dose da radiação, mas não houve uma correlação significativa entre os níveis das citocinas e toxicidade. Níveis de IL-10 na saliva foram maiores em pacientes com alto grau de mucosite comparado com aqueles com baixo grau de mucosite. IL-4 e EGF estavam elevados perto do tumor mas não houve um aumento na concentração durante a RT.
Dumbrigue et al. 2000 EUA	13	18 pessoas saudáveis	(Salivar) EGF e PT	Proteínas	ELISA (EGF)/ Método de Bradford (PT)	Os níveis de EGF diminuíram ao longo do tempo, enquanto os níveis das proteínas totais aumentaram. Houve uma tendência a níveis mais baixos de EGF em pacientes com mucosite severa, mas a correlação foi fraca e não alcançou significância estatística.

Tabela 1 (Continuação)

Autor, Ano, País	# de pacientes com HNC	Controles	Biomarcadores	Classe	Métodos	Principais Conclusões
Ehrsson et al. 2010 Suécia	27	NA	(Soro) hsCRP, Albumina, IGF-1, IGFBP-1 e Grelina	Proteínas	Técnica RIA	Houve um aumento significativo no nível de hsCRP possivelmente relacionado à inflamação da mucosa. Uma redução na albumina sérica foi notada durante a RT. Pequenas diferenças insignificantes foram observadas nos níveis de IGF-1, IGFBP-1 e Grelina.
Epstein et al. 1997 EUA	16	NA	(Salivar) EGF	Proteína	ELISA	A concentração de EGF diminuiu durante a RT e houve uma tendência a EGF reduzido em pacientes com mucosite oral mais severa comparando o EGF à ulceração total e nível total de mucosite.
Epstein et al. 2000 Canadá	18	NA	(Salivar) EGF	Proteína	ELISA	A concentração de EGF diminuiu durante a RT, mas a correlação entre EGF pré-tratamento e mucosite severa foi fraca, embora níveis totais mais elevados de EGF em secreções orais tenham sido associadas a danos na mucosa menos graves. Pacientes com níveis mais baixos de EGF antes da terapia podem estar em maior risco de dano à mucosa durante a RT.
Fleckenstein et al. 2011 Alemanha	31	NA	(Soro) DNA DSB (γ -H2AX)	DNA	Microscopia de Fluorescência	Pacientes que desenvolveram grau ≤ 2 de mucosite tiveram uma quantidade total de reparo de DSB similar a pacientes com grau ≥ 3 . Foi encontrado risco elevado de pacientes desenvolverem grau ≥ 3 de mucosite quando a taxa de DSB não reparado após 24 horas era maior do que 1 desvio padrão da média. Entretanto, não foi encontrada uma correlação significativa entre reparo de DSB e graus de mucosite oral.
González-Arriagada et al. 2015 Brasil	45	20 voluntários saudáveis	(Salivar) BPIFA-1 e BPIFA-2	Proteínas	Western Blot	Os níveis de BPIFA-1 aumentaram durante o tratamento, e esse aumento foi mantido 1 semana após a conclusão. Os níveis de BPIFA-1 foram significativamente associados à presença e severidade da mucosite. Não houve correlação entre os níveis de BPIFA-2 e mucosite.
Handschel et al. 1999 Alemanha	13	NA	(Amostras de Biópsias) ICAM-1, CAM-1, E-selectina, LFA-1, Mac-1 e VLA-4	Moléculas de Adesão	Imuno-histoquímica	Foi encontrado um aumento na expressão de ICAM-1, E-selectina, LFA-1 e Mac-1, enquanto que VCAM-1 e VLA-4 permaneceram em níveis muito baixos. O grau de mucosite oral foi acompanhada por essas alterações. Interferência terapêutica na função da E-selectina ou ICAM-1 pode ser uma nova opção para prevenir mucosite induzida por radiação.

Tabela 1 (Continuação)

Autor, Ano, País	# de pacientes com HNC	Controles	Biomarcadores	Classe	Métodos	Principais Conclusões
Handschelet al. 2001 Alemanha	13	NA	(Amostras de Biópsias) Anticorpos Monoclonais 27E10, 25F9 e RM3/1	Sub-populações de Macrófagos	Imuno-histoquímica	Durante a RT, a porcentagem de células RM3/1 positivas aumentaram significativamente, enquanto que não houveram mudanças significativas nas porcentagens das células 27E10 e 25F9 positivas. Não houve correlação entre 27E10, 25F9 e grau de mucosite. Entretanto, foi encontrada uma correlação significativa entre RM3/1 e grau de mucosite.
Jehlich et al. 2015 Alemanha	50	NA	(Salivar) Proteínas	Proteínas	Nano LC-MS/MS	As proteínas proteinase 3, fibronectina, cadeia beta do fibrinogênio, metaloproteinase de matriz 8 e 9, ceruloplasmina e complemento C3 estavam sobre-representadas nas amostras de saliva de pacientes com mucosite oral severa. Proteínas salivares podem permitir a identificação de pacientes propensos a desenvolver mucosite oral durante a RT.
Ki et al. 2009 Coréia	40	NA	(Soro) CRP e ESR	Proteínas	ECLIA	Níveis médios de CRP aumentaram significativamente de acordo com o número de frações e o grau de mucosite. Não houve uma relação estatisticamente significativa entre ESR e o número de frações de RT ou grau de mucosite.
Li et al. 2013 China	25	NA	(Soro) γ -H2AX	Proteína	Citometria de Fluxo	Altos níveis de γ -H2AX foram observados mais ao fim da RT, mas esse aumento não foi estatisticamente diferente entre pacientes com MO moderada e MO severa, embora pacientes com MO severa tenham tido uma capacidade reduzida de reparo do DNA.
Lundberg et al. 2010 Finlândia	34	NA	(Plasma) Genótipo de TGF- β 1	Gene	TaqMan chemistry	Não houve uma correlação significativa entre a severidade da mucosite e o genótipo variante TGFB1. O SNP rs1982073 do TGF- β 1 é associado à sobrevida de pacientes com HNC após QRT mas não parece estar associado ao risco de mucosite induzida por QRT.
Meirovitz et al. 2010 Israel	15	NA	(Soro) IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e IL-10.	Citocinas	ELISA	Os níveis das citocinas medidas mostrou IL-6 e IL-8 aumentados, e TNF- α reduzido. IL-1 e IL-10 não apresentaram nenhuma mudança significante. Uma correlação entre altos níveis de IL-6 e mucosite severa foi encontrada, mas não houve relação entre os níveis de IL-1, TNF- α , IL-8 ou IL-10 e grau de mucosite.

Tabela 1 (Continuação)

Autor, Ano, País	# de pacientes com HNC	Controles	Biomarcadores	Classe	Métodos	Principais Conclusões
Mohammed et al. 2012 Canadá	62	NA	(Soro) CRP e ESR	Proteínas	CRP: Nefelometria ESR: Método Westergren modificado	O aumento do nível de ESR atingiu significância estatística na terceira semana de tratamento, coincidindo com o início dos sintomas clínicos/ mudanças na mucosa. Os níveis de CRP apenas atingiram aumento estatisticamente significativo na sexta semana de tratamento.
Pratesi et al. 2011 Itália	101	NA	(Soro) Polimorfismos Genéticos (SNPs)	DNA	HRMA	O alelo XRCC1-399Gln foi significativamente associado a maior risco de mucosite. Pacientes com pelo menos um SNP ou com ambos SNPs nos genes XRCC1 c.1196A>G ou RAD 51 c.-3429G>C têm uma chance maior de desenvolver toxicidades agudas.
Seyyednejad et al. 2012 Irã	30	NA	(Soro) IL-1 e TNF- α	Citocinas	ELISA	Os níveis de TNF- α diminuíram durante a terapia, especialmente após a terceira semana de terapia, enquanto que IL-1 não apresentou nenhuma mudança significativa. Não houve relação entre os níveis de IL-1 e TNF- α e o grau de mucosite.
Venkatesh et al. 2014 Índia	183	NA	(Soro) Polimorfismos Genéticos	DNA	CRP	Pacientes com alelo recessivo de NBN tiveram 4.72 vezes mais chances de desenvolver mucosite severa (grau>2). Variantes heterozigotas no CAT exibiram 0.452 vezes menos chances de desenvolver mucosite oral severa. SNPs em XRCC1 (rs3213245, rs1799782, rs25489 and rs25487) estavam ligados à mucosite oral severa.
Vuotila et al. 2002 Finlândia	39	NA	(Salivar) MMP-8 e MMP-9	Proteínas	IFMA/ Western Immunoblotting	Embora fortes manifestações de lesões orais estivessem presentes, nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis salivares de MMP-8 e MMP-9 e as lesões na mucosa oral induzidas por radiação.
Wardman et al. 2001 Reino Unido	18	10 voluntários saudáveis	(Soro) GSH, Cisteína, Ácido Úrico e Ascorbato.	Anti-oxidantes Plasmáticos	HPCL	Não houve correlação entre a severidade da mucosite e as concentrações dos antioxidantes plasmáticos ácido úrico, ascorbato ou GSH no sangue total.

