

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**Faculdade de Ciências de Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**



**Dissertação de Mestrado**

Alterações clínicas e microbiológicas após o manejo da hipossalivação  
usando métodos de estimulação física em Diabetes Mellitus

Fernanda de Paula e Silva Nunes

Brasília, 20 de janeiro de 2023

Fernanda de Paula e Silva Nunes

Alterações clínicas e microbiológicas após o manejo da hipossalivação usando métodos de estimulação física em Diabetes Mellitus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Nailê Damé-Teixeira

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Daniela Corrêa Grisi

Brasília, 2023

Fernanda de Paula e Silva Nunes

Alterações clínicas e microbiológicas após o manejo da hipossalivação usando métodos de estimulação física em Diabetes Mellitus

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 20 de janeiro de 2023

Banca examinadora:

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Nailê Damé-Teixeira (Orientadora)

---

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Débora Heller

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Machado Guimarães

*Dedico esse trabalho à mulher que é  
Maria Goreti de Paula,  
ao homem foi o Sr. Torquato de Paula,  
e ao que será Joaquim de Paula.  
Exemplo, trabalho e dedicação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Prof<sup>a</sup> Daniela Grisi que com todo seu carinho e visão acreditou em mim e nesse trabalho. Seguido da Prof<sup>a</sup> Nailê que com toda sua energia motiva e é exemplo de dedicação para todo o *team*.

Agradeço aqueles que me auxiliaram em minha formação acadêmica e profissional.

À Universidade de Uberaba instituição na qual me formei e aos professores da especialização professores Emílio Barbosa, Daniela Grisi, Alessandro Januário e Wagner Vaz.

As professoras Celi Vieira e Denise Falcão que me ensinaram muito sobre saliva e atendimento ao paciente na prática clínica.

Aos professores da pós-graduação do programa de Odontologia da UnB por serem fantásticos, em especial as professoras Soraya Leal, Cristine Stefani e Emília Biato.

Aos meus parceiros de trabalho no consultório Dra. Viviane Cipriano, Dr. Leonardo Nobrega e Dr. Luciano Porto pelo apoio e incentivo.

À minha querida e competente técnica em higiene dental, parceira de uma vida Amelinha.

Agradeço as minhas companheiras de estudo Camila Coelho e Jéssica Melo e todas do **TeamRootCaries**.

Agradeço ao meu núcleo familiar, em especial minha amada mãe, que sempre foi uma força imensa em minha vida. Amor sem fim.

Ao meu marido Leo e ao meu filho Joaquim que por muitas vezes sofreram com minha ausência e se reinventaram para me auxiliar nessa etapa de nossa vida. Essa conquista é nossa! Amo muito vocês!

À minha terapeuta Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cida Penso que compartilhou comigo todas as minhas dores e manteve minha mente sã. Um beijo carinhoso.

Aos pacientes dedicados que confiaram sua saúde a mim e a todos do projeto Diabetes, meu respeito e gratidão.

Aos colaboradores do Hospital Universitário de Brasília – HUB

Agradeço também ao Programa de Iniciação Científica da Universidade de Brasília – PROIC, 2017/2018. Esta pesquisa contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) (processo nº 16991.78.45532.26042017).

## APRESENTAÇÃO

No ano de 2016, recebi um telefonema da Prof<sup>a</sup>. Daniela Grisi me convidando para participar do Projeto de Extensão para Indivíduos com Diabetes Mellitus na clínica Odontológica do HUB. A proposta me animou, pois seria para auxiliar alunos de iniciação científica na análise salivar. Naquele momento, precisava de algo novo, motivador. Estava cheia de energia, pois havia um ano do nascimento do meu filho e tudo parecia ter outro significado para mim.

A partir do convite, busquei pela minha habilitação em laser, um investimento que foi fundamental para minha trajetória clínica e em pesquisa.

Iniciamos os trabalhos às quartas pela manhã. O que seria apenas um voluntariado, passou a tomar um espaço grande em minha vida. Percebi muitas deficiências metodológicas e algumas intelectuais. Senti a necessidade de mais conhecimento. Ingressei como aluna especial em disciplinas fantásticas, com professores maravilhosos. A mente explodiu! Conexões foram formadas, raciocínios lógicos, ideias, ideias e mais ideias... e muitos relacionamentos interpessoais.

