

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

PEDRO RENATO BODO DE PAIVA

ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DO BIOFILME MICROCOSMO DE  
ESMALTE IRRADIADO E NÃO IRRADIADO *IN VITRO* APÓS TRATAMENTO COM  
DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SALIVA ARTIFICIAL

BAURU

2020

PEDRO RENATO BODO DE PAIVA

ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DO BIOFILME MICROCOSMO DE  
ESMALTE IRRADIADO E NÃO IRRADIADO *IN VITRO* APÓS TRATAMENTO COM  
DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SALIVA ARTIFICIAL

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte dos requisitos  
para obtenção do título de bacharel em  
Biomedicina - Centro Universitário  
Sagrado Coração.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Barbosa  
Nicolielo

Coorientadora: Profa. Dra. Marília Afonso  
Rabelo Buzalaf

BAURU

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Paiva, Pedro Renato Bodo de

Análise da viabilidade celular do biofilme microcosmo de esmalte irradiado e não irradiado in vitro após tratamento com diferentes formulações de saliva artificial / Pedro Renato Bodo de Paiva. -- 2020.

40f. : il.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Daniela Barbosa Nicolielo

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) -  
Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP

1. Saliva. 2. Saliva artificial 3. Biofilme dentário. 4. Cárie dentária. I.  
Nicolielo, Daniela Barbosa. II. Buzalaf, Marília Afonso Rabelo. III.  
Título.

PEDRO RENATO BODO DE PAIVA

ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DO BIOFILME MICROCOSMO DE  
ESMALTE IRRADIADO E NÃO IRRADIADO *IN VITRO* APÓS TRATAMENTO COM  
DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SALIVA ARTIFICIAL

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte dos requisitos  
para obtenção do título de bacharel em  
Biomedicina - Centro Universitário  
Sagrado Coração.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Daniela Barbosa Nicolielo (Orientadora)  
Centro Universitário Sagrado Coração

---

Ma. Natara Dias Gomes da Silva  
Universidade de São Paulo: Faculdade de Odontologia de Bauru

Dedico este trabalho aos meus pais, professores e orientadores que me acompanharam durante minha formação acadêmica.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais pelo suporte e incentivo durante o curso, sem eles nada do que fiz seria possível e só cheguei até aqui devido a seu apoio.

À Ma. Natara Dias Gomes da Silva e Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf por terem me confiado a oportunidade de desenvolver um projeto de iniciação científica possibilitando meus primeiros passos no meio acadêmico.

Sou grato ao CNPq pelo apoio financeiro nas etapas iniciais deste projeto através de bolsa de auxílio e a minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Barbosa Nicolielo, que me auxiliou na dissertação deste trabalho.

Por fim, sou grato a todos os professores que conheci ao longo desses quatro anos de curso sendo grato por todo conhecimento transmitido durante esse período.

## RESUMO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é uma enfermidade com número de casos crescente no Brasil sendo a radioterapia o tratamento de maior eficácia para reverter sua evolução, porém ela pode prejudicar o funcionamento das glândulas salivares causando hipossalivação e, conseqüentemente, o desenvolvimento de cáries com progressão rápida mesmo após o término do tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes formulações de saliva artificial na viabilidade celular do biofilme microcosmo formado *in vitro* em esmalte irradiado e não irradiado, a partir de biofilme de participantes com CCP, submetidos à radioterapia, com hipossalivação e participantes saudáveis. Para tanto, foram utilizados espécimes de esmalte bovino irradiado e não irradiado (n = 108 blocos cada) divididos entre os Grupos A (participantes saudáveis) e B (participantes com CCP). O biofilme foi formado por 5 dias utilizando saliva McBain (2009) com sacarose a 0,2% (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) e, a cada 24 h, foi submetido por 60 s com as seguintes formulações: a) Apenas constituintes inorgânicos (SA); b) SA com cistatina de cana-de-açúcar CaneCPI-5 a 0,1 mg/mL (SA+Cane); c) SA com Hemoglobina a 1,0 mg/mL (SA+Hb); d) SA com CaneCPI-5 a 0,1 mg/mL e Hemoglobina a 1,0 mg/mL (SA+Cane+Hb); e) Fórmula comercial Biotène® (BTN). O Controle (CTR) com água também foi realizado. Ao final do período, o biofilme foi avaliado através do método da resazurina e os dados foram analisados por ANOVA a três critérios (p < 0,05). As análises evidenciaram uma interação significativa entre o tipo de biofilme e os tratamentos (p = 0,011). Além disso o biofilme do Grupo B demonstrou uma viabilidade celular (VC) reduzida em comparação ao Grupo A. Para o Grupo A nenhum dos tratamentos promoveu alteração significativa na VC em comparação ao CTR. Para o Grupo B, os tratamentos SA+Cane+Hb (p = 0,001) e BNT (p = 0,022) reduziram significativamente a VC em relação ao CTR. Logo, quando se pretende avaliar formulações de saliva artificial para pacientes com CCP é necessário a utilização do inóculo de biofilme específico deste grupo. Além disso, as proteínas CaneCPI-5 e Hemoglobina em associação se mostraram eficazes em reduzir a VC deste tipo de biofilme sendo potenciais candidatas para a inserção em formulações de saliva artificial para pacientes com CCP e com hipossalivação.

**Palavras-chave:** Saliva. Saliva artificial. Biofilme dentário. Cárie dentária.

## ABSTRACT

Head and neck cancer (HNC) is a disease with an increasing number of cases in Brazil, with radiotherapy being the most effective treatment to reverse its evolution, but it can impair the functioning of the salivary glands causing hyposalivation and, consequently, the development of cavities with rapid progression even after the end of treatment. The objective of this study was to evaluate the effect of different formulations of artificial saliva on the cell viability of the microcosm biofilm formed *in vitro* in irradiated and non-irradiated enamel, from biofilm of participants with HNC, submitted to radiotherapy, with hyposalivation and healthy participants. For that, specimens of irradiated and non-irradiated bovine enamel (n = 108 blocks each) were used, divided into Group A (healthy participants) and B (participants with HNC). The biofilm was formed for 5 days using McBain saliva (2009) with sucrose 0.2% (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) and, every 24 h, it was submitted for 60 s with the following formulations: a) Only inorganic constituents (SA); b) SA with CaneCPI-5 sugarcane cystatin at 0.1 mg/mL (SA+Cane); c) SA with Hemoglobin at 1.0 mg/mL (SA+Hb); d) SA with CaneCPI-5 at 0.1 mg/mL and Hemoglobin at 1.0 mg/mL (SA+Cane+Hb); e) Biotène® commercial formula (BTN). The Control (CTR) with water was also performed. At the end of the period, the biofilm was evaluated using the resazurin method and the data were analyzed by ANOVA using three criteria (p < 0.05). The analyzes showed a significant interaction between the type of biofilm and the treatments (p = 0.011). In addition, Group B biofilm demonstrated reduced cell viability (CV) compared to Group A. For Group A none of the treatments promoted a significant change in CV compared to CTR. For Group B, the treatments SA+Cane+Hb (p = 0.001) and BNT (p = 0.022) significantly reduced CV compared to CTR. Therefore, when it is intended to evaluate artificial saliva formulations for patients with HNC, it is necessary to use the biofilm specific inoculum of this group. In addition, the proteins CaneCPI-5 and Hemoglobin in combination proved to be effective in reducing the CV of this type of biofilm and are potential candidates for insertion in artificial saliva formulations for patients with HNC and hyposalivation.