Tabela 1 (Continuação)

Autor, Ano, País	# de pacientes com HNC	Controles	Biomarcadores	Classe	Métodos	Principais Conclusões
Werbrueck <i>et al.</i> 2009 Bélgica	88	NA	(Soro) Polimorfismos Genéticos	DNA	CRP	Uma associação foi encontrada entre a presença de alelos variantes dos polimorfismos XRCC3c.562-14 A>G e Rad51c.-3392 e o risco de mucosite severa. Uma associação negativa foi encontrada entre o SNP Ku70c.-1310 e o desenvolvimento da mucosite severa, indicando o efeito protetor desse polimorfismo.
Xanthinaki <i>et al.</i> 2008 Grécia	35	NA	(Exames citológicos) p53, BCL-2, MCI-1, TNF e IL-1 β	Proteínas	Imunocitoquímica	Um aumento na expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β , assim como a expressão da proteína pro-apoptótica p53 e uma redução na expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e MCI-1 foram registradas e relacionadas à mucosite oral radioinduzida.

NA= Não aplicável. ND= Não determinado. K=CASO. C=CONTROLE. HNC= Câncer de Cabeça e Pescoço. RT= Radioterapia. QRT = Quimioradioterapia.

MÉTODOS: ABC = Avidin-Biotin Complex. ECLIA= Electrochemiluminescence immunoassay. ELISA= Enzyme-linked immune-sorbent assay. HPCL= High-pressure liquid chromatography. HRMA= High Resolution Melting Analysis. IFMA= Immunofluorometric assay. Nano LC-MS/MS= Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. OPS= Orthogonal Polarization Spectral. CRP = Polymerase Chain Reaction. RIA = Radioimmunoassay

BIOMARCADORES: BCL-2= B-cell lymphoma 2. BPIFA= Bactericidal or Permeability-Increasing protein Family A. CAT= Catalase. CRP= Proteína C-Reativa. DNA DSB = DNA Double-strand break. EGF= Fator de Crescimento Epidérmico. ESR= Taxa de Sedimentação de Eritrócitos. GSH= Glutathiona. GST= Glutathiona S-transferase. GSTP1= Glutathiona S-transferase pi 1. ICAM-1= Soluble intercellular adhesion molecule-1. IGF-1= Insulin Growth Factor 1. IGFBP-1= Insulin-like growth factor-binding protein 1. IL= Interleucina. LIG4= Ligase IV. LFA-1= Lymphocyte function-associated antigen 1. Mac-1= Macrophage 1. MCI-1= Myeloid cell leukemia 1. MCP-1= Monocyte Chemoattractant Protein-1. MMP= Metaloproteinase de matriz. NBN= Nibrin. OGG1= 8-oxoguanine DNA glycosylase gene. SOD2= Superoxide dismutase 2. TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa. TGF- β 1= Fator de crescimento transformador beta 1. TP= Proteínas totais. VCAM= Vascular cell adhesion molecule. VEGF= Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular. VLA-4= Very Late Antigen-4. WBC= Leucócitos. XRCC= X-ray repair cross-complementing protein.

3.3 Risco de Viés nos Estudos

O resumo da avaliação do risco de viés dos 26 estudos incluídos é apresentado na Tabela 2. Entre todos os estudos, sete foram classificados como moderado risco de viés, enquanto os outros 19 estudos foram considerados de baixo risco de viés. No item 2 do critério de qualidade metodológica MASTARI, os pacientes só eram considerados de estarem em um ponto similar no curso de sua condição se todos estivessem expostos ao mesmo tratamento (apenas RT ou apenas QRT). O item 3 (O viés foi minimizado em relação à seleção de casos e controles?) foi aplicável apenas para os estudos de caso e controle incluídos nesta revisão [40,42,47,58]. O item 5 (Os desfechos são avaliados usando critério objetivo?) foi completamente pontuado como “sim” porque em todos os estudos as ferramentas de medidas usadas eram instrumentos validados. A maioria dos estudos teve acompanhamento durante um período de tempo suficiente, mediu os desfechos de uma maneira confiável e usou análise estatística apropriada. Por outro lado, a maioria dos estudos não identificou fatores de confundimento nem descreveu os desfechos das pessoas que foram removidas.

3.4 Resultados dos Estudos Individuais

Apesar da heterogeneidade entre os tipos de biomarcadores avaliados, muitos estudos concluíram que os biomarcadores testados tiveram a capacidade de correlacionar com a severidade da MO em pacientes com HNC [13,37-41,43-45, 47-50, 53, 54, 60] ou prever o risco de ocorrência da MO [6,13,45,55,59].

Tabela 2 - Resumo da Avaliação do Risco de Viés*

Autor	Risco de Viés
Bhattathiri et al. (1994)	Moderado
Chen et al. (2005)	Baixo
Chen et al. (2008)	Baixo
Chethana et al. (2015)	Moderado
Citrin et al. (2012)	Baixo
Dumbrigue et al. (2000)	Baixo
Ehrsson et al. (2010)	Baixo
Epstein et al. (1997)	Baixo
Epstein et al. (2000)	Baixo
Fleckenstein et al. (2011)	Baixo
Gonzalez et al. (2015)	Baixo
Handschel et al. (1999)	Baixo
Handschel et al. (2001)	Baixo
Jehmlich et al. (2015)	Moderado
Ki et al. (2009)	Baixo
Li et al. (2013)	Moderado
Lundberg et al. (2010)	Baixo
Meirovitz et al. (2010)	Baixo
Mohammed et al. (2012)	Baixo
Pratesi et al. (2011)	Moderado
Seyyednejad et al. (2012)	Baixo
Venkatesh et al. (2014)	Baixo
Vuotila et al. (2002)	Baixo
Wardman et al. (2001)	Baixo
Werbrouck et al. (2009)	Moderado
Xanthinaki et al. (2008)	Moderado

* Risco de viés avaliado por *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument (MAStARI)* [17]. Risco de viés foi categorizado como **Alto** quando o estudo atingiu até 49% de pontuação "sim", **Moderado** quando o estudo atingiu entre 50% e 69% de pontuação "sim", e **Baixo** quando o estudo atingiu mais de 70% de pontuação "sim".

3.5 Síntese dos Resultados

No total, 27 biomarcadores foram avaliados nos estudos incluídos (Figura 2). Para interpretar facilmente os resultados, os biomarcadores foram agrupados em oito grupos diferentes, de acordo com suas funções: fatores de crescimento, marcadores inflamatórios de fase aguda, fatores genéticos, citocinas, proteínas gerais, antioxidantes plasmáticos, proteínas apoptóticas e células (Figura 3). Os tipos mais frequentes de biomarcadores foram os fatores de crescimento, outros marcadores inflamatórios, fatores genéticos e citocinas (Apêndice 4).