Ao mesmo tempo, o projeto de extensão foi crescendo, minha mente fervendo e uma pesquisa se formando. Ao final de duas disciplinas como aluna especial, estava com o projeto de pesquisa pronto e encaminhado ao comitê de ética (aqui caberia um capítulo exclusivo, mas deixarei na memória).

E, como na vida, na pesquisa tudo foi se encaixando... e com isso o peso da formalização chegou. Sabia que era preciso ser aluna regular, estava tudo pronto. E a dúvida? E a vida? Como conseguiria fazer tantas coisas? Minha vida profissional estava de pernas para o ar, filho pequeno... enfim, resolvi realizar a prova, sem muita euforia. Estudei. Fiz. Passei.

Estava pronta para iniciar. Animada. Feliz. Mesmo com a responsabilidade de exercer tantos papéis ao mesmo tempo. Energia renovada. Vamos em frente!

Todavia, o mundo precisou parar. A pandemia da COVID-19 alterou cronogramas, objetivos e expectativas. E assim foi, novas parceiras de trabalho, novos contatos e desafios.

O tempo passou, e hoje escrevo essa saga me sentindo muito realizada. Contenta por aprender e ensinar. Por ser melhor hoje do que era em 2016.

Essa dissertação irá apresentar quatro capítulos, dos quais dois correspondem a artigos científicos e, portanto, serão apresentados em língua inglesa e dois apêndices que correspondem aos produtos de projetos de iniciação científica (PIBICs) dos quais participei como autora.

Torço para que se envolva com o tema e aproveite a leitura.

Com carinho, Fernanda.

## RESUMO

A literatura já comprova que indivíduos portadores de Diabetes Mellitus (DM) apresentam disfunções das glândulas salivares. Acredita-se que o menor volume na produção salivar resulte em prejuízo local como no aumento da prevalência de cárie, menor capacidade de resposta imune à doença periodontal e as infecções por fungos. Também se espera prejuízos sistêmicos com a alteração na formação do bolo alimentar e processos digestivos, além de influenciar negativamente na qualidade de vida em relação a sensação de boca seca, engasgos frequentes, dificuldade de deglutição e necessidade de hidratação noturna. O objetivo dessa dissertação foi testar tratamentos não invasivos para manejo da hipossalivação associada ao DM, utilizando métodos físicos para estimulação salivar. Em nosso primeiro estudo exclusivamente clínico (capítulo 2), após cada sessão de TENS, os participantes relataram uma melhora na xerostomia. Embora tenha sido observado um leve aumento no fluxo salivar após cada sessão de estimulação TENS (aumento médio de  $0,14 \pm 0,09$  mL/min), esse incremento não se manteve ao longo das sessões ( $p > 0,05$ ). Nosso segundo trabalho (capítulo 3) apresentou a abundância relativa de microrganismos da saliva, nos níveis de filos e gêneros, antes e após a estimulação salivar por meio de diferentes tratamentos com estímulo físico. *Firmicutes* e *Actinobacteriota* foram os que apresentaram maior abundância relativa observada em todas as amostras, independentemente do tipo de tratamento. A diversidade alfa foi maior nas amostras após tratamento com laser, quando comparadas com as amostras de TENS, sugerindo um maior impacto no microbioma. Um possível efeito de lavagem foi observado, reduzindo os microrganismos em baixa abundância após tratamentos. Em conclusão, o manejo da hipossalivação associada ao DM por meio de métodos físicos (laser, TENS e a combinação de ambos) parece modificar de alguma forma o fluxo salivar e a melhorar a queixa de xerostomia. Há provável modulação microbiana com aumento da diversidade, particularmente após uso de laser. Contudo, novos estudos são necessários para confirmações da eficácia dos aparelhos físicos no tratamento das disfunções salivares.