**Keywords:** Saliva. Artificial saliva. Dental biofilm. Dental cavity.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 A) Cortadeira (Maruto, Tokyo); B) Dente bovino selecionado para o corte; C) Coroa separada da raiz após etapa de corte. ....	18
Figura 2 A) Cortadeira de precisão com discos diamantados; B) Coroa fixada em disco de resina; C) Espécime de esmalte no tamanho 4 x 4 mm.....	18
Figura 3 A) Secção cérvico-incisal; B) Secção mesio-distal; C) Espécimes de esmalte 4 x 4 mm. ....	19
Figura 4 A) Politriz metalográfica; B) Lixas de granulações 320 e 600 (Extec, EUA) utilizadas para planificação e polimento; C) Amostra de esmalte bovino fixada em disco de resina após etapa de polimento. ....	19
Figura 5 Sistema de limpeza por ultrassom. ....	20
Figura 6 Perfilômetro de contato utilizado na análise de rugosidade média de superfície (Ra).....	20
Figura 7 Exemplo de análise de uma amostra no software MarSurf XCR20.....	21
Figura 8 A) Amostra de esmalte bovino protegido em 2/3 da superfície com esmalte cosmético de unha; B) Identificação da amostra no verso do espécime.....	21
Figura 9 Espécimes de esmalte bovino dispostos na placa de cultivo segundo a aleatorização: a) Linha A: Esmalte não irradiado com biofilme Grupo A; b) Linha B: Esmalte não irradiado com biofilme Grupo B; c) Linha C: Esmalte irradiado com biofilme Grupo A; d) Linha D: Esmalte irradiado com biofilme Grupo B; e) Coluna 1: CTR; f) Coluna 2: Apenas SA; g) Coluna 3: SA + CaneCPI-5 a 0,1 mg/mL; h) Coluna 4: SA + Hemoglobina a 1,0 mg/mL; i) Coluna 5: SA + CaneCPI-5 a 0,1 mg/mL + Hemoglobina a 1,0 mg/mL; j) Coluna 6: Formulação comercial Biõtene <sup>®</sup> . ....	23
Figura 10 Placa de cultivo contendo biofilme microcosmo após incubação por 2 h com o corante resazurina. ....	24
Gráfico 1 Porcentagem de redução na viabilidade celular do biofilme microcosmo pelo método da resazurina por tratamento aplicado e biofilme utilizado. Resultados apresentados como média ± erro padrão. As letras minúsculas indicam diferença significativa detectada.....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores de p para as diferentes condições avaliadas: Tipo de esmalte (irradiado e não irradiado), Tipo de biofilme (Grupo A e Grupo B) e Tratamentos (CTR, SA, SA+Cane, SA+Hb, SA+Cane+Hb e BTN). * indica diferença significativa entre os fatores avaliados, considerando análise estatística ANOVA a três critérios ( $p < 0,05$ ). .....	26
Tabela 2 Viabilidade celular (%) nos diferentes tratamentos experimentais para o Grupo A e Grupo B, independentemente do tipo de esmalte bovino utilizado (esmalte irradiado e não irradiado). Resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIF	Base de intensidade de fluorescência
BTN	Biotène®
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
Cane	CaneCPI-5
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CTR	Controle
DP	Desvio-padrão
Hb	Hemoglobina
IF	Intensidade de fluorescência
INCA	Instituto Nacional do Câncer
SA	Saliva artificial
VC	Viabilidade celular

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	OBJETIVOS .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL .....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	15
3.2	PARTICIPANTES .....	15
3.3	COLETA DE BIOFILME .....	16
3.4	PRODUÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE SALIVAS ARTIFICIAIS.....	16
3.5	PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE.....	17
3.5.1	Seleção dos dentes .....	17
3.5.2	Corte e padronização das amostras .....	17
3.5.3	Irradiação e proteção de áreas híginas .....	21
3.5.4	Esterilização .....	22
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	22
3.7	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DA RESAZURINA .....	24
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4	RESULTADOS .....	25
5	DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	27
	REFERÊNCIAS.....	30
	ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS.....	33
	ANEXO B: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA: EMENDA DE ALTERAÇÃO NA METODOLOGIA, OBJETIVOS E TCLE .....	38

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), "...câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos ...", dentre essas doenças está o câncer de cabeça e pescoço (CCP) denominação dada ao conjunto de tumores que se manifestem na região da cabeça e pescoço como faringe, laringe, orofaringe, glândulas salivares dentre outros.

O diagnóstico do CCP mostra-se crescente a cada ano. Em 2020 as estimativas fornecidas pelo INCA mostram-no como o segundo câncer mais recorrente em homens e estima-se cerca de 7.650 novos casos de câncer de laringe e 15.190 novos casos de câncer de cavidade oral ocorrerão para cada ano do triênio de 2020-2022.

Por configurar um importante problema de saúde pública, diversas abordagens terapêuticas vêm sendo utilizadas no tratamento do CCP como a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia ou a combinação dos métodos citados. A radioterapia consiste na utilização de radiações ionizantes no local afetado para combater neoplasias malignas e é normalmente empregada no tratamento de pacientes com CCP visto sua eficácia na preservação de estruturas importantes presentes na região de cabeça e pescoço (Lieshout e Bots, 2014). Apesar dos benefícios da radioterapia, diversos efeitos colaterais indesejados podem surgir a partir deste tratamento como irritação na mucosa bucal, perda do paladar, xerostomia, hipossalivação, cáries de radiação, entre outros (Jham e Freire, 2006), impactando negativamente a qualidade de vida desses indivíduos.

Sendo a saliva um fluido complexo que tem papel importante na manutenção da saúde bucal devido às múltiplas funções que desempenha (Buzalaf et al., 2012), qualquer alteração na quantidade e/ou qualidade desse fluido decorrente do tratamento por radioterapia pode resultar em complicações na saúde bucal dos pacientes com CCP (Pow et al., 2003; Liang et al., 2016).

Estudos relatam que a redução do fluxo salivar (hipossalivação) pode prejudicar os tecidos duros e moles da cavidade bucal bem como modificar a microflora existente, facilitando a proliferação de bactérias cariogênicas (Nagler, 2002). Ainda, a alteração na composição dos eletrólitos da saliva como o bicarbonato, o qual é responsável pela regulação do pH da cavidade bucal, e o

cálcio e o fosfato, os quais participam dos processos de desmineralização e remineralização dentária, pode favorecer a instauração de cáries (Deng et al., 2015).

Além das alterações de fluxo salivar, os pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço também podem desenvolver as cáries de radiação. O principal fator para o aparecimento de tais lesões é não somente devido à diminuição de saliva, mas uma combinação de hipossalivação e efeitos diretos da radiação no tecido dental duro, tornando-os mais suscetíveis à desmineralização (Silverman, 1999; Gonçalves et al., 2014).

Assim, devido ao potencial cariogênico que acomete esse grupo e por já apresentarem outras complicações decorrentes da radioterapia, a busca por soluções que visem à melhora na qualidade de vida desses pacientes torna-se necessária. Nesse sentido, diversas formulações de saliva artificial têm sido desenvolvidas e comercializadas, visando proporcionar lubrificação suficiente para manter os tecidos orais úmidos e protegidos da agressão mecânica e química, assim como impedir a colonização de bactérias cariogênicas (Diaz-Arnold et al., 2002). A Biotène<sup>®</sup>, formulação comercial de saliva artificial, utilizava enzimas antimicrobianas em sua composição (<http://www.biotene.co.uk/>) e trabalhos na literatura indicavam que sua utilização podia melhorar a qualidade de vida de pacientes irradiados (Hahnel et al., 2009; Aykut-Yetkiner et al., 2014). Entre as salivas artificiais vendidas, a Biotène<sup>®</sup> é uma marca que existe em forma de gel, pasta dentífrica e solução de bochecho (<http://www.biotene.co.uk/>). A solução de bochecho dessa marca não contém álcool, o que evita que se sinta ardência na sua utilização. Apesar de ter sido demonstrado que sua utilização pode melhorar os sintomas da xerostomia induzido pela radiação, os resultados ainda são bastante controversos (Epstein et al., 1999; Hahnel et al., 2009; Aykut-Yetkiner et al., 2014).

Na busca por uma saliva artificial que reúna todas as características ideais da saliva natural, muitos esforços têm sido empregados na investigação de substâncias que tenham potencial protetor da estrutura dentária e que possam ser utilizadas em produtos odontológicos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou proteínas da película adquirida (PAE) com potencial protetor contra a desmineralização dentária, como a cistatina B (Delecrode et al., 2015) e a hemoglobina (Martini, 2019). Em decorrência do elevado custo da cistatina B, uma cistatina derivada da cana de açúcar foi obtida pelo nosso grupo: a CaneCPI-5. Esta, por sua vez, demonstrou forte aderência ao esmalte e promoveu diminuição

significativa nos processos iniciais de erosão (Santiago et al., 2017). Tais características tornam essas proteínas substâncias em potencial para serem inseridas em formulações de saliva artificial para indivíduos com CCP.