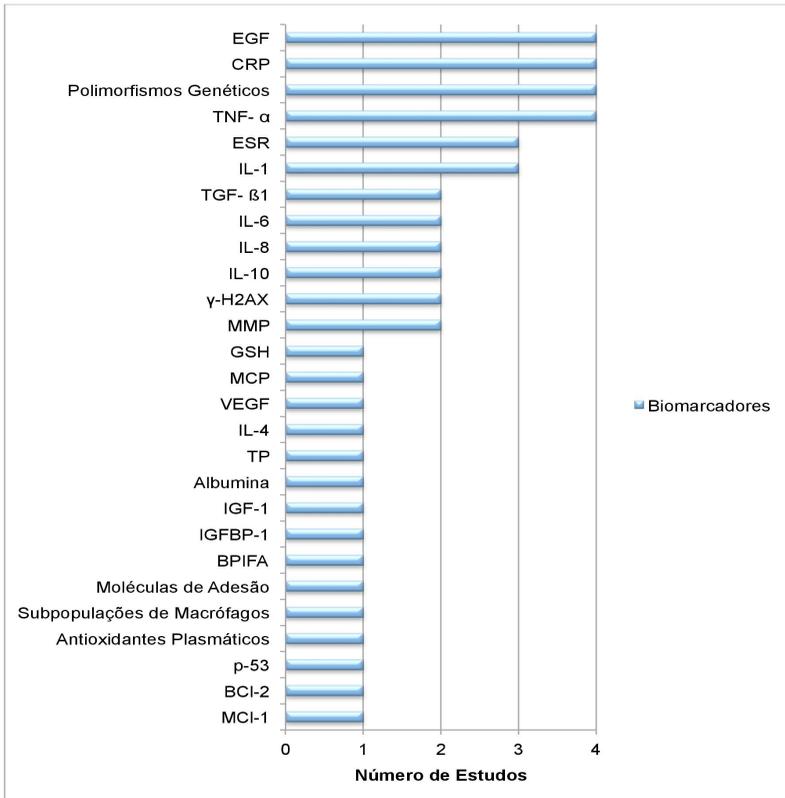


Figura 2. Frequência dos biomarcadores nos estudos incluídos

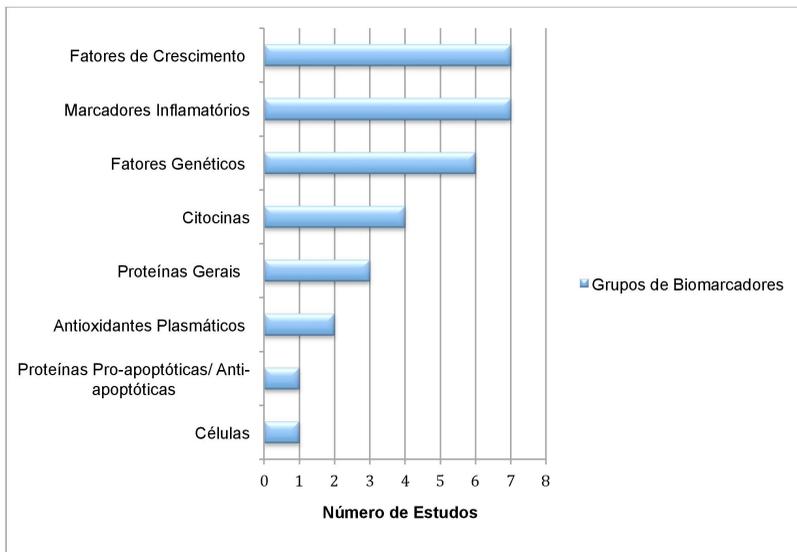


Figura 3. Frequência dos biomarcadores agrupados

Entre os fatores de crescimento, destacaram-se o EGF e o TGF- β 1 que foram avaliados em sete dos 26 estudos. Foi observada uma tendência a níveis reduzidos de EGF em pacientes com MO severa, suportando a hipótese de que pacientes com baixos níveis de EGF antes da terapia podem ter maior risco de lesões à mucosa durante a RT [42,44,45], embora Citrin *et al.* [41] não tenham encontrado variações na concentração do EGF. Por outro lado, os níveis de TGF- β 1 pareceram estar elevados se a toxicidade devido à radiação fosse severa [38,39], enquanto outro estudo [52] não encontrou uma correlação significativa entre a severidade da mucosite e o genótipo TGF- β 1.

Os marcadores inflamatórios de fase aguda mais frequentemente analisados foram a CRP (Proteína C-Reativa) e o ESR (Taxa de Sedimentação de Eritrócitos), e três estudos [40,50,54] avaliaram ambos marcadores, uma vez que os dois estão relacionados à resposta de fase aguda. Os estudos

demonstraram um aumento significativo nos níveis de CRP e ESR no final da RT e encontraram uma correlação entre esses altos níveis e o número de frações e grau da mucosite. Apenas Ki *et al.* [50] não encontraram nenhuma relação entre os níveis de ESR e o número de frações ou o grau de mucosite.

Outro biomarcador que foi muito frequente entre os estudos foram os polimorfismos genéticos, que foram analisados em três diferentes estudos [6,55,59]. Polimorfismos nos genes *XRCC1*, *XRCC3* e *RAD51* foram demonstrados estar associados à chance aumentada de desenvolver toxicidades agudas, incluindo MO.

As citocinas avaliadas nos estudos incluídos foram as interleucinas IL-1, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os níveis de IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 β aumentaram de acordo com a dose da radiação e apenas IL-8 pareceu não estar relacionado à MO severa [41,53,56,60]. Os níveis de TNF- α pareceram estar aumentados em alguns estudos [41,60] porém reduzidos em outros dois [53,56], indicando uma contradição nos resultados.

Proteínas gerais, antioxidantes plasmáticos, proteínas apoptóticas e células foram também usados como biomarcadores nos estudos incluídos, porém em uma frequência menor. Embora o número de estudos não tenha sido tão significativo, os resultados foram bastante relevantes. Foi demonstrada a correlação entre o grau de mucosite oral e níveis elevados das proteínas BPIFA-1 [47], ICAM-1, E-selectina, LFA-1, e Mac-1 [48], bem como a proteína pró-apoptótica p53 [60] e as células positivas RM3/1 [49]. Expressão reduzida das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e MCL-1 também foi associada à MO radioinduzida [60]. O antioxidante plasmático GSH foi relatado de estar associado à MO e de ter um papel radioprotetor [37], porém em outro estudo [58] não foi encontrada correlação entre severidade da mucosite e antioxidantes plasmáticos, incluindo o GSH.

3.6 Risco de Viés Através dos Estudos

Os estudos incluídos utilizaram metodologia similar, o que reduziu a possibilidade de interpretação errada. Todos os estudos selecionados foram considerados relativamente homogêneos, porque todos eram estudos observacionais. No entanto, não foi possível realizar meta-análise porque havia estudos tipo coorte e caso-controle, diversos tipos de biomarcadores e diferentes fluidos corporais sendo avaliados.

3.7 Confiança na evidência cumulativa

No geral, a qualidade da evidência dos desfechos analisada pelo sistema GRADE foi avaliada como moderado, sugerindo que os resultados são moderadamente confiáveis de que o verdadeiro efeito fica perto da estimativa do efeito, mas existe a possibilidade de que seja substancialmente diferente (Apêndice 5).