**Palavras-chave:** hipossalivação, xerostomia, Laser, TENS, saliva, Diabetes Mellitus.

## ABSTRACT

The literature already proves that individuals with Diabetes mellitus (DM) have dysfunctions of the salivary glands. It is believed that the lower volume of salivary production results in local damage such as increased prevalence of caries, lower immune response capacity to periodontal disease and fungal infections. Systemic damage is also expected with the alteration in the formation of the food bolus and digestive processes, in addition to negatively influencing the quality of life in relation to the feeling of dry mouth, frequent gagging, difficulty in swallowing and the need for nighttime hydration. The objective of this dissertation was to test non-invasive treatments for managing hyposalivation associated with DM, using physical methods for salivary stimulation. In our first purely clinical study (Chapter 2), after each TENS session, participants reported an improvement in their xerostomia. Although a slight increase in salivary flow was observed after each TENS stimulation session (mean increase of  $0.14 \pm 0.09$  mL/min), this increase was not maintained throughout the sessions ( $p > 0.05$ ). Our second work (chapter 3) presented the relative abundance of microorganisms in saliva at the levels of phyla and genera before stimulation of saliva through different treatments with physical stimulation. Firmicutes and Actinobacteriota showed the highest relative abundance observed in all samples, regardless of the type of treatment. Alpha diversity was greater in the samples after laser treatment when compared to the TENS samples, suggesting a greater impact on the microbiome. A possible washing effect was observed, reducing microorganisms in low abundance after treatments. In conclusion, the management of hyposalivation associated with DM using physical methods (laser, TENS and the combination of both) seems to somehow modify salivary flow and xerostomia. There is likely microbial modulation with increased diversity, particularly after laser use. However, new studies are needed to confirm the effectiveness of physical devices in the treatment of salivary disorders.

**Keywords:** hyposalivation, xerostomia, Laser, TENS, saliva, Diabetes Mellitus.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM	Diabetes mellitus
DP	Doença Periodontal
HbA1c	Hemoglobina glicada
IFN	Terapia com interferon
FDA	Food and Drug Administration
FLBI	Terapia com laser de baixa intensidade
TENS	Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation
Tess	Treatment Emergent Symptom Scale
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission Radiation
ML/MIN	Mililitros por minuto
L	Litros
pH	Potencial hidrogeniônico
APT	Adenosina trifosfato
Nm	Nanômetro ou um milionésimo de milímetro
nW	Nanowatt
UWS	Unstimulated salivary flow
SWS	Stimulation salivary flow

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Introdução, revisão de literatura e objetivos	
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
1.2.1. Composição, secreção e funções da saliva.....	18
1.2.2. Hipossalivação, Xerostomia e diagnóstico.....	20
1.2.3. Fatores que influenciam na Hipossalivação e Xerostomia.....	22
1.2.4. Tratamento das Disfunções Salivares.....	24
1.3. OBJETIVOS.....	32
1.3.1 Objetivo geral.....	32
1.3.2 Objetivos específicos .....	32
1.4. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO: Salivary stimulation in type 2 diabetes mellitus patients using transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS): a pilot one-arm clinical trial.	
2.1 INTRODUÇÃO.....	45
2.2 METHODS.....	46
2.2.1 Eligibility criteria.....	47
2.2.2 Sialometry diagnosis.....	47
2.2.3 Treatment protocol.....	50
2.2.4 Statistical analysis.....	50
2.3 RESULTS.....	50
2.4 DISCUSSION.....	56
2.5 CONCLUSIONS.....	60
2.6 REFERÊNCIAS.....	61
CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO: Clinical and microbiological shift after management of hyposalivation in individuals with Diabetes Mellitus using of physical stimulation methods: preliminary results of a randomized clinical trial.	

3.1 INTRODUÇÃO.....	62
3.2 MATERIAIS AND METHODS.....	64
3.2.1 Trial design.....	66
3.2.2 Participants.....	66
3.2.3 Eligibility criteria.....	68
3.2.4 Interventions.....	67
3.2.5 Simple Size.....	68
3.2.6 Randonization.....	68
3.2.7 Blinding.....	68
3.3 OUTCOMES.....	68
3.3.1 Sialometry .....	69
3.3.2 Treatment protocol.....	69
3.3.3 Visual analysis of tongue coating.....	70
3.3.4 Salivary microbiome analysis 16s RNA.....	72
3.3.5 Bioinformatics and Statistical methods .....	72
3.4 RESULTS.....	73
3.4.1 Diversity and composition of the microbiome.....	
3.5 DISCUSSION.....	79
3.7 REFERÊNCIAS .....	85
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	92
4.1 DISCUSSÃO GERAL .....	94
4.2 CONCLUSÕES .....	94
4.3 REFERECIAS.....	95
APÊNDICES .....	96
Apêndice1- Meios físicos de estimulação salivar em pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço: uma revisão de escopo.....	96
Apêndice 2 - Métodos físicos de estimulação salivar em portadores de hipossalivação causada por doenças ou condições sistêmicas: uma revisão de escopo.....	124
ANEXOS.....	145
Documento de aprovação do Comitê de Ética.....	145