Em suma, os pacientes com CCP irradiados acabam desenvolvendo um quadro de xerostomia e/ou hipossalivação, além de se tornarem mais suscetíveis a doenças bucais, infecções e cárie. No mercado há uma gama de opções para aliviar as sensações provenientes das modificações do fluxo salivar, porém há uma carência de produtos que comprovadamente auxiliem na prevenção e/ou redução dos quadros de cárie apresentados por estes indivíduos. Logo, torna-se vital o desenvolvimento de novas formulações de saliva artificial voltada para as necessidades de pacientes com CCP tratados com radioterapia, amenizando as consequências oriundas do tratamento e, conseqüentemente, melhorando sua qualidade de vida. Neste aspecto, a CaneCPI-5 e a hemoglobina são substâncias que tem o potencial de serem inclusas nessas novas formulações devido a suas características protetivas do esmalte dental.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes formulações de saliva artificial na viabilidade celular do biofilme microcosmo de esmalte irradiado e não irradiado formado *in vitro*, a partir de inóculo de biofilme de participantes saudáveis e participantes diagnosticados com CCP, submetidos à radioterapia.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a viabilidade celular do biofilme microcosmo nos diferentes tipos de esmalte (esmalte irradiado e não irradiado), tipos de biofilme (participantes saudáveis e participantes com CCP) e tratamentos;
- Analisar as interações existentes entre os diferentes fatores (tipos de esmalte, tipos de biofilme e tratamentos) na viabilidade celular do biofilme microcosmo.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ASPECTOS ÉTICOS**

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – CEP-FOB/USP (CAAE: 86782618.4.0000.5417) e pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa com Animais – CEP-FOB/USP (009/2018), sendo este processo fundamental para a realização de estudos envolvendo seres humanos e dentes bovinos, respectivamente.

#### **3.2 PARTICIPANTES**

Os participantes foram selecionados com base nos critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos e foram divididos em dois grupos, sendo eles: 1) Grupo A: Participantes com boa saúde geral e bucal (não fumantes, sem cárie, gengivite e periodontite ou outra condição bucal que possa afetar a composição da saliva) e que não estejam fazendo uso de medicamentos ou drogas, com fluxo salivar normal (não estimulado  $> 0,1$  mL/min e estimulado  $> 1,0$  mL/min), e 2) Grupo B: Participantes diagnosticados com CCP submetidos ao tratamento por radioterapia por 2 a 5 semanas (180 cGY diário, com dose total máxima entre 5.700 e 7.500 cGY, dose padrão de radioterapia de cabeça e pescoço) (Shyh-An Yeh, 2010). Como critério de inclusão, devem apresentar hipossalivação (fluxo salivar não estimulado  $< 0,1$  mL/min e fluxo salivar estimulado  $< 1,0$  mL/min).

Dessa forma, o Grupo A foi constituído por dois participantes recrutados no serviço de Triagem da Faculdade de Odontologia de Bauru FOB/USP, com boa saúde geral e foram pareados em idade ( $54,5 \pm 4,9$  anos; média  $\pm$  DP) e sexo (masculino) com os integrantes do Grupo B. Por sua vez, o Grupo B foi constituído por dois participantes diagnosticados com CCP e submetidos ao tratamento com radioterapia e recrutados no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) da Faculdade de Odontologia de Bauru FOB/USP. Os participantes eram do sexo masculino, com idade média de  $53,5 \pm 6,4$  anos (média  $\pm$  DP), parcialmente dentados e com hipofunção glândula salivar. A coleta foi realizada na 17<sup>o</sup> (3.060 cGY) e 25<sup>o</sup> (4.500 cGY) sessão de radioterapia e ambos apresentavam histórico de tabagismo e/ou



etilismo. Para participar da pesquisa, todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### 3.3 COLETA DE BIOFILME

Anteriormente à coleta de biofilme, os participantes foram orientados a não escovar os dentes por 24 h e se abster da ingestão alimentos sólidos e líquidos nas 2 h anteriores do procedimento. Para a coleta do biofilme foi utilizado o protocolo descrito por Signori et al. (2016). O biofilme de ambos os grupos foi coletado no período da manhã (9 – 10h) através de cureta odontológica e foi armazenado em microtubos pré-pesados. Posteriormente, o biofilme coletado foi pesado, diluído em solução salina (NaCl 0,9%; proporção de 2 mg de biofilme para 1 mL de salina) e as amostras foram homogeneizadas por sonicação (5% de amplitude, 3 pulsos de 9,9 s cada). As amostras dos dois participantes de cada grupo foram coletadas para constituir um *pool* de biofilme e foram misturados com 30% de glicerol (v/v). Alíquotas de 1 mL foram armazenadas a -80°C para uso posterior (Pratten et al., 2003).

### 3.4 PRODUÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE SALIVAS ARTIFICIAIS

As formulações de saliva artificiais foram confeccionadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru FOB/USP apresentando a seguinte formulação base: NaHCO<sub>3</sub> 0,219%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,127%, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,0654%, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,0125%, KCl 0,082%, carboximetilcelulose 0,8% e água deionizada (q.s.p.). Como conservantes, foram adicionados o metilparabeno e o propilparabeno, ambos na concentração de 0,01% e para conferir sabor, foi utilizado o saborizante de menta. O pH da formulação final foi ajustado para 7,0 e tanto os conservantes quanto o saborizante foram adicionados na solução placebo (CTR).

As proteínas testadas foram a CaneCPI-5 na concentração de 0,01% (0,1 mg/mL) e a hemoglobina humana na concentração de 0,1% (1 mg/mL). A seleção e a concentração de ambas as proteínas foram determinadas em estudos recentes pelo nosso grupo de pesquisa no qual constatou-se uma alta força de adesão ao esmalte e sua capacidade de reduzir a erosão inicial *in vitro* (Santiago et al., 2017; Martini et al., 2019). A CaneCPI-5 foi obtida a partir da cana-de-açúcar, por

clonagem e expressão heteróloga (Santiago et al., 2017) e a hemoglobina humana foi adquirida através do catálogo da Sigma (cat #H7379), sendo que ambas foram adicionadas à formulação de saliva artificial tanto isoladamente quanto em combinação.

Por fim, como controle comercial, foi utilizada a formulação Biotène® na forma de colutório, a qual foi adquirida em farmácia convencional. Apesar deste produto ser classificado como hidratante bucal (Giafferis et al., 2017), sua seleção foi definida com base em trabalhos que indicam que os produtos da marca Biotène® tem melhorado ou aliviado os sintomas da boca seca em pacientes que sofrem de xerostomia e hipossalivação, resultantes da radioterapia (Epstein et al., 1999; Warde et al., 2000; Shahdad et al., 2005).

### **3.5 PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE**

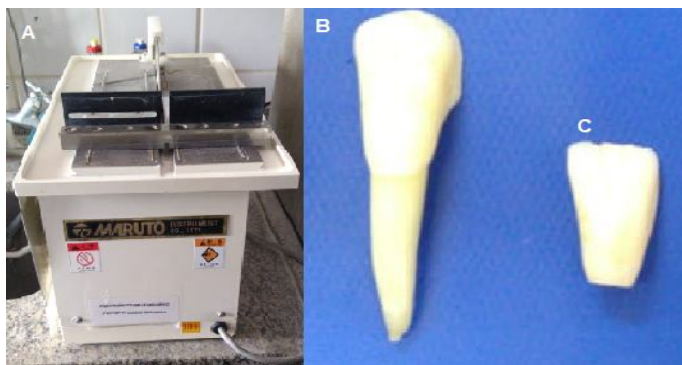
#### **3.5.1 Seleção dos dentes**

Como modelo representativo foram utilizados dentes bovinos previamente extraídos e armazenados em solução de timol a 0,1% (pH 7,0) em ambiente refrigerado. Os dentes foram submetidos a uma seleção visual, excluindo as unidades que apresentassem manchas e/ou trincas. A partir dos dentes selecionados, foi realizada a sua limpeza para remover qualquer resíduo remanescente de tecido.