4. DISCUSSÃO

4.1 Resumo da Evidência

A possibilidade de medir o risco de desenvolver MO em pacientes com HNC que realizarão RT ou QRT pode melhorar o manejo de tal condição e pode permitir estratégias personalizadas de tratamento que previnam toxicidades severas [41,51]. Os biomarcadores podem ser considerados ferramentas promissoras para esta finalidade. Assim, sabendo que um paciente tem um risco elevado de desenvolver MO severa, ele terá um acompanhamento mais rigoroso, no que tange aos cuidados para se evitar o surgimento de lesões na mucosa, como instrução de higiene oral, aconselhamento para cessação do

fumo e laserterapia. Deve-se levar em conta o custo-benefício de se medir biomarcadores em todos os pacientes com HNC, uma vez que já é protocolo a aplicação do laser nesses pacientes. Entretanto, o laser não é aplicado na região do câncer para evitar multiplicação celular, deixando a área ainda suscetível ao surgimento de MO. Esta é a primeira revisão sistemática que investigou na literatura disponível se os biomarcadores podem prever o risco de desenvolver MO em pacientes com HNC submetidos à RT ou QRT. Oito grupos de biomarcadores foram analisados: fatores de crescimento, citocinas, marcadores inflamatórios de fase aguda, fatores genéticos, proteínas gerais, antioxidantes plasmáticos, proteínas apoptóticas e células.

Os fatores de crescimento são proteínas liberadas por células para transmitir mensagens para outras células e para estimular o crescimento celular, proliferação e diferenciação [61]. Em relação ao fator de crescimento epidérmico (EGF), três estudos [42,44,45] observaram uma diminuição nos níveis de EGF durante a RT e uma tendência a redução do EGF em pacientes com MO mais severa. Esses achados sugerem que pacientes com níveis mais baixos de EGF previamente à terapia podem estar em maior risco de lesões na mucosa durante a RT. Excluir as glândulas parótidas da área de radiação poderia resultar em mucosite menos severa, uma vez que a produção de EGF não seria tão afetada [45]. Assim, analisar os níveis de EGF antes de iniciar a RT poderia ser um método eficiente de identificar pacientes com maior risco de desenvolver mucosite oral.

Outro importante fator de crescimento analisado foi o Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), que controla a homeostase e proliferação celular, cicatrização, imunossupressão e angiogênese [52]. De acordo com Chen *et al.* [38,39], o TGF- β 1 em pacientes com câncer de pulmão pode identificar indivíduos com alto risco de desenvolver pneumonia durante irradiação torácica, assim foi proposto que este fator de

crescimento poderia ser também usado para identificar pacientes com alto risco de desenvolver mucosite devido à irradiação da região de cabeça e pescoço. Foi observado que o nível de TGF- β 1 era significativamente maior em pacientes com radiotoxicidade severa, confirmando que tecidos lesionados contribuem para alto nível plasmático de TGF- β 1 [38,39]. Além disso, a produção de TGF- β 1 é geneticamente regulado e pacientes que têm o alelo variante no polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene *TGFB1* tendem a ter uma alta concentração de TGF- β 1 sérico [52]. Entretanto, Lundberg *et al.* [52] não encontraram uma correlação significativa entre a severidade da mucosite e o genótipo variante *TGF- β 1*. Considerando os resultados encontrados, o TGF- β 1 não pode ser considerado um biomarcador preditivo eficiente, mas pode ser útil como biomarcador para acompanhamento do tratamento.

As citocinas também estão envolvidas na mucosite induzida por RT ou QT porque elas são liberadas por células desintegradas ou por uma reação imune, resultando no recrutamento de células inflamatórias e no desenvolvimento de toxicidade [41,61]. Diversos pesquisadores investigaram a variação na concentração de citocinas, tais como IL e TNF, em pacientes com HNC submetidos à QRT [41,53,56,60]. Foi observado que enquanto a dose de radiação aumentava, os níveis de IL-6 e IL-8 aumentavam simultaneamente, mas apenas a IL-6 pareceu estar relacionada à mucosite severa [41,53]. Citrin *et al.* [41] encontraram níveis elevados de IL-10 na saliva de pacientes com alto grau de mucosite comparado com a de pacientes com baixo grau de mucosite. Por outro lado, Meirovitz *et al.* [53] não encontraram mudanças significativas nos níveis de IL-10. Não houve alterações significativas nos níveis de IL-1 [53,56], mas foi observado um aumento na expressão de IL-1 β , que é um membro da superfamília Interleucina-1, e esse aumento estava relacionado à MO radioinduzida [60].

Os níveis de TNF- α também foram analisados e os resultados foram novamente controversos. Dois estudos [41,60] encontraram níveis elevados dessa citocina durante a RT, enquanto outros dois estudos [53,56] apresentaram níveis reduzidos e apenas Xanthinaki *et al.* [60] puderam encontrar uma associação entre TNF- α e MO. Os resultados encontrados acerca dos níveis de citocinas foram um tanto quanto heterogêneos, provavelmente porque as citocinas foram analisadas em diferentes fluidos e a concentração possivelmente varie da saliva para o sangue. Dessa forma, a amostragem de níveis de citocinas pode fornecer um biomarcador dos efeitos locais da irradiação no tecido [41]. Porém, estudos futuros com tamanhos de amostras maiores poderiam proporcionar uma resposta definitiva se as citocinas podem ser efetivas em prever respostas adversas à RT [53].

Além do efeito preditor dos fatores de crescimento e das citocinas, existem evidências de que o uso dessas substâncias possa ser útil em prevenir e tratar a MO. A Palifermina, um fator de crescimento de queratinócitos (KGF), já é recomendada para prevenir MO em pacientes com malignidades hematológicas recebendo quimioterapia de alta dosagem e irradiação de corpo inteiro (TBI) [61]. Uma revisão sistemática de Raber-Durlacher *et al.* [62] teve como objetivo definir protocolos de prática clínica baseada em evidências para o uso de citocinas e fatores de crescimento para prevenir e tratar mucosite. Sessenta e sete estudos foram incluídos na revisão, avaliando os fatores KGF, EGF, TGF- β , IL-11, Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF). Devido à evidência insuficiente e conflitante, não foi possível fornecer protocolos para o uso tópico ou sistêmico de nenhum desses fatores de crescimento e citocinas para prevenção ou tratamento da mucosite em pacientes com HNC recebendo QRT.

Os marcadores inflamatórios de fase aguda também são usados como biomarcadores para prever o risco de pacientes desenvolverem MO como consequência do tratamento do câncer. CRP é um desses marcadores e contribui para a defesa do organismo neutralizando agentes inflamatórios e pode ser facilmente medido como marcador quantitativo de atividade inflamatória [40]. A CRP aumenta ao final da RT [40,43,50,54], e enquanto Ki *et al.* [50] demonstraram uma correlação entre esse aumento e a progressão da mucosite, Chethana *et al.* [40] só observaram esta relação durante as semanas iniciais do tratamento.

A Taxa de Sedimentação de Eritrócitos (ESR) é outro importante marcador da resposta inflamatória de fase aguda, usado para avaliar condições inflamatórias benignas e neoplásicas ou doenças infecciosas [40,50,54]. Um aumento nos níveis de ESR durante o tratamento do câncer foi observado, seguido de uma redução na concentração desse biomarcador. Essa variação estava relacionada com o grau da mucosite, que também inicialmente aumentou em severidade e depois diminuiu ao final do tratamento [40,54]. Diferentemente, Ki *et al.* [50] não encontraram nenhuma relação estatisticamente significativa entre ESR e o grau de mucosite. Esses dados suportam que proteínas inflamatórias de fase aguda têm o potencial de agir como marcadores objetivos de mucosite, embora seus valores variem significativamente entre os pacientes [54].

A extensão das lesões induzidas ao DNA por radiação e seu reparo são considerados indicadores relevantes de toxicidade por irradiação. A proteína histona γ -H2AX, um fator essencial no processo de reparo do DNA lesado, é imediatamente fosforilada em locais de rupturas de filamentos duplos do DNA (DSBs) e seus níveis têm sido usados para quantificar a habilidade das células de lesar e reparar o DNA após irradiação [51]. No estudo de Li *et al.*, [51] observou-se altos níveis de γ -H2AX ao final da RT, mas o aumento na

expressão de γ -H2AX não foi estatisticamente diferente entre pacientes com MO moderada e MO severa, embora os pacientes com MO severa tenham tido capacidade reduzida de reparo do DNA. Outro estudo também indicou que pacientes que desenvolveram mucosite moderada tiveram uma quantidade total de reparo de DSB similar a pacientes que desenvolveram MO severa [46]. Assim, a detecção de γ -H2AX induzida por irradiação pode ser usada para prever a incidência e a severidade de toxicidades como MO, uma vez que ela permite a avaliação do reparo de DSB individual após RT [46,51].