## Capítulo 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

### 1.1 Introdução

Os aspectos clínicos bucais evidenciados nos indivíduos portadores de Diabetes Mellitus (DM) estão amplamente descritos na literatura (1). Dentre as repercussões bucais do DM, a hipossalivação se destaca e pode ser justificada pela disfunção autonômica, dano ao parênquima glandular (2), alterações na microcirculação das glândulas salivares e problemas associados aos efeitos do DM e da neuropatia correlacionada à regulação da secreção salivar (3). A ação conjunta de muitos medicamentos consumidos pelo portador de DM tipo 2 é também uma possível causa para a redução do fluxo salivar, assim como o descontrole do índice glicêmico (4-8).

A disfunção na produção de saliva observada nos indivíduos com DM pode gerar prejuízo para a integridade dos tecidos dentais, resultando no aumento do número de lesões de cárie e da prevalência de cárie radicular (9), assim como no agravamento das doenças gengivais (10). A disfunção ainda causa alteração das funções gustativas, digestivas e piora a qualidade do hálito (11, 12), além de aumentar a predisposição às infecções oportunistas (13-15).

Devido a importância clínica que a saliva possui, não basta o conhecimento de sua fisiologia. O re-estabelecimento da produção salivar torna-se fundamental para o correto desempenho das funções bucais, englobando a manutenção da saúde, a funcionalidade e a durabilidade de trabalhos reabilitadores (16).

O fluido salivar é secretado, principalmente, pelos três pares de glândulas salivares maiores: parótidas, submandibulares e sublinguais, responsáveis por cerca de 90% da produção total de saliva diária (17). Também participam da produção salivar as glândulas salivares menores espalhadas por toda mucosa bucal.

A avaliação clínica da saliva é realizada pelo exame de sialometria, no qual tanto a saliva em repouso como a estimulada são avaliadas. Vale

destacar que a avaliação salivar é um exame simples, de baixo custo e com grande capacidade de diagnóstico imediato. A redução no volume da produção salivar pode resultar na hipossalivação, quando o fluxo salivar for menor ou igual a 0,7ml/min mediante à estímulo e menor ou igual a 0,1 ml/min, na coleta em repouso (6). A hipossalivação pode ou não estar correlacionada com a sensação de boca seca, definida cientificamente por xerostomia, cuja queixa é frequente no indivíduo portador de DM (4, 18).

Para o tratamento da hipossalivação, é possível aplicar diversos mecanismos de estimulação salivar, dentre eles o estímulo mecânico, gustativo, químico ou físico. A estimulação física pode ser realizada tanto por meio da acupuntura (19-21), quanto da laserterapia, com laser em baixa intensidade (22, 23) ou ainda pelo uso da estimulação nervosa elétrica transcutânea - TENS (Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation) (15, 24, 25) .

A acupuntura consiste na inserção de minúsculas agulhas em pontos específicos, com o intuito de prevenir ou curar doenças e sintoma (19). O mecanismo de estimulação salivar promovido pela acupuntura está relacionado ao aumento do fluxo sanguíneo, apresentando efeitos positivos no metabolismo da secreção salivar e conseqüente aumento do fluxo salivar (26). Mesmo sendo uma alternativa terapêutica, a acupuntura não será detalhada nesse estudo.

No tocante a estimulação salivar física por meio de laserterapia, a irradiação emitida não é térmica e apresenta efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos. O laser de baixa potência atua na excitação de elétrons e na formação de um campo eletromecânico dentro da mitocôndria, o que resulta no aumento dos níveis de cálcio e aceleração da proliferação celular, além de auxiliar a modulação da inflamação, achado comum quando a atividade das glândulas salivares se apresenta reduzida (27-29).

O mecanismo de ação relacionado à estimulação elétrica transcutânea (TENS) consiste na liberação de uma corrente elétrica, através da fixação de eletrodos na região externa das glândulas parótidas, sublinguais e submandibulares, que interage com as membranas celulares, provocando modificações na transdução de sinais ao ativar canais de cálcio

e AMP cíclico (30, 31). Além disso, atua no aumento do fluxo sanguíneo, da oxigenação, da produção de ATP e na melhora do transporte da membrana plasmática (32).