#### **3.5.2 Corte e padronização das amostras**

Foram processados 108 dentes bovinos através de uma cortadeira (Maruto, Tokyo) para a separação de raiz e coroa (Figura 1). Após o corte, as coroas foram armazenadas em timol 0,1% (pH 7,0) para evitar sua desmineralização até a inicialização da próxima etapa.

**Figura 1** A) Cortadeira (Maruto, Tokyo); B) Dente bovino selecionado para o corte; C) Coroa separada da raiz após etapa de corte.



Fonte: Elaborado pelo autor

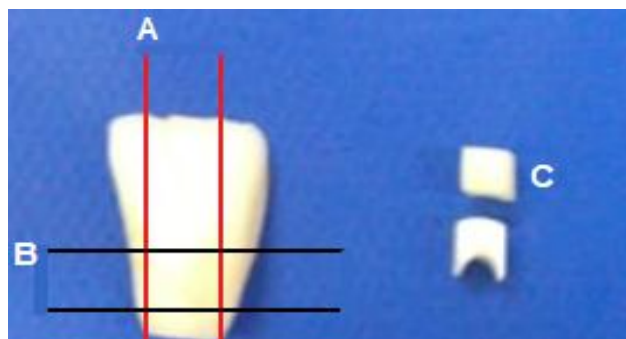
Na etapa de corte, as coroas foram processadas para a obtenção de 216 espécimes, sendo 108 blocos para compor o grupo de esmalte irradiado (4 mm x 4 mm) e 108 blocos para compor o grupo de esmalte não irradiado (4 mm x 4 mm). Para isso, foi utilizado uma cortadeira de precisão (Buehler, EUA) e discos diamantados (Odeme, EUA). As coroas foram coladas em discos de resina com cola elástica Godiva e fixadas na cortadeira (Figura 2). Em seguida, foi realizada uma secção dupla no sentido cérvico-incisal e duas no sentido méso-distal para obter dois espécimes a partir de uma coroa de dente bovino (Figura 3).

**Figura 2** A) Cortadeira de precisão com discos diamantados; B) Coroa fixada em disco de resina; C) Espécime de esmalte no tamanho 4 x 4 mm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

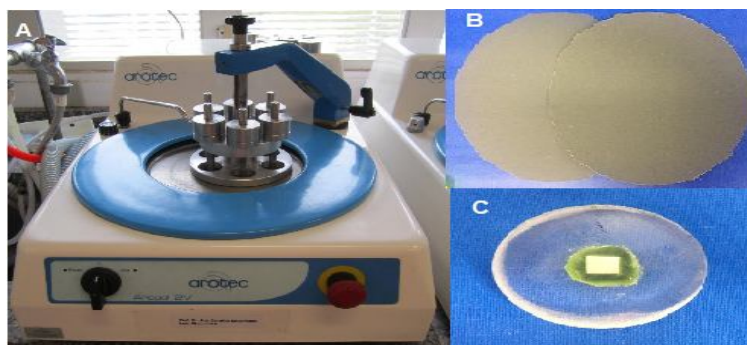
**Figura 3** A) Secção cérvico-incisal; B) Secção mesio-distal; C) Espécimes de esmalte 4 x 4 mm.



Fonte: Elaborado pelo autor

Posteriormente ao corte, os 216 espécimes obtidos foram fixados em discos de resina com cera odontológica, com a face da dentina interna do esmalte exposta para a etapa de planificação através de politriz metalográfica (Arotec, Brasil) e lixa de granulação 320 (Extec, EUA). Depois, os espécimes foram reposicionados no disco de resina com a face do esmalte voltada para cima. Os espécimes foram polidos utilizando lixa de granulação 320 e 600 (Extec, EUA) para a remoção de ranhuras/fissuras da superfície (Figura 4) e este procedimento foi controlado pelo uso de um paquímetro. Após a finalização dessa etapa, os espécimes foram limpos em aparelho de ultrassom (Limp Sonic, Brasil) por um período de 2 min, para remover impurezas aderidas ao esmalte durante a etapa de polimento.

**Figura 4** A) Politriz metalográfica; B) Lixas de granulações 320 e 600 (Extec, EUA) utilizadas para planificação e polimento; C) Amostra de esmalte bovino fixada em disco de resina após etapa de polimento.



Fonte: Elaborado pelo autor

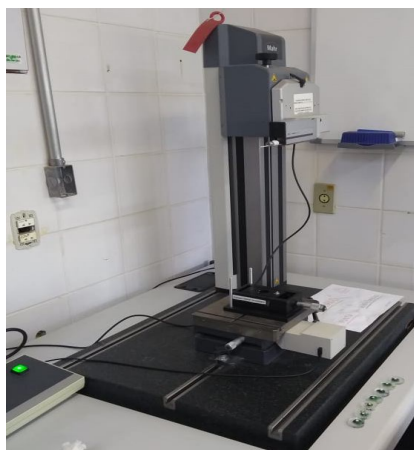
**Figura 5** Sistema de limpeza por ultrassom.



**Fonte:** Elaborado pelo autor

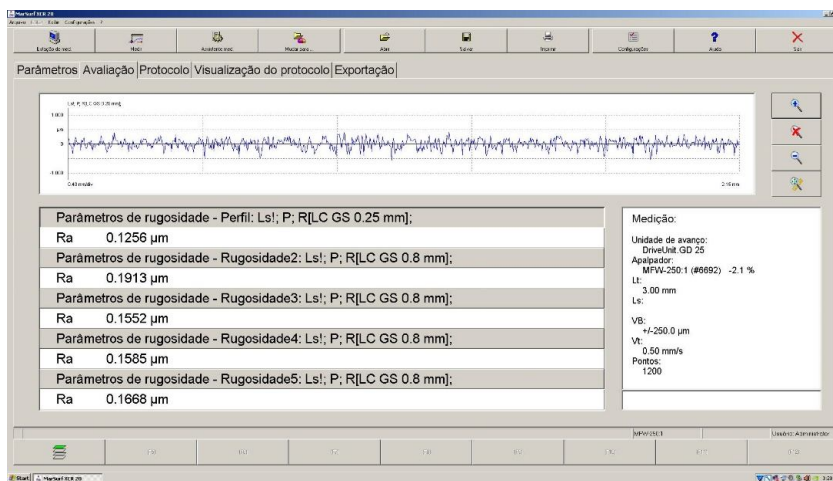
Após a limpeza, as amostras foram submetidas à análise de rugosidade média de superfície (Ra) através do perfilômetro de contato (Mahr, Alemanha) (Figura 6) e o software MarSurf XCR20 (Figura 7), sendo selecionados os espécimes com Ra entre 0,100 a 0,300  $\mu\text{m}$ . Os espécimes que excederam ou não atingiram tais valores foram submetidos ao processo de polimento para reintegrá-los a faixa de valores delimitada. De acordo com a média Ra, as amostras foram alocadas aleatoriamente nos diferentes tratamentos experimentais, de forma a minimizar a variação existente entre os diferentes fragmentos.

**Figura 6** Perfilômetro de contato utilizado na análise de rugosidade média de superfície (Ra).



**Fonte:** Elaborado pelo autor

**Figura 7** Exemplo de análise de uma amostra no software MarSurf XCR20.



Fonte: Elaborado pelo autor

Por fim, as amostras com Ra dentro do previamente estabelecido foram removidas dos discos, seguido de sua limpeza com água deionizada e identificação de cada espécime na face posterior com sua numeração correspondente.

### 3.5.3 Irradiação e proteção de áreas híginas

Com o objetivo de simular os efeitos da radioterapia durante o tratamento pelo qual os pacientes com CCP são submetidos, metade dos espécimes foram irradiados e a outra metade não. A radiação foi realizada no Centro de Radioterapia de Bauru, localizado na Rua Professor Nair Araújo Antunes, quadra 01, nº 50, em Bauru, sob responsabilidade da Médica Radio-oncologista Dra. Ana Tarsila Fonseca e a Física Médica Simone Zuquerato Sansavino, utilizando como fonte um acelerador linear, a partir de raios X de alta energia e elétrons com uma energia de 1,5 - 40 MeV, com dose total de 70 Gy.

Na sequência, todas as amostras tiveram os 2/3 periféricos da sua superfície protegidas com esmalte cosmético de unha (Risque®) para obtenção de duas áreas controle (hígida), deixando o terço central livre para a formação do biofilme microcosmo (Figura 8).