Fatores genéticos de radiosensibilidade individual parecem influenciar a variabilidade dos efeitos colaterais e essa radiosensibilidade é considerada um efeito direto da resposta celular causada pela perda de eficiência no mecanismo de reparo do DNA [55]. Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em genes de reparo do DNA podem modificar suas funções e consequentemente interferir na capacidade do indivíduo de reparar o DNA lesado, assim, variações em genes específicos podem estar associadas à susceptibilidade ao desenvolvimento de toxicidades de radiação [55]. Foi demonstrado que polimorfismos nos genes *XRCC1*, *XRCC3* e *RAD51* estavam associados ao risco aumentado de desenvolver toxicidades relacionadas à RT, incluindo MO severa [6,55,59]. Apesar do número crescente de estudos sobre SNPs, ainda não está claro se esses polimorfismos podem servir como biomarcadores para prever toxicidade tecidual. Porém identificar os fatores genéticos relacionados ao risco elevado ou reduzido de complicações da RT parece ser um método promissor para detectar pacientes suscetíveis a reações severas.

4.2 Limitações

Algumas limitações metodológicas dessa revisão devem ser consideradas. Primeiro, o pequeno número de pacientes

incluídos nos estudos, porém é importante notar que o câncer de cabeça e pescoço é um câncer incomum e uma amostra de aproximadamente vinte pacientes por estudo foi considerada como representativa. Segundo, muitos estudos não incluíram na análise os resultados das pessoas que foram retiradas do estudo, nem identificaram fatores de confundimento, o que aumentou o risco de viés desses estudos. Por fim, a heterogeneidade dos biomarcadores tornou difícil comparar uma quantidade significativa de estudos sobre o mesmo marcador.

5. CONCLUSÃO

Esta revisão sistemática demonstra que os biomarcadores emergem como potenciais preditores de MO em pacientes com HNC. Assim, dosar biomarcadores relacionados à mucosite antes de iniciar a RT pode identificar indivíduos radiosensíveis e permitir que esses pacientes tenham um plano de tratamento personalizado, podendo ter menos chances de interrupção. Além disso, quantificar biomarcadores em fluidos como a saliva é um método simples de avaliar a severidade da toxicidade dos tecidos e permite classificar os diferentes graus de mucosite sem um critério de classificação, que geralmente não é padronizado. Os biomarcadores que provaram ser mais efetivos em prever o risco de mucosite foram os marcadores inflamatórios de fase aguda, a CRP e a ESR, e o fator de crescimento epidérmico. Porém, mais estudos com menor risco de viés e com maior número de pacientes ainda são necessários a fim de se obter resultados mais precisos.

6. REFERÊNCIAS

1. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer – an appraisal of controversies. *Br Dent J* 2009; 207:471–5.
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45:309-16.
3. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians. Part 2: Epidemiology. *Dental update* 2015; 42:354-6, 8-9.
4. Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer – surgery. *Oral Oncol* 2009; 45:394–401.
5. Cabrera AR, Yoo DS, Brizel DM. Contemporary Radiotherapy in Head and Neck Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2013; 22 (3): 579-598
6. Venkatesh GH, Manjunath VB, Mumbreakar KD, *et al.* Polymorphisms in Radio-Responsive Genes and Its Association with Acute Toxicity among Head and Neck Cancer Patients. *Plos One* 2014; 9(3): 89079-89079.
7. Vera-Llonch M, Oster G, Hagiwara M, *et al.* Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. *Cancer* 2006; 106(2): 329-336.
8. Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis: A challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. *Head Neck* 2003; 25(12): 1057-1070.
9. Villa A, Sonis, ST. Mucositis: pathobiology and management. *Curr Opin Oncol* 2015; 27(3): 159-164.
10. Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis: A challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2. *Head Neck* 2004; 26(1): 77-84.
11. Lalla RV, Bowen J, Barasch A, *et al.* MASCC/ISOO Clinical Practice Guidelines for the Management of Mucositis Secondary to Cancer Therapy. *Cancer* 2014; 120(10): 1453-61.

12. Sonis ST. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncol* 2009; 45(12): 1015-1020.
13. Jehmlich N, Stegmaier P, Golatowski C, *et al.* Differences in the whole saliva baseline proteome profile associated with development of oral mucositis in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *J Proteomics* 2015; 125: 98-103.
14. Patel S, Ahmed S. Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *J Pharm Biomed Anal* 2015; 107: 63-74
15. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman, DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Int. J. Surg.* 2010; 8, 336–341.
16. Normando AGCN, Rocha CL, de Toledo IP, *et al.* Biomarkers in the assessment of oral mucositis in head and neck cancer patients: a systematic review. PROSPERO. 2016: CRD42016037299. Available at: http://http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/display_record.asp?ID=CRD42016037299. Accessed September 20, 2016.
17. The Joanna Briggs Institute. (2014). *The Joanna Briggs Institute reviewer's manual*. Adelaide, Australia: The Joanna Briggs Institute.
18. Balshem H. *et al.* GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. *J Clin Epidemiol* 2011; 64(4): 401–6.
19. Schünemann H *et al.* GRADE handbook for grading quality of evidence and strength of recommendations. Updated October 2013. The GRADE Working Group, 2013. Available at www.guidelinedevelopment.org/handbook.
20. Akmansu M, Unsal D, Bora H, *et al.* Influence of locoregional radiation treatment on tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in the serum of patients with head and neck cancer. *Cytokine* 2005; 31(1): 41-45.

21. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, *et al.* Expression of salivary biomarkers in patients with oral mucositis: evaluation by SELDI-TOF/MS. *Oral Dis* 2016; 22(3): 209-219.
22. Bonan PRF, Kaminagakura E, Pires FR, *et al.* Histomorphometry and immunohistochemical features of grade I (WHO) oral radiomucositis. *Oral Dis* 2007; 13(2): 170-176.
23. Bourton EC, Plowman PN, Smith D, *et al.* Prolonged expression of the γ -H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment. *Int J Cancer* 2011; 129(12): 2928-2934.
24. Christensen ME, Hansen HS, Poulsen SS, *et al.* Immunohistochemical and quantitative changes in salivary EGF, amylase and haptocorrin following radiotherapy for oral cancer. *Acta Otolaryngol* 1996; 116(1): 137-143.
25. Goutham HV, Mumbrekar KD, Vadhiraja BM, *et al.* DNA double-strand break analysis by γ -H2AX foci: A useful method for determining the overreactors to radiation-induced acute reactions among head-and-neck cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 84(5): e607-e612.
26. Hamilton S, Yoo J, Hammond A, *et al.* Microvascular changes in radiation-induced oral mucositis. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 37(5): 730-737.
27. Henke M, Bechtold C, Momm F, *et al.* Blood hemoglobin level may affect radiosensitivity-preliminary results on acutely reacting normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48(2): 339-345.
28. Ho AY, Atencio DP, Peters S, *et al.* Genetic Predictors of Adverse Radiotherapy Effects: The Gene-PARE project. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65(3): 646-655.
29. Ikebe T, Yamasaki K, Takamune Y, *et al.* Reduced expression of nuclear factor κ B in oral mucosa undergoing