Embora estudos demonstrem efeito positivo da estimulação nervosa elétrica transcutânea e do laser de baixa intensidade no tratamento da hipossalivação de indivíduos em tratamento de quimioterapia e/ou radioterapia (33, 34), dados sobre a ação desses mecanismos, separadamente ou em conjunto, no aumento da produção salivar e na melhoria da qualidade de vida em indivíduos portadores de DM ainda são escassos (35).

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo revisar todo o processo de produção salivar e sua importância, bem como avaliar os protocolos de estimulação salivar por métodos físicos, por meio do uso do laser de baixa potência ou do TENS, assim como da associação destes dois aparelhos, em indivíduos portadores de DM do tipo 2 e com diagnóstico de hipossalivação.

## 1.2 Revisão de literatura

### 1.2.1 Composição, secreção e funções da saliva

A cavidade bucal oferece um ambiente com boa umidade, temperatura e presença de nutrientes derivados do hospedeiro, como carboidratos fermentáveis da dieta, proteínas salivares, glicoproteínas e fluido crevicular gengival, o que o torna adequado para o crescimento de muitos micro-organismos diferentes. A maior parcela dos micro-organismos salivares é composta principalmente por bactérias, mas também contém uma grande variedade de fungos, vírus, arqueias e protozoários. Além disso, a cavidade bucal possui vários nichos diferentes para colonização microbiana que reflete na variedade da composição salivar, como dentes, sulco gengival, gengiva inserida, língua, mucosa jugal, mucosa labial e mucosa palatina (28, 36, 37).

A análise por meio de técnicas de biologia molecular permitiu identificar, na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, mais de 3600 sequências compreendendo mais de 500 filotipos "em nível de espécie" (38). Os táxons predominantes pertenciam a *Firmicutes* do gênero *Streptococcus*, família *Veillonellaceae* do gênero *Granulicatella*, *Proteobacteria* do gênero *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinobacteria* do gênero *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Bacteroidetes* do gênero *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas* e *Fusobacteria* do gênero *Fusobacterium* (34).

Considerando a microbiota de indivíduos saudáveis, foi observada ausência de microrganismos classicamente correlacionados a doença periodontal, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Os microrganismos correlacionados à cárie dentária, como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* e *Atopobium spp.*, também não foram detectados em placa bacteriana supra e subgingival de dentes clinicamente saudáveis (39). Tal fato demonstra a diferença entre a microbiota de indivíduos com e sem doenças bucais e justifica uma adequação de conduta clínica perante o indivíduo com DM, já que possuem maior prevalência de doença cárie e periodontal (2, 40, 41).

Em análise do microbioma, o trabalho de Ganley (42) resultou em 88 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de nível de gênero diferentes para testes de abundância diferencial. Os resultados foram amplamente descritos por duas tendências. A tendência 1 mostrou OTUs que aumentaram em abundância com o aumento da doença periodontal e em diabéticos em relação aos não diabéticos. Tendência 1 OTUs compreendeu uma mistura de comensais principalmente anaeróbicos e periodontopatógenos potenciais. A tendência 2 foi impulsionada principalmente por gêneros que diminuíram em abundância naqueles com diabetes em relação àqueles sem diabetes, que incluíam outros anaeróbios associados à doença periodontal. No geral, a diversidade microbiana bucal diminuiu em diabéticos e aumentou com a progressão da doença periodontal em comparação com controles periodontais saudáveis.

Recentemente nosso grupo de trabalho (2) correlacionou a hiperglicemia com as proporções de *Treponema*, *Desulfobulbus*, *Phocaiecola* e *Saccharimonadaceae*. *Desulfobulbus* foi onipresente e o organismo mais enriquecido em indivíduos com DM. A relação *Firmicutes/Bacteroidetes* foi maior em pH salivar alcalino do que em pH ácido, concluindo que o microbioma salivar é moldado pela hiperglicemia sistêmica, bem como pelas alterações no pH salivar, que podem estar ligadas à hiperglicemia local.

Diferenças importantes na composição de grupos bacterianos entre amostras de saliva estimuladas e não estimuladas, mesmo em altos níveis taxonômicos, também são observadas (43). A microbiota salivar tem sido utilizada em diferentes estudos epidemiológicos humanos (44) e se destaca como um marcador para diagnóstico de câncer bucal (45), doença periodontal (46) e cárie dentária (9). No entanto, este fluido bucal pode ser coletado por diferentes técnicas, o que dificulta a definição de um protocolo clínico para análise replicável.