**Figura 8** A) Amostra de esmalte bovino protegido em 2/3 da superfície com

esmalte cosmético de unha; B)  
Identificação da amostra no verso do  
espécime



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.5.4 Esterilização

Após a finalização do preparo dos blocos, as amostras foram embaladas em papel grau e encaminhados para esterilização com gás óxido de etileno durante 4 horas sob pressão de  $0,5 \pm 0,1$  Kgf/cm<sup>2</sup> (ACECIL Central de Esterilização com. IND. LTDA - Campinas /SP).

## 3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos descritos neste item foram realizados em fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70°INPM e exposição a luz ultravioleta por 15 min. Além disso todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados em autoclave e expostos a luz ultravioleta antes de sua utilização.

Para o estudo *in vitro*, os espécimes de esmalte irradiados (n = 108 blocos) e não irradiados (n = 108 blocos) foram divididos entre os grupos A (biofilme de participantes sadios com fluxo salivar normal) e B (biofilme de participantes com CCP, submetidos à radioterapia com hipossalivação). Cada tipo de espécime, de cada grupo, foi submetido à cinco tratamentos de formulações de saliva artificial, sendo quatro formulações experimentais e uma formulação comercial (Biotène®). As quatro formulações de saliva artificial (SA) apresentaram a mesma formulação básica, diferindo em relação à presença ou não de proteínas a serem testadas: 1) Apenas constituintes inorgânicos (SA); 2) Constituintes inorgânicos + CaneCPI-5 a 0,1 mg/mL (SA+Cane); 3) Constituintes inorgânicos + Hemoglobina a 1,0 mg/mL (SA+Hb); 4) Constituintes inorgânicos + CaneCPI-5 a 0,1 mg/mL + Hemoglobina a

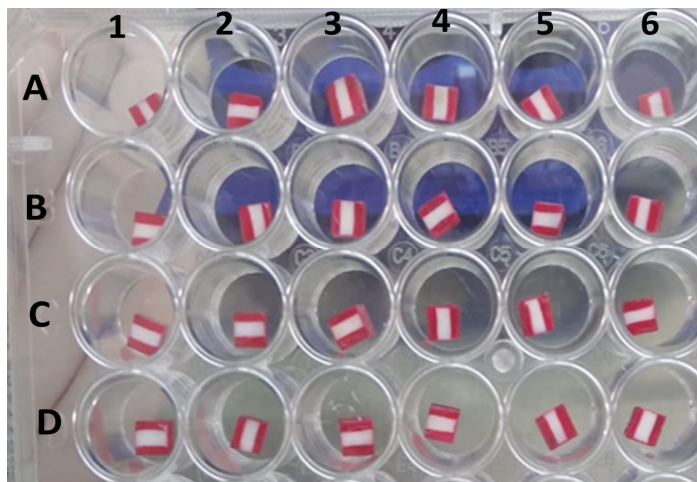
1,0 mg/mL (SA+Cane+Hb); 5) Fórmula comercial Biotène® (BTN). Também foi realizado um tratamento controle com água (CTR - placebo).

Os espécimes de esmalte irradiados e não irradiados foram colocados em placas de 48 poços de acordo com a aleatorização dos grupos (Figura 1). Em seguida, foram adicionados nos poços 750 µL do biofilme coletado (biofilme-glicerol), previamente diluída em saliva artificial de McBain (2009) - mucina tipo II gástrica de porco 2,5 g/L; peptona bacteriológica 2,0 g/L; triptona 2,0 g/L; extrato de levedura 1,0 g/L; NaCl 0,35 g/L, KCl 0,2 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,2 g/L; cloreto de cisteína 0,1 g/L; hemina 0,001 g/L; vitamina K1 0,0002 g/L, pH 7 - na proporção de 1:50. As placas foram incubadas em uma atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 8 h para formação do biofilme e sua estabilização. Após esse período, os espécimes foram lavados com salina tamponada fosfatada (PBS) - NaCl 8g/L; KCl 0,2g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,42 g/L; KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,24g/L - por 5 s e foi adicionado 750 µL de saliva artificial de McBain suplementado com sacarose 0,2%, para promoção do desafio cariogênico. A placa foi novamente incubada a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 16 h.

Após as 24 h iniciais do experimento, foram adicionados aos poços 500 µL dos diferentes tratamentos de salivas artificiais durante 60 s. Em seguida, as soluções foram removidas e a solução de McBain suplementado com sacarose 0,2% foi novamente adicionada. Esse procedimento foi realizado uma vez a cada 24 h até completar os 5 dias de cultivo do biofilme. Ao final do período, os espécimes foram lavados com 500 µL de PBS para remover as bactérias não aderentes e transferidos para uma nova placa de 48 poços.

**Figura 9** Espécimes de esmalte bovino dispostos na placa de cultivo segundo a aleatorização: a) Linha A: Esmalte não irradiado com biofilme Grupo A; b) Linha B: Esmalte não irradiado com biofilme Grupo B; c) Linha C: Esmalte irradiado com biofilme Grupo A; d) Linha D: Esmalte irradiado com biofilme Grupo B; e) Coluna 1: CTR; f) Coluna 2: Apenas SA; g) Coluna 3: SA + CaneCPI-5 a 0,1 mg/mL; h) Coluna 4: SA + Hemoglobina a 1,0 mg/mL; i) Coluna 5: SA + CaneCPI-5 a 0,1 mg/mL + Hemoglobina a 1,0 mg/mL; j) Coluna 6: Formulação comercial Biòtene®.





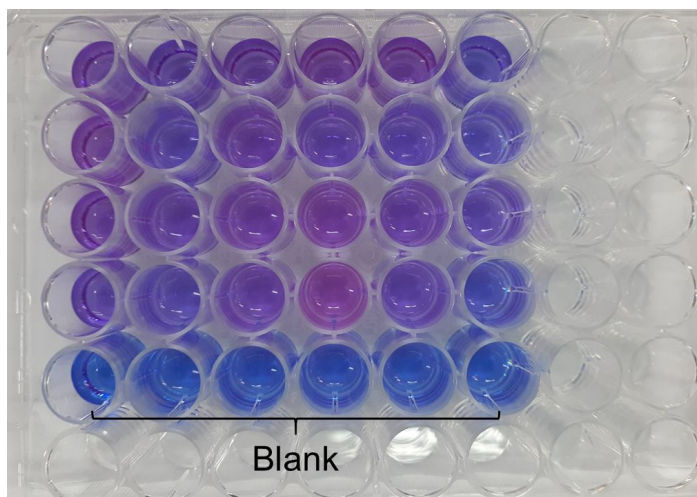
Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.7 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DA RESAZURINA

A resazurina se trata de um composto de coloração azul e é amplamente utilizada na avaliação da viabilidade de microrganismos; quando inserida no meio de cultura utilizado, caso haja atividade microbiana, o composto será exposto aos produtos oriundos da respiração celular e através de uma reação de oxirredução será convertido em resorufina de coloração rosa sendo possível a quantificação dessa reação através de um espectrofotômetro (Roca et al.,2019). Este trabalho utilizou esta metodologia tendo os procedimentos descritos por Jiang et al. (2011) como base se aplicando algumas modificações para sua utilização.

Após a transferência dos espécimes para uma nova placa, foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  do corante resazurina (0,0016%) diluído em PBS por um período de 2 h (Figura 10). Os valores de intensidade de fluorescência (IF) foram calculados em um leitor de microplaca (Synergy H1 - Biotek<sup>®</sup>) com excitação de 485 nm e emissão de 560 nm através do software Gen5. Também foi calculado os valores de base de intensidade de fluorescência (BIF) da solução de resazurina em sextuplicata. Dessa maneira, a viabilidade celular do biofilme após exposição aos diferentes tratamentos foi determinada baseando-se na porcentagem de redução do FI relativo ao grupo controle, calculado pela seguinte fórmula:  $\text{IF (\%redução)} = [(IF_{\text{grupo tratamento}} - BIF) / (IF_{\text{grupo controle}} - BIF)] \times 100$ .