- preoperative chemoradiotherapy. *Oral Science International* 2012; 9(2): 33-37.
30. Krause CE, Otieno BA, Bishop GW, *et al.* Ultrasensitive microfluidic array for serum pro-inflammatory cytokines and C-reactive protein to assess oral mucositis risk in cancer patients. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407(23): 7239-7243.
 31. Oton-Leite AF, Silva GBL, Morais MO, *et al.* Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. *Lasers Surg Med* 2015; 47(4): 296-305.
 32. Popanda O, Marquardt JU, Chang-Claude J, *et al.* Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation. *Mutat Res* 2009; 667(1-2): 58-69.
 33. Sonis S, Haddad S, Posner M, *et al.* Gene expression changes in peripheral blood cells provide insight into the biological mechanisms associated with regimen-related toxicities in patients being treated for head and neck cancers. *Oral Oncol* 2007; 43(3): 289-300.
 34. Verey F, Nexø E, Greenwood R, *et al.* Trefoil factor family peptides are increased in the saliva of children with mucositis. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(12): 2051-2055.
 35. Werbrück J, Duprez F, De Neve W, *et al.* Lack of a correlation between γ H2AX foci kinetics in lymphocytes and the severity of acute normal tissue reactions during IMRT treatment for head and neck cancer. *Int J Radiat Biol* 2011; 87(1): 46-56.
 36. Zou G, Lin X, Wu J, *et al.* Association of serum transforming growth factor-beta1 with radiation injury and survival of patients with early-stage nasopharyngeal carcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2012; 32(8): 1171-1174.
 37. Bhattathiri VN, Sreelekha TT, Sebastian P, *et al.* Influence of plasma GSH level on acute radiation mucositis of the

- oral cavity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29(2): 383-386.
38. Chen HW, Chang YC, Lai YL, *et al.* Change of plasma transforming growth factor-beta1 levels in nasopharyngeal carcinoma patients treated with concurrent chemo-radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35(8): 427-432.
 39. Chen HW, Yang SF, Chang YC, *et al.* Epstein-Barr virus infection and plasma transforming growth factor-beta1 levels in head and neck cancers. *Acta Otolaryngol* 2008; 128(10): 1145-1151.
 40. Chethana, Rao PS, Madathil LP, *et al.* Quantitative analysis of acute phase proteins in post chemo-radiation mucositis. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(10): ZC28-ZC31.
 41. Citrin DE, Hitchcock YJ, Chung EJ, *et al.* Determination of cytokine protein levels in oral secretions in patients undergoing radiotherapy for head and neck malignancies. *Radiat Oncol* 2012; 7: 64.
 42. Dumbrigue HB, Sandow PL, Nguyen KHT, *et al.* Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89(6): 710-716.
 43. Ehrsson YT, Hellström PM, Brismar K, *et al.* Explorative study on the predictive value of systematic inflammatory and metabolic markers on weight loss in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Support Care Cancer* 2010; 18(11): 1385-1391.
 44. Epstein JB, Emerton S, Guglietta A, *et al.* Assessment of epidermal growth factor in oral secretions of patients receiving radiation therapy for cancer. *Oral Oncol* 1997; 33(5): 359-363.
 45. Epstein JB, Gorsky M, Guglietta A, *et al.* The correlation between epidermal growth factor levels in saliva and the

- severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. *Cancer* 2000; 89(11): 2258-2265.
46. Fleckenstein J, Kühne M, Seegmüller K, *et al.* The impact of individual in vivo repair of DNA double-strand breaks on oral mucositis in adjuvant radiotherapy of head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81(5): 1465-1472.
 47. Gonzalez-Arriagada WA, Ramos LMA, Silva AA, *et al.* Salivary BPIFA1 (SPLUNC1) and BPIFA2 (SPLUNC2 A) are modified by head and neck cancer radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2015; 119(1): 48-58.
 48. Handschel J, Prott FJ, Sunderkötter C, *et al.* Irradiation induces increase of adhesion molecules and accumulation of beta(2)-integrin-expressing cells in humans. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45(2): 475-481.
 49. Handschel J, Sunderkötter C, Prott FJ, *et al.* Increase of RM3/1-positive macrophages in radiation-induced oral mucositis. *J Pathol* 2001; 193(2): 242-247.
 50. Ki Y, Kim W, Nam J, *et al.* C-reactive protein levels and radiation-induced mucositis in patients with head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75(2): 393-398.
 51. Li P, Du CR, Xu WC *et al.* Correlation of dynamic changes in gamma-H2AX expression in peripheral blood lymphocytes from head and neck cancer patients with radiation-induced oral mucositis. *Radiat Oncol* 2013; 8: 155.
 52. Lundberg M, Saarilahti K, Mäkitie AA, *et al.* TGF beta 1 genetic polymorphism is associated with survival in head and neck squamous cell carcinoma independent of the severity of chemoradiotherapy induced mucositis. *Oral Oncol* 2010; 46(5): 369-372.
 53. Meirovitz A, Kuten M, Billan S, *et al.* Cytokines levels, Severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer - a prospective pilot study. *Radiat Oncol* 2010; 5:16

54. Mohammed FF, Poon I, Zhang L, *et al.* Acute-phase response reactants as objective biomarkers of radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Head Neck* 2012; 34(7): 985-993.
55. Pratesi N, Mangoni M, Mancini I, *et al.* Association between single nucleotide polymorphisms in the XRCC1 and RAD51 genes and clinical radiosensitivity in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 2011; 99(3): 356-361.
56. Seyyednejad F, Rezaee A, Haghi S, *et al.* Survey of pre-inflammation cytokines levels in radiotherapy-induced-mucositis." *Pak J Biol Sci* 2012; 15(22): 1098-1101.
57. Vuotila T, Ylikontiola L, Sorsa T, *et al.* The relationship between MMPs and pH in whole saliva of radiated head and neck cancer patients. *J Oral Pathol Med* 2002; 31(6): 329-38.
58. Wardman P, Folkes LK, Bentzen SM, *et al.* Influence of plasma glutathione levels on radiation mucositis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51(2): 460-464.
59. Werbrouck J, Ruyck KD, Duprez F, *et al.* Acute Normal Tissue Reactions in Head-and-Neck Cancer Patients Treated With IMRT: Influence of Dose and Association With Genetic Polymorphisms in DNA DSB Repair Genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73(4): 1187-1195.
60. Xanthinaki A, Nicolatou-Galitis O, Athanassiadou P, *et al.* Apoptotic and inflammation markers in oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: Preliminary report. *Support Care Cancer* 2008; 16(9): 1025-1033
61. Von Bültzingsloöwen I, Brennan MT, Spijkervet FKL, *et al.* Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis. *Support Care Cancer* 2006; 14(6): 519-527.
62. Raber-Durlacher JE, von Bültzingslöwen I, Logan RM, *et al.* Systematic review of cytokines and growth factors for the

management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer* 2013; 21:343–355

NORMAS DA REVISTA

International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics

Critical Reviews

Invited contributions from experts in the field exploring interesting topics. Required elements: title page, abstract, manuscript, references, figure captions if figures are present, uniform disclosure forms (1 for each author).

Article limits: abstract (≤ 300 words), manuscript (≤ 6000 words; word count includes abstract, text, and figure captions); references (no restrictions); tables and figures (≤ 10 total, combined).

Article structure

Divide your article into clearly defined sections, listed below. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text."

- *Abstract:* a brief, structured overview of the research conducted, including its purpose, the methods and materials used, the results, and the conclusions drawn.
- *Introduction:* state the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.
- *Methods and Materials:* provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference; only relevant

modifications should be described.