A saliva é um fluido corporal importante, que desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde dos tecidos bucais, por meio de suas propriedades antibacterianas, lubrificantes e tamponante. As imunoglobulinas e as enzimas antibacterianas, como peroxidase salivar, lisozima e lactoferrina ajudam a limitar o crescimento da microbiota, atuando na homeostase bucal.

Componentes orgânicos da saliva, como as histatinas (uma família de proteínas salivares) apresentam propriedades antifúngicas que limitam o crescimento de leveduras. Esses componentes salivares, em conjunto com os tecidos da mucosa bucal, fazem parte da imunidade inata sistêmica que continuamente protege o corpo humano de infecções, ao fornecer um meio eficaz de lubrificação (17).

Do mesmo modo, as glicoproteínas salivares facilitam a mastigação, a deglutição, a fala e auxiliam na redução do trauma tecidual (47). A saliva atua também na proteção e reparação de lesões físicas/químicas na mucosa orofaríngea (48).

Juntamente aos componentes orgânicos, os elementos inorgânicos, como cálcio, fósforo, sódio, cloreto, potássio, contribuem igualmente com a função protetora da mucosa bucal e gástrica. Um bom exemplo é a capacidade dos bicarbonatos e fosfatos em neutralizar o ácido proveniente do trato gastrointestinal, nos casos de refluxo gástrico esofágico (37, 47).

Além do conjunto de ações da saliva, vale compreender que toda a secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo, através da liberação de neurotransmissores das vesículas das terminações nervosas junto às células do parênquima das glândulas salivares. Essas são estimuladas a liberar seus grânulos de secreção e secretar água e eletrólitos. Os neurotransmissores acetilcolina e noradrenalina, que atuam no parassimpático e no simpático respectivamente, interagem com receptores específicos (colinérgicos ou adrenérgicos) localizados na membrana plasmática da célula acinosa (49).



As glândulas salivares consistem em componentes parenquimatosos e estromais. O parênquima é composto por ácinos, extremidades secretoras que fazem um fluido primário, ligado a um sistema de ductos (intercalados, estriados e excretores) que modificam a saliva. Cada ácino consiste em células serosas ou mucosas, dispostas em torno de um lúmen central. Exclusivamente na glândula submandibular existem células mucosas semilunais serosas (17).

As glândulas salivares maiores possuem longas e ramificadas redes ductais. As glândulas parótidas e submandibulares contêm todos os segmentos ductais (intercalados, estriados e excretora), enquanto as glândulas sublinguais e menores não possuem ductos estriados. Tais diferenças anatômicas resultam na diferença da qualidade de saliva produzida.

Cerca de 90% da saliva é produzida pelos principais pares de glândulas salivares maiores e o volume diário varia de 0,5 a 1,0 L. Quando em repouso, 65% da saliva, em média, é produzida pela glândula submandibular, localizada abaixo do bordo livre do músculo milo-hióideo, tendo o ducto excretor principal denominado de Wharton. A glândula sublingual está localizada entre o assoalho da boca e o músculo milo-hióideo, sendo o ducto excretor principal chamado de Bartholin. Ambas produzem saliva rica em mucina e fornecem lubrificação das mucosas. Sob estimulação, as glândulas parótidas representam em torno de 50% - 60% do volume salivar livre de mucina. Localizada na extensão do ouvido externo até a fossa retromandibular, possui um ducto excretor principal classificado como Stensen (17).

Considerando ainda a produção salivar, cerca 600 a 1000 glândulas salivares menores localizadas abaixo do epitélio, realizam a drenagem por curtos ductos e estão distribuídas por toda cavidade bucal, particularmente localizadas nas regiões labial, bucal, palatina, assoalho lingual e regiões retromolares.

Após secretada, a saliva entra em contato com o meio bucal sendo, então, denominada de saliva total. A saliva total é um biofluido que soma o fluido glandular com componentes de origem não salivar (células epiteliais, células polimorfonucleares, neutrófilos, linfócitos e seus produtos), micro-organismos, constituintes do sangue e soro, o fluido crevicular gengival, secreções expectoradas de nasofaringe e restos alimentares (50).