**Figura 10** Placa de cultivo contendo biofilme microcosmo após incubação por 2 h com o corante resazurina.



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa SigmaPlot Software (SigmaPlot Software Inc.) e verificados quanto à distribuição de normalidade e homogeneidade de variância. Após esta verificação, os dados foram submetidos à análise estatística ANOVA três fatores e teste Tukey para a comparação múltipla dos diferentes tratamentos. Foram considerados valores significativos de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

Apenas três aspectos analisados demonstraram diferença significativa para a análise executada. Tanto o tipo de esmalte ( $p=0,147$ ) quanto sua interação com o biofilme ( $p=0,883$ ) e os tratamento ( $p=0,070$ ) não demonstrou ser um fator determinante na análise sendo removido das variáveis de avaliação e permitindo a avaliação conjunta de ambos os tipos de esmalte; já o tipo de biofilme apresentou diferença estatística considerável ( $p<0,001$ ) demonstrando a presença de diferenças entre o biofilme de participantes saudáveis e de participantes com CCP irradiados; por fim os tratamentos também apresentaram diferença significativa tanto na comparação isolada ( $p=0,004$ ) quanto na interação com os tipos de biofilme ( $p=0,011$ ) utilizados sendo este aspecto relevado na análise. Todos os valores de  $p$  obtidos foram compilados na Tabela 1 para melhor visualização.

**Tabela 1** Valores de p para as diferentes condições avaliadas: Tipo de esmalte (irradiado e não irradiado), Tipo de biofilme (Grupo A e Grupo B) e Tratamentos (CTR, SA, SA+Cane, SA+Hb, SA+Cane+Hb e BTN). \* indica diferença significativa entre os fatores avaliados, considerando análise estatística ANOVA a três critérios ( $p < 0,05$ ).

<b>Interação</b>	<b>p</b>
Tipo de esmalte	$p = 0,147$
Tipo de biofilme	$p < 0,001^*$
Tratamentos	$p = 0,004^*$
Tipo de esmalte x Tipo de biofilme	$p = 0,883$
Tipo de esmalte x Tratamentos	$p = 0,070$
Tipo de biofilme x Tratamentos	$p = 0,011^*$

**Fonte:** Elaborado pelo autor

Em seguida o programa realizou a análise da interação das variáveis (Tipo de biofilme e Tratamentos) que apresentaram diferença estatística significativa. Os resultados evidenciaram que no grupo A houve diferença significativa entre a formulação BNT e a SA+Hb ( $p=0,045$ ), enquanto no grupo B houve diferença significativa entre: CTR e BNT ( $p=0,022$ ), CTR e SA+Cane+Hb ( $p=0,001$ ), por fim SA+Hb e SA+Cane+Hb ( $p=0,036$ ). Vale ressaltar que nenhuma dos tratamentos aplicados gerou diferença significativa em relação ao CTR para o grupo A.

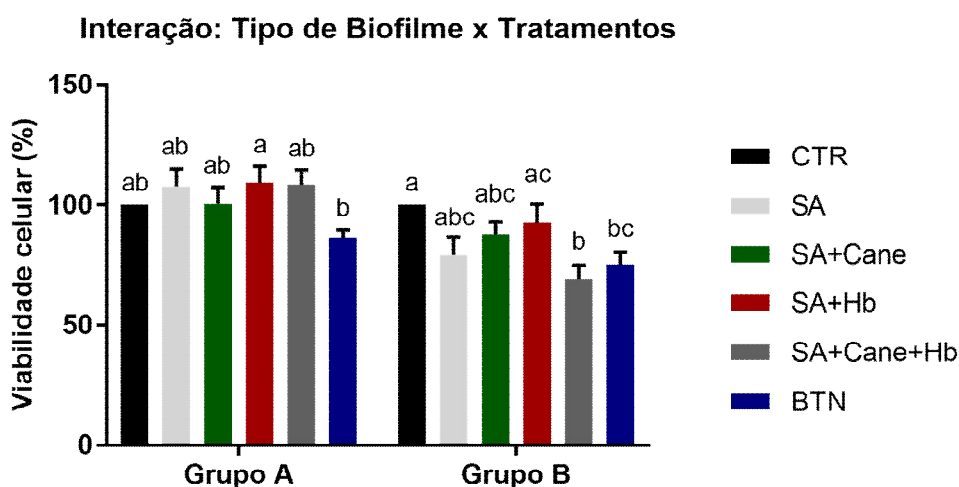
Para uma melhor exibição dos resultados obtidos pela análise estatística, as médias dos testes e seu erro padrão foram compilados na Tabela 02 e com esses dados foi feito o Gráfico 01 que exibe as percentagens da viabilidade celular e indica onde houve diferença estatística relevante na relação de tratamento com biofilme.

**Tabela 2** Viabilidade celular (%) nos diferentes tratamentos experimentais para o Grupo A e Grupo B, independentemente do tipo de esmalte bovino utilizado (esmalte irradiado e não irradiado). Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

<b>Viabilidade celular (%)</b>		
<b>Tratamentos</b>	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>
CTR	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
SA	107,75 $\pm$ 6,89	79,04 $\pm$ 7,58
SA+Cane	100,38 $\pm$ 6,96	87,61 $\pm$ 5,35
SA+Hb	109,04 $\pm$ 9,43	92,53 $\pm$ 8,33
SA+Cane+Hb	108,32 $\pm$ 5,99	69,06 $\pm$ 5,86
BTN	86,17 $\pm$ 3,17	75,19 $\pm$ 5,15

**Fonte:** Elaborado pelo autor

**Gráfico 1** Porcentagem (%) de redução na viabilidade celular do biofilme microcosmo pelo método da resazurina para Grupo A (Biofilme de participantes saudáveis) e Grupo B (Biofilme de participantes com CCP, submetidos à radioterapia), após tratamento com as diferentes formulações experimentais: água (CTR), apenas constituintes inorgânicos (SA), SA + CaneCPI-5 0,1 mg/mL (SA+Cane), SA + Hemoglobina 1,0 mg/mL (SA+Hb), SA + CaneCPI-5 0,1 mg/mL + Hemoglobina 1,0 mg/mL (SA+Cane+Hb) ou formulação comercial Biotène® (BTN), independentemente do tipo de esmalte bovino utilizado (esmalte irradiado e não irradiado). Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os diferentes tratamentos.



Fonte: Elaborado pelo autor

## 5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo aborda um assunto de importância expressiva, visto que o número de pessoas diagnosticadas com CCP mostra-se crescente. O tratamento por radioterapia fragiliza a estrutura dentária e prejudica o funcionamento normal das glândulas salivares, resultando em complicações secundárias graves como a hipossalivação. Como consequência, o desenvolvimento de cárie nesses pacientes é frequente, com progressão rápida e severa mesmo após a radioterapia. Devido à falta de substitutos salivares que tenham efeito comprovado sobre a cárie, estudos como esse são importantes já que visam compreender os mecanismos de ação e a eficácia de potenciais formulações sobre o biofilme dentário e a estrutura dentária.

Apesar de estudos na literatura evidenciarem que a radiação proveniente da radioterapia causa alterações estruturais no esmalte dentário (Gonçalves et al.,

2014; Reed et al., 2015; De Barros da Cunha et al., 2017), o esmalte irradiado não se mostrou um fator determinante para a análise da viabilidade pelo método da resazurina, evidenciando que para esse tipo de avaliação não se faz necessária a utilização deste tipo de esmalte. Porém, vale ressaltar que as diferenças entre os tipos de esmalte podem afetar outras análises como a microrradiografia transversal (TMR) que é utilizada para avaliar a desmineralização de estrutura dentária.

Com relação a ação do BTN, em ambos os grupos, mesmo com a remoção das enzimas antimicrobianas pela empresa responsável ele ainda conseguiu causar redução significativa na viabilidade celular. Ainda não existem trabalhos que abordem a ação da nova formulação do BTN na viabilidade celular do biofilme, porém há relatos de que a exposição prolongada ao hidratante bucal tende a ser citotóxica para a estrutura celular de queratinócitos e fibroblastos em estudos *in vitro* com cultura celular (Yamada et al., 2020).