- *Results*: results should be clear and concise.
- *Discussion*: this should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.
- *Conclusions*: the main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.
- *References*: list the references in the order in which they appear in the text, making sure each reference cited is provided and vice versa.
- *Figure Captions*: include a caption for each figure. The caption should consist of a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Be sure to explain all symbols and abbreviations used within the figure.
- *Appendices*: if there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A1), Eq. (A2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A1; Fig. A1, etc.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Footnotes in tables can include definitions of abbreviations, designated footnotes, and table legends, in that order, as needed. Designated footnotes take standard symbols (*, †, ‡, §, ‖, #, **, ††, and so on). Place footnotes to tables below the table body. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not

duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citations in Text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either “Unpublished results” or “Personal communication.” Citation of a reference as “in press” implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be

listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Estratégias de busca com palavras-chave e termos MeSH apropriados

Bases de Dados	Estratégias de Busca
LILACS (25/01/2016)	(cancer) or "CANCER bucal" or "CANCER da boca" or "CANCER da cabeça" or "CANCER da cavidade bucal" or "CANCER da cavidade oral" or "CANCER da faringe" or "CANCER da língua" or "CANCER da orofaringe" or "CANCER das amígdalas palatinas" or "CANCER das glândulas salivares" or "CANCER das parótidas" or "CANCER das tonsila palatinas" or "CANCER de boca" or "CANCER de cabeça e pescoco" or "CANCER de cavidade bucal" or "CANCER de cavidade oral" [Descritor de assunto] and (radioterapia) or "RADIOTERAPIA" [Descritor de assunto] and (mucosite) or "MUCOSITE oral" [Descritor de assunto]
PubMed (25/01/2016)	(cancer OR carcinoma OR neoplasia OR neoplasm OR tumor OR malignancy) AND (radiotherapy OR "radiation therapy" OR "cancer therapy" OR chemoradiotherapy) AND (stomatitis OR mucositis OR "oral mucositis" OR "mucosal barrier injury" OR MBI OR "mucosal injury") AND (biomarker OR biomarkers OR "biological marker" OR peptide OR marker OR molecule OR biomolecule OR cytokine)
Science Direct (25/01/2016)	"head and neck cancer" AND radiotherapy AND "oral mucositis" AND biomarker
Scopus (25/01/2016) Web of Science (25/01/2016)	"head and neck cancer" AND radiotherapy AND "oral mucositis"
Google Acadêmico (01/02/2016)	"head and neck squamous cell carcinoma" AND radiotherapy AND "oral mucositis" AND biomarker
OpenGrey (01/02/2016)	cancer AND radiotherapy AND mucositis
ProQuest (01/02/2016)	(head and neck cancer) AND radiotherapy AND (oral mucositis)

Apêndice 2 – Artigos excluídos e motivos de exclusão (n=17)

Referência	Autor/Ano	Motivos de Exclusão
20	Akmansu <i>et al.</i> , 2005	5
21	Ardito <i>et al.</i> , 2015	3
22	Bonan <i>et al.</i> , 2007	5
23	Bourton <i>et al.</i> , 2011	2
24	Christensen <i>et al.</i> , 1996	5
25	Goutham <i>et al.</i> , 2012	7
26	Hamilton <i>et al.</i> , 2008	5
27	Henke <i>et al.</i> , 2000	7
28	Ho <i>et al.</i> , 2006	6
29	Ikebe <i>et al.</i> , 2012	5
30	Krause <i>et al.</i> , 2015	5
31	Oton-Leite <i>et al.</i> , 2015	5
32	Popanda <i>et al.</i> , 2009	6
33	Sonis <i>et al.</i> , 2007	5
34	Verey <i>et al.</i> , 2011	2
35	Werbrouck <i>et al.</i> , 2011	7
36	Zou <i>et al.</i> , 2012	8

- (1) Diferentes tipos de mucosa, que não mucosa oral, foram avaliadas
- (2) Pacientes com outros tipos de câncer, diferentes de HNC
- (3) Dados não individualizados para HNC
- (4) Apenas quimioterapia foi usada como tratamento do câncer
- (5) Nenhuma correlação entre biomarcadores e severidade/risco de desenvolvimento de mucosite oral
- (6) Revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livro, e resumos de conferência
- (7) Associação entre biomarcadores e mucosite oral em estudos experimentais (ensaios clínicos, estudos *in vitro* ou *in vivo* em animais)
- (8) Restrições de linguagem

Apêndice 3 – Risco de viés avaliado pela ferramenta de avaliação crítica *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument (MAStARI)* [17].

Questão	Resposta*												
	Bhattathiri <i>et al.</i>	Chen <i>et al.</i>	Chen <i>et al.</i>	Chethana <i>et al.</i>	Citrin <i>et al.</i>	Dumbrigue <i>et al.</i>	Ehrsson <i>et al.</i>	Epstein <i>et al.</i>	Epstein <i>et al.</i>	Fleckenstein <i>et al.</i>	Gonzalez <i>et al.</i>	Handschel <i>et al.</i>	Handschel <i>et al.</i>
1. A amostra é representativa dos pacientes na população como um todo?	N	S	S	S	N	N	S	S	S	S	S	N	N
2. Os pacientes estão em um ponto similar no curso da sua condição/doença?	S	S	S	N	S	S	S	S	S	N	N	S	S
3. O viés foi minimizado em relação à seleção dos casos e controles?	NA	NA	NA	S	NA	S	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA
4. Fatores de confundimento são identificados e estratégias para lidar com eles são determinados?	S	S	S	N	S	S	S	S	S	N	N	S	S
5. Os desfechos são avaliados usando critério objetivo?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6. O acompanhamento é realizado durante um período de tempo suficiente?	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7. Os desfechos das pessoas retiradas são descritos e incluídos na análise?	NA	NA	NA	NA	NA	S	N	S	S	NA	S	NA	NA
8. Os desfechos são medidos de uma maneira confiável?	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9. É usada análise estatística apropriada?	N	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S
% sim/risco	57/ M	100 /B	100 /B	63/ M	71/ B	89 /B	88/ B	100 /B	100 /B	71/ B	78/ B	86/ B	86/ B

*S=Sim, N=Não, I=Indefinido, NA=Não aplicável.

Risco de viés foi categorizado como **Alto (A)** quando o estudo atingisse até 49% de pontuação “sim”, **Moderado (M)** quando o estudo atingisse entre 50% e 69% de pontuação “sim”, e **Baixo (B)** quando o estudo atingisse mais que 70% da pontuação “sim”.

Apêndice 3 – Risco de viés avaliado pela ferramenta de avaliação crítica *Meta Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument (MAStARI)* [17]. (Continuação)

Questão	Resposta*												
	Jehlich <i>et al.</i>	Ki <i>et al.</i>	Li <i>et al.</i>	Lundberg <i>et al.</i>	Meirovitz <i>et al.</i>	Mohammed <i>et al.</i>	Pratesi <i>et al.</i>	Seyyednejad <i>et al.</i>	Venketesh <i>et al.</i>	Vuotila <i>et al.</i>	Wardman <i>et al.</i>	Werbrouck <i>et al.</i>	Xanthinaki <i>et al.</i>
1. A amostra é representativa dos pacientes na população como um todo?	S	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S
2. Os pacientes estão em um ponto similar no curso da sua condição/doença?	N	S	N	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N
3. O viés foi minimizado em relação à seleção dos casos e controles?	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA
4. Fatores de confundimento são identificados e estratégias para lidar com eles são determinados?	N	S	N	S	S	N	N	N	S	S	S	N	N
5. Os desfechos são avaliados usando critério objetivo?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6. O acompanhamento é realizado durante um período de tempo suficiente?	I	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	I	S
7. Os desfechos das pessoas retiradas são descritos e incluídos na análise?	NA	N	N	N	S	NA	NA	NA	NA	N	N	NA	NA
8. Os desfechos são medidos de uma maneira confiável?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9. É usada análise estatística apropriada?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
% sim/risco	57/ M	88/ B	63/ M	88/ B	88/ B	71/ B	57/ M	71/ B	71/ B	88/ B	89/ B	57/ M	57/ M

*S=Sim, N=Não, I=Indefinido, NA=Não aplicável.

Risco de viés foi categorizado como **Alto (A)** quando o estudo atingisse até 49% de pontuação “sim”, **Moderado (M)** quando o estudo atingisse entre 50% e 69% de pontuação “sim”, e **Baixo (B)** quando o estudo atingisse mais que 70% da pontuação “sim”.