Em indivíduos portadores de DM, a neuropatia e as anormalidades microvasculares, como disfunção endotelial e deterioração da microcirculação, podem desempenhar um papel negativo no volume do fluxo salivar e na sua composição (49). As respostas vasodilatadoras mediante à

estimulação neural das glândulas submandibulares foram comprovadamente alteradas, em estudo realizado em animais, corroborando com a hipótese do funcionamento alterado das glândulas salivares em diabéticos (51).

Indivíduos com DM apresentam redução do fluxo salivar estimulado e não estimulado e parâmetros bioquímicos alterados quando comparados com indivíduos sem DM, incluindo maior ureia salivar. O pH salivar, a capacidade tamponante e as concentrações de cálcio e fósforo não se mostraram modificadas entre os grupos pesquisados (40, 52).

Dessa forma, o empenho para o bom funcionamento do sistema excretor salivar, tanto para a produção de volume adequado, como para a qualidade do fluido, deve ser motivado, pois pode interferir em diversas funções bucais e sistêmicas, tais como: a limpeza dos dentes e da mucosa bucal, manutenção do pH neutro por meio de sua capacidade tampão, prevenção da desmineralização dentária, além das ações de enzimas antimicrobianas, sendo imperativo para controlar o acúmulo da biofilme e modular sua composição, atuar na preservação de trabalhos de reabilitação oral e adaptação de próteses removíveis, além de auxiliar o paladar e a formação do bolo alimentar, iniciar a digestão enzimática do amido e contribuir para atividades fisiológicas como a mastigação, deglutição e articulação da fala (53).

### 1.2.2 Hipossalivação, xerostomia e diagnóstico.

A disfunção da glândula salivar é definida como qualquer alteração quantitativa e/ou qualitativa na saída de saliva para mais ou para menos (17). A hipossalivação é considerada quando os valores de sialometria estão  $\leq 0,7$  ml/minuto em estímulo e  $\leq 0,1$  ml/min em repouso. A ausência de fluxo salivar caracteriza o quadro de assialia (24).

A hipofunção das glândulas salivares está frequentemente associada a uma sensação persistente de boca seca (xerostomia). A xerostomia geralmente ocorre quando a taxa de fluxo de saliva total não estimulada é reduzida em 40-50% do seu valor normal em qualquer pessoa (54). No entanto, a xerostomia também pode ocorrer sem que o volume salivar esteja reduzido, sendo, nesse caso, o resultado de alterações na composição ou qualidade, como a falta de mucinas lubrificantes (18, 55). Nesse contexto, justifica-se a importância da avaliação objetiva da

hipossalivação, quanto a quantidade e qualidade da saliva coletada, por meio do exame de sialometria.

Durante o exame de sialometria, o paciente é orientado a permanecer sentado com os pés paralelos e fixos no chão, durante todo o período de coleta. A coleta de saliva pode ser feita em um copo descartável ou tubete milimetrado, durante 5 minutos, posicionado entre o lábio inferior e o mento. Assim, o volume de saliva produzido deverá ser drenado passivamente para o recipiente. Após o tempo proposto, o copo é recolhido e a saliva aspirada, com seringa milimetrada, ou medida no tubete milimetrado para avaliação do total de saliva produzida. O valor de saliva coletada deve, então, ser dividido por 5, para obtenção do resultado em ml/minuto de saliva em repouso (24, 56, 57).

A análise da saliva estimulada pode ser realizada com a utilização de garrote de silicone esterilizado (estímulo mecânico), devidamente padronizado (1cm) e fixado em fio dental. Na mesma posição corporal, o paciente recebe o garrote e faz mastigação do mesmo por cinco minutos. Outra forma de realizar a análise do volume estimulado é com o uso de ácido cítrico a 2% (estímulo químico). O volume da saliva produzido é depositado no recipiente de escolha de maneira ativa (paciente pode cuspir a saliva que estiver na boca). Após o tempo proposto, o total de saliva produzida deve ser dividido por 5 e o resultado de saliva estimulada é, então, expresso em ml/minuto (29, 58).

A análise subjetiva da baixa produção salivar pode ser feita por meio de questionários validados, pela história do paciente, descrição de medicamentos e hábitos, uso de escala analógica visual para quantificar a percepção do grau e gravidade da secura bucal, bem como por medidas simples durante o exame clínico, tais como: passar espelho clínico e observar se houve aderência à mucosa bucal ou língua, se há presença de saliva espumosa, se existe a falta de saliva acumulada no assoalho da boca e se a língua apresenta perda de papilas, representando recursos importantes no diagnóstico e no acompanhamento do tratamento de xerostomia e hipossalivação, uma vez que correlacionam hábitos do cotidiano dos indivíduos com sinais e sintomas da hipossalivação e xerostomia (55, 59).