Múltiplos trabalhos veem reportando diferenças na composição da microbiota de indivíduos com câncer oral quando comparado com indivíduos controle saudáveis (Mager et al., 2005; Gong et al., 2013; Schmidt et al., 2014; Healy e Moran, 2019). Em concordância com a literatura, pode-se notar uma diferença significativa no desenvolvimento do biofilme coletado de participantes saudáveis e participantes com CCP, submetidos a radioterapia, sendo o segundo grupo mais suscetível a ação dos tratamentos aplicados, ressaltando a importância da utilização do inóculo de biofilme desse grupo de pacientes em estudos que pretendem avaliar efetividade de substitutos salivares para esses indivíduos.

Como já mencionado, a ação dos tratamentos foi distinta em cada um dos grupos. Para o grupo A, nenhum dos tratamentos promoveu alterações significativas na viabilidade celular do biofilme em relação ao controle.

Para o grupo B, os tratamentos SA+Cane+Hb e BTN reduziram significativamente a viabilidade celular em relação ao controle. A sinergia entre as proteínas CaneCPI-5 e hemoglobina se mostra eficaz para o parâmetro avaliado, o que não ocorre em sua ação individual, sendo potenciais candidatas para a inserção em formulações de saliva artificial para indivíduos com CCP.

Em suma, os resultados se mostraram promissores para a utilização de CaneCPI-5 e hemoglobina em salivas artificiais para indivíduos com CCP visto que foi capaz de reduzir a viabilidade celular do biofilme oriundo destes pacientes. Ainda é necessária a avaliação da ação destes compostos em outros aspectos de

importância, como a análise do perfil microbiano do biofilme microcosmo através da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e a avaliação da desmineralização através da microradiografia transversal (TMR), estudos esses em andamento pelo grupo de pesquisa da Bioquímica FOB/USP. Já os resultados secundários demonstraram que para a análise de viabilidade celular pelo método da resazurina é desnecessária a utilização de esmalte irradiado, facilitando o preparo de amostras para estudos com este tipo de análise. Também se observou que a fórmula comercial Biotène® apesar de não possuir enzimas antimicrobianas ainda apresenta capacidade de reduzir a viabilidade das células testadas sendo ainda necessários novos trabalhos para compreender a ação da nova fórmula em estudos *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- Aykut-Yetkiner, A., Wiegand, A., Attin, T. The effect of saliva substitutes on enamel erosion *in vitro*. *Journal of Dentistry*. 2014: 42; 720-725.
- Buzalaf, M. A., Hannas, A. R., Kato, M. T. Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*. 2012: 20(5); 493-502.
- De Barros da Cunha, S.R. et al. Effects on different radiation doses on the microhardness, superficial morphology, and mineral components of human enamel. *Archives of Oral Biology*. 2017: 80; 130-135.
- Delecrode, T. R. et al. Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle. *Journal of Dentistry*. 2015: 43; 1470-1475.
- Deng, J. et al. Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. *Oral Oncology*. 2015: 51(9); 824-831.
- Diaz-Arnold, A. e Marek, C. The impact of saliva on patient care: A literature review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2002: 88; 337-343.
- Epstein, J. B. et al. A double-blind crossover trial of Oral Balance gel and Biotène® toothpaste versus placebo in patients with xerostomia following radiation therapy. *Oral Oncology*. 1999: 35; 132-137.
- Giafferis, R. B. L. et al. Estratégias terapêuticas disponíveis para xerostomia e hipossalivação em pacientes irradiados de cabeça e pescoço: manual para profissionais da saúde. *Revista Uningá*, [S.l.], v. 54, n. 1, dez. 2017. ISSN 2318-0579. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/6>>. Acesso em: 04/12/2020.
- Gonçalves, L. M. et al. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. *Journal of Dentistry*. 2014: 42(8); 986-992.
- Gong, H. L. et al. The composition of microbiome in larynx and the throat biodiversity between laryngeal squamous cell carcinoma patients and control population. *PLoS One*. 2013: 8(6); 1-12.
- Hahnel, S., Behr, M., Handel, G. Saliva substitutes for the treatment of radiation-induced xerostomia – a review. *Supportive Care in Cancer*. 2009: 17; 1331-1343.
- Healy, C. M. e Moran, G. P. The microbiome and oral cancer: More questions than answers. *Oral Oncology*. 2019: 89; 30-33.
- INCA (2018). Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 24/02/2020.
- Jham B. C. e Freira, A. R. S. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2006: 72(5); 704-708.

- Jiang, L. M. et al. Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. *Journal of Endodontics*. 2011: 37(1); 31-35.
- Liang, X. et al. Radiation caries in nasopharyngeal carcinoma patients after intensity-modulated radiation therapy: A cross-sectional study. *Journal of Dental Sciences*. 2016: 11; 1-7.
- Lieshout, H. F. J. e Bots, C. P. The effect of radiotherapy on dental hard tissue – a systematic review. *Clinical Oral Investigations*. 2014: 18; 17-24.
- Mager, D. L. et al. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *Journal of Translational Medicine*. 2005: 3(2); 1-8.
- Martini, T. et al. Proteomics of acquired pellicle in gastroesophageal reflux disease patients with or without erosive tooth wear. *Journal of Dentistry*. 2019: 81; 64-69.
- McBain, A. J. *In vitro* biofilm models: an overview. *Advances in Applied Microbiology*. 2009: 69; 99-132.
- Nagler, R. M. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Diseases*. 2002: 8; 141-146.
- Pow, E. H. N. et al. Salivary gland function and xerostomia in southern Chinese following radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Oral Investigations*. 2003: 7; 230-234.
- Pratten, J., Wilson, M., Spratt, D. A. Characterization of *in vitro* oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. *Oral Microbiology and Immunology*. 2003: 18; 45-49.
- Reed, R. et al. Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. *Archives of Oral Biology*. 2015: 60; 690-697.
- Roca, B. M. et al. Avaliação do uso da resazurina em teste de suscetibilidade *in vitro* frente a *Sporothrix brasiliensis*. *Vittalle*. 2019: 31; 32-37.
- Santiago, A. C. et al. A new sugarcane cystatin strongly binds to dental enamel and reduces erosion. *Journal of Dental Research*. 2017: 1; 1-7.
- Schmidt, B. L. et al. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS One*. 2014: 9(6); 1-12.
- Shahdad, S. A. et al. A double-blind, crossover study of Biotène Oralbalance and BioXtra systems as salivary substitutes in patients with post-radiotherapy xerostomia. *European Journal of Cancer Care*. 2005: 14; 319-326
- Shyh-An Yeh, M. D. Radiotherapy for head and neck cancer. *Seminars in Plastic Surgery*. 2010: 24(2); 127-136.



Signori, C. et al. Influence of the inoculum source on the cariogenicity of *in vitro* microcosm biofilms. *Caries Research*. 2016: 50(2); 97-103.

Silverman, S. Jr. Oral cancer. Complications of therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1999: 88; 122-126.

Warde, P. et al. A phase II study of Biotène in the treatment of post radiation xerostomia in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer*. 2000: 8; 203-208.

Yamada M, Takase K, Suehiro F, Nishimura M, Murata H. Effects of denture adhesives and mouth moisturizers to human oral fibroblast and human keratinocyte cells using direct and indirect cell culture systems. *Dental Materials Journal* 2020; 39(4): 571–576.

**ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES  
HUMANOS**

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DE SALIVA ARTIFICIAL PARA PACIENTES SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO

**Pesquisador:** NATARA DIAS GOMES DA SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 86782618.4.0000.5417

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Bauru

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.659.893

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma tese de doutorado, a qual está dividida em 2 Etapas:

Na etapa 1 serão incluídos participantes com idade entre 18 - 35 anos, de ambos os gêneros, sendo eles: 1) Grupo A: Nove participantes diagnosticados com CCP, submetidos ao tratamento por radioterapia e que devem apresentar cárie ativa e hipossalivação 2) Grupo B: Nove participantes com boa saúde geral e bucal com fluxo salivar normal. Ambos os grupos deverão frequentar o Centro de Pesquisa Clínica da Faculdade de Odontologia de Bauru FOB/USP.

Por sua vez, na etapa 2 participarão 9 participantes diagnosticados com CCP submetidos a tratamento por radioterapia e que apresentam cárie ativa e hipossalivação.

Para o estudo in vitro, os espécimes dentes bovinos, esmalte (n=162 blocos) e dentina (n=162 blocos) serão divididos entre os grupos A (saliva de pacientes com CCP, submetidos à radioterapia e com hipossalivação) e B (saliva de pacientes saudáveis, com fluxo salivar normal).