Apêndice 4 – Frequência dos biomarcadores nos estudos incluídos

Biomarcadores	# de estudos	Estudos Incluídos (Autor/Ano)
Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)	4	Citrin <i>et al</i> , 2012; Dumbrigue <i>et al</i> , 2000; Epstein <i>et al</i> , 1997; Epstein <i>et al</i> , 2000.
Proteína C-Reativa (CRP)	4	Chethana <i>et al</i> , 2015; Ehrsson <i>et al</i> , 2010; Ki <i>et al</i> , 2009; Mohammed <i>et al</i> , 2012.
Polimorfismos Genéticos	4	Lundberg <i>et al</i> , 2010; Pratesi <i>et al</i> , 2011; Venkatesh <i>et al</i> , 2014; Werbrouck <i>et al</i> , 2009.
Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)	4	Citrin <i>et al</i> , 2012; Meirovitz <i>et al</i> , 2010; Seyyednejad <i>et al</i> , 2012; Xanthinaki <i>et al</i> , 2008.
Taxa de Sedimentação de Eritrócitos (ESR)	3	Chethana <i>et al</i> , 2015; Ki <i>et al</i> , 2009; Mohammed <i>et al</i> , 2012.
Interleucina 1 (IL-1/IL-1β)	3	Meirovitz <i>et al</i> , 2010; Seyyednejad <i>et al</i> , 2012; Xanthinaki <i>et al</i> , 2008.
Fator de Crescimento Transformador Beta 1(TGF- β1)	2	Chen <i>et al</i> , 2005; Chen <i>et al</i> , 2008.
Interleucina 6 (IL-6)	2	Citrin <i>et al</i> , 2012; Meirovitz <i>et al</i> , 2010.
Interleucina 8 (IL-8)	2	Citrin <i>et al</i> , 2012; Meirovitz <i>et al</i> , 2010.
Interleucina 10 (IL-10)	2	Citrin <i>et al</i> , 2012; Meirovitz <i>et al</i> , 2010.
γ-H2AX	2	Fleckenstein <i>et al</i> , 2011; Li <i>et al</i> , 2013.
Metaloproteinases de Matriz (MMPs)	2	Jehmlich <i>et al</i> , 2015; Vuotila <i>et al</i> , 2002.
Glutathiona (GSH)	1	Bhattathiri <i>et al</i> , 1994;

Apêndice 4 – Frequência dos biomarcadores nos estudos incluídos
(Continuação)

Biomarcadores	# de estudos	Estudos Incluídos (Autor/Ano)
Proteína Quimiotática de Monócitos (MCP)	1	Citrin <i>et al</i> , 2012
Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	1	Citrin <i>et al</i> , 2012
Interleucina 4 (IL-4)	1	Citrin <i>et al</i> , 2012
Proteínas Totais (TP)	1	Dumbrigue <i>et al</i> , 2000.
Albumina	1	Ehrsson <i>et al</i> , 2010.
Fator de Crescimento Insulínico 1 (IGF-1)	1	Ehrsson <i>et al</i> , 2010.
Fator de Crescimento insulínico tipo I ligado a Proteína (IGFBP-1)	1	Ehrsson <i>et al</i> , 2010.
Bactericidal or Permeability-Increasing protein Family A (BPIFA)	1	González <i>et al</i> , 2015.
Moléculas de Adesão	1	Handschel <i>et al</i> , 1999.
Subpopulações de Macrófagos	1	Handschel <i>et al</i> , 2001.
Antioxidantes Plasmáticos	1	Wardman <i>et al</i> , 2001.
p53	1	Xanthinaki <i>et al</i> , 2008.
B-cell lymphoma 2 (BCI-2)	1	Xanthinaki <i>et al</i> , 2008.
Myeloid Cell Leukemia 1(MCI-1)	1	Xanthinaki <i>et al</i> , 2008.

Apêndice 4 – Frequência dos biomarcadores agrupados nos estudos incluídos (Continuação)

Biomarcadores	# de estudos	Estudos Incluídos (Autor/Ano)
Fatores de Crescimento (EGF, VEGF, TGF-β1, IGF-1, IGFBP-1)	7	Chen <i>et al.</i> , 2005; Chen <i>et al.</i> , 2008; Citrin <i>et al.</i> , 2012; Dumbrigue <i>et al.</i> , 2000; Ehrsson <i>et al.</i> , 2010; Epstein <i>et al.</i> 1997; Epstein <i>et al.</i> , 2000;
Marcadores Inflamatórios (CRP, ESR, MMP, Albumina, MCP)	7	Chethana <i>et al.</i> , 2015; Citrin <i>et al.</i> , 2012; Ehrsson <i>et al.</i> , 2010; Jehmlich <i>et al.</i> , 2015; Ki <i>et al.</i> , 2009; Mohammed <i>et al.</i> , 2012; Vuotila <i>et al.</i> , 2002;
Fatores Genéticos (Polimorfismos Genéticos, γ-H2AX)	6	Fleckenstein <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2013; Lundberg <i>et al.</i> , 2010; Pratesi <i>et al.</i> , 2011; Venkatesh <i>et al.</i> , 2014; Werbrouck <i>et al.</i> , 2009.
Citocinas (IL-1, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, TNF-α)	4	Citrin <i>et al.</i> , 2012; Meirovitz <i>et al.</i> , 2010; Seyyednejad <i>et al.</i> , 2012; Xanthinaki <i>et al.</i> , 2008.
Proteínas Gerais (TP, BPIFA, moléculas de adesão)	3	Dumbrigue <i>et al.</i> , 2000; González <i>et al.</i> , 2015; Handschel <i>et al.</i> , 1999.
Antioxidantes Plasmáticos (GSH, Cisteína, Ácido Úrico, Ascorbato)	2	Bhattathiri <i>et al.</i> , 1994; Wardman <i>et al.</i> , 2001.
Células pro-apoptóticas (p53) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Mcl-1)	1	Xanthinaki <i>et al.</i> , 2008.
Células (subpopulações de macrófagos)	1	Handschel <i>et al.</i> , 2001.

Apêndice 5 – Instrumento “Grading of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation” (GRADE)

# de estudos	Delimitação dos estudos	Avaliação da Qualidade					# de pacientes		Efeito		Qualidade	Importância
		Risco de Viés	Inconsistência	Evidência Indireta	Imprecisão	Outras considerações	Pacientes com HNC	Controles	Relativo (95% IC)	Absoluto (95% IC)		
26	Estudos Observacionais	Grave ₁	Grave ₂	Não Grave	Não Grave	Forte associação; Toda confusão residual plausível sugere suposto efeito, enquanto nenhum efeito foi observado; Gradiente de dose-resposta	1.007	78	Não Estimável	Não Estimável	⊕⊕⊕○ MODERADO	Estamos moderadamente confiantes no efeito estimado

IC: Intervalo de Confiança

1. A maioria dos estudos não identificou fatores de confundimento, nem descreveu os desfechos das pessoas que foram removidas do estudo. Sete estudos foram classificados como moderado risco de viés.
2. A heterogeneidade dos biomarcadores e dos métodos tornou difícil comparar uma quantidade significativa de estudos sobre o mesmo marcador.

Graus de evidência do GRADE:

Alta Qualidade: Nós estamos muito confiantes de que o verdadeiro efeito está perto da estimativa do efeito.

Qualidade Moderada: Estamos moderadamente confiantes na estimativa do efeito: o verdadeiro efeito provavelmente está perto da estimativa do efeito, mas existe a possibilidade de que seja substancialmente diferente.

Baixa Qualidade: Nossa confiança na estimativa do efeito é limitada: o verdadeiro efeito pode ser substancialmente diferente da estimativa do efeito.

Muito baixa qualidade: Nós temos muito pouca confiança na estimativa do efeito: o verdadeiro efeito é provavelmente substancialmente diferente da estimativa do efeito.