### 1.2.3 Fatores que influenciam na hipossalivação e na xerostomia

Ainda na avaliação da produção salivar, vale destacar situações nas quais o funcionamento das glândulas salivares sofre oscilações. Sabidamente, o ritmo circadiano atua na

produção e composição salivar, sendo que a saliva é mais excretada durante o dia. O ciclo ou ritmo circadiano dita os comandos para que os processos fisiológicos consigam desempenhar as diversas funções ao longo das 24 horas do dia, como, por exemplo, a regulação e liberação hormonal de insulina e de melatonina, fundamentais para a saúde (60). Assim, a padronização do horário da coleta salivar para análise e acompanhamento deve ser realizada para evitar vieses.

O grau de hidratação corporal do indivíduo pode alterar a produção normal de saliva. O termo desidratação define uma redução rápida da água corporal, levando o organismo de um estado de euhidratado para hipohidratado (61). Diariamente, um adulto sedentário em ambiente neutro necessita de aproximadamente 2,5 litros de água. Porém, para um adulto ativo em um meio ambiente quente e úmido, dependendo da sua atividade essa necessidade de hidratação pode chegar à duas ou três vezes mais (62).

Outro importante dado a ser considerado no quadro de hipossalivação e xerostomia é a ação dos fármacos. Indivíduos portadores de DM apresentam, muitas vezes, o uso simultâneo de diversas drogas para tratamento de outras comorbidades além do DM. Embora muitos medicamentos tenham a xerostomia como efeito colateral, poucos foram testados para mudanças objetivas na saliva e grande parte dos dados são baseados em uma queixa subjetiva de boca seca (63).

O DM é a sexta causa de mortalidade nas Américas e foi responsável por mais de 284 mil mortes em 2019. Também é a segunda maior causa de incapacidade, precedida apenas pela doença isquêmica do coração. O DM é a principal causa de cegueira em pessoas de 40 a 74 anos, amputações de membros inferiores e doença renal crônica. Além disso, o DM triplica o risco de morte por doença cardiovascular, doença renal ou câncer e aumenta o consumo de medicamentos (64).

Ainda que os mecanismos exatos pelos quais algumas drogas causem xerostomia não estejam completamente compreendidos (65), a disfunção salivar associada a drogas por ação anticolinérgica, simpaticomimética, citotóxica ou por vias de transporte de íons danificadas nas células acinares já é bem documentada (53, 66).

Medicamentos com atividade anticolinérgica presumivelmente inibem a secreção salivar. Os fármacos contra os receptores muscarínicos M3 são a causa mais relatada de redução da

salivação. Todavia, na maioria dos casos, o efeito é revertido com a descontinuação do uso das drogas (28).

Os antidepressivos tricíclicos apresentam efeitos em vários graus, pois bloqueiam os efeitos de acetilcolina nos receptores muscarínicos, resultando em uma diminuição do fluxo salivar. Portanto, predomina a estimulação simpática, o que leva a produção de uma saliva mais viscosa (67). Além disso, como esses medicamentos atuam no sistema nervoso central, podem causar alterações salivares por meio de ações indiretas sobre as glândulas salivares. Aqueles que atuam como inibidores da recaptção de serotonina causam disfunção salivar. Mesmo sem receptores colinérgicos, a atuação da medicação pode acontecer devido outros receptores de substâncias endógenas nas glândulas salivares que medeiam a taxa de fluxo salivar, como substância P e receptores de peptídeos intestinais vasoativos (68).

Antipsicóticos, anti-histamínicos, drogas para hiperatividade da bexiga e broncodilatadores também possuem atividade anticolinérgica, causando hipofunção salivar, assim como medicações de uso rotineiro, como descongestionantes, supressores de apetite e relaxantes musculares (65).

A xerostomia é um dos eventos adversos observados durante terapia com interferon (IFN). Os interferons pertencem à classe das citocinas e são glicoproteínas secretadas pelas células do sistema imunológico com o objetivo de combater elementos estranhos ao organismo, incluindo parasitas e vírus. Existem diversos tipos de interferons, sendo o interferon-alfa o mais utilizado como imunoterapia