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho será:

1) Avaliar os efeitos de diferentes formulações de saliva artificial sobre o biofilme microcosmo formado sobre esmalte e dentina bovinos in vitro após promoção do desafio cariogênico com sacarose, a partir de inóculo de saliva de pacientes saudáveis e pacientes diagnosticados com CCP,

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

**UF:** SP **Município:** BAURU

**Telefone:** (14)3235-8356

**Fax:** (14)3235-8356

**E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



Continuação do Parecer: 2.659.893

submetidos a tratamento por radioterapia, bem como avaliar a desmineralização produzida por estes biofilmes em esmalte e dentina e

2) Avaliar as alterações no perfil proteico da saliva e película adquirida em pacientes com CCP submetidos à radioterapia após a utilização da formulação de saliva artificial que apresentar os melhores resultados na primeira etapa.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Estão adequadamente descritos no Projeto, na Plataforma Brasil e no TCLE.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

É uma pesquisa composta de 2 Etapas, englobando estudo laboratorial e clínico, parece bastante interessante e bem delineada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os pesquisadores corrigiram todas as pendências que foram solicitadas.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado sem restrições de ordem ética.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 09/05/2018, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1083001.pdf	16/04/2018 19:26:22		Aceito

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

**USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP**



Continuação do Parecer: 2.659.893

Outros	Protocolo_CEEPA.pdf	16/04/2018 19:25:34	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	16/04/2018 19:24:34	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Cronograma	Cronograma_Atualizado.pdf	16/04/2018 17:12:22	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Etapa2_Dia2_Modificado.pdf	16/04/2018 17:05:56	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Etapa2_Dia1_Modificado.pdf	16/04/2018 17:05:40	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Etapa1_Modificado.pdf	16/04/2018 17:05:23	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Outros	Questionario_Tecnico_Pesquisador.pdf	21/03/2018 21:31:53	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.pdf	21/03/2018 21:25:38	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Consentimento_Livre_Esclarecido_Etapa_2_Dia_2.pdf	21/03/2018 21:23:07	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Consentimento_Livre_Esclarecido_Etapa_2_Dia_1.pdf	21/03/2018 21:22:53	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Consentimento_Livre_Esclarecido_Etapa_1.pdf	21/03/2018 21:22:38	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_encaminhamento_Termo_de_aquiescencia_CEP_Clinica.pdf	21/03/2018 21:17:37	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_encaminhamento_Termo_de_aquiescencia_CEP_Lab.pdf	21/03/2018 21:14:41	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Compromisso.pdf	21/03/2018 21:12:55	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	21/03/2018 21:11:26	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	21/03/2018 21:10:02	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA      **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP                      **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8356      **Fax:** (14)3235-8356      **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



Continuação do Parecer: 2.659.893

Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_assinada.pdf	21/03/2018 21:08:27	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
----------------	-----------------------------	------------------------	-------------------------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BAURU, 17 de Maio de 2018

---

**Assinado por:**

**Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida**  
(Coordenador)

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA    **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP    **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8356    **Fax:** (14)3235-8356    **E-mail:** cep@fob.usp.br

## ANEXO B: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA: EMENDA DE ALTERAÇÃO NA METODOLOGIA, OBJETIVOS E TCLE

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DE SALIVA ARTIFICIAL PARA PACIENTES SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO

**Pesquisador:** NATARA DIAS GOMES DA SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 86782618.4.0000.5417

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Bauru

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.325.021

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de emenda com algumas alterações: nos objetivos, na metodologia do trabalho e no TCLE.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho será: 1) Avaliar os efeitos de diferentes formulações de saliva artificial sobre o biofilme microcosmo formado sobre esmalte bovino irradiado e não irradiado in vitro após promoção do desafio cariogênico com sacarose, a partir de inóculo de biofilme de pacientes saudáveis e pacientes diagnosticados com CCP, submetidos a tratamento por radioterapia, bem como avaliar a desmineralização produzida por estes biofilmes em esmalte irradiado e não irradiado e 2) Avaliar as alterações no perfil proteico da saliva e película adquirida em pacientes com CCP submetidos à radioterapia após a utilização da formulação de saliva artificial que apresentar os melhores resultados na primeira etapa.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Em ambas as etapas do projeto, os procedimentos a serem realizados são rápidos, simples, não invasivos, resultando em riscos mínimos aos participantes. No entanto, apesar de não haver expectativas quanto ao aparecimento de alterações de qualquer ordem, é possível que o participante possa apresentar alergia e/ou incômodo à cureta utilizada durante a coleta de

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA      **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP      **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8356      **Fax:** (14)3235-8356      **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



Continuação do Parecer: 3.325.021

biofilme na primeira etapa do projeto. Na segunda etapa, os participantes podem sentir algum tipo de desconforto/sensibilidade durante a coleta do material biológico bem como queixar-se do sabor e textura do substituto salivar testado. Nestes casos, os procedimentos serão interrompidos e o participante será liberado da pesquisa, sem qualquer prejuízo ao seu atendimento no Centro de Pesquisa Clínica da FOB-USP.

**Benefícios:**

Como benefícios diretos esperados para ambas as etapas, o participante terá conhecimento sobre o valor de seu fluxo salivar, condição de sua saúde bucal bem como orientações sobre higiene bucal. Além disso, como benefícios indiretos da sua participação, os dados obtidos nessa pesquisa poderão servir para compreendermos melhor os mecanismos de ação e a eficácia de potenciais formulações sobre a estrutura dentária. Ainda, esses resultados podem favorecer em informações importantes que ajudem na tomada de medidas preventivas, melhorando a saúde bucal e a qualidade de vida de pacientes diagnosticados com CCP.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Foram solicitadas as seguintes alterações:

1. Utilização somente do esmalte bovino
2. Coleta de biofilme e não mais de saliva
3. Adicionado critério de inclusão para o grupo A Etapa 1- não uso de antibiótico até 3 meses antes da coleta de biofilme
4. Alterações do número amostral: 108
5. Exclusão do ensaio ácido láctico devido ao alto custo.
6. Não será mais fornecida alimentação ao participante, uma vez que ele virá somente no dia que possui agendamento de rotina.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos obrigatórios foram devidamente apresentados

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A emenda apresentada pelo(a) pesquisador(a) foi considerada APROVADA na reunião ordinária do CEP de 08/05/2019, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br



**USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP**



Continuação do Parecer: 3.325.021

pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1301907_E1.pdf	09/04/2019 21:36:35		Aceito
Outros	Questionario_Tecnico_Pesquisador_Atualizado.pdf	09/04/2019 21:24:13	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Outros	Protocolo_CEUAtualizado.pdf	09/04/2019 21:23:45	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_encaminhamento_Termo_de_aquiescencia_CEP_Radioterapia.pdf	09/04/2019 16:50:56	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Solicitacao_Emenda.pdf	09/04/2019 16:47:05	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Atualizado.pdf	09/04/2019 16:45:02	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Orçamento	Orcamento_Atualizado.pdf	09/04/2019 16:14:39	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Cronograma	Cronograma_Atualizado.pdf	09/04/2019 16:13:41	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Etapa1_Atualizado.pdf	09/04/2019 12:42:28	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Etapa2_Dia2_Atualizado.pdf	22/02/2019 12:34:07	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Etapa2_Dia1_Atualizado.pdf	22/02/2019 12:33:41	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	16/04/2018 19:24:34	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE BAURU DA  
USP



Continuação do Parecer: 3.325.021

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_encaminhamento_Termo_de_aquiescencia_CEP_Clinica.pdf	21/03/2018 21:17:37	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_encaminhamento_Termo_de_aquiescencia_CEP_Lab.pdf	21/03/2018 21:14:41	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Compromisso.pdf	21/03/2018 21:12:55	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_assinada.pdf	21/03/2018 21:08:27	NATARA DIAS GOMES DA SILVA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BAURU, 14 de Maio de 2019

---

**Assinado por:**  
**Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9  
**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA      **CEP:** 17.012-901  
**UF:** SP      **Município:** BAURU  
**Telefone:** (14)3235-8356      **Fax:** (14)3235-8356      **E-mail:** cep@fob.usp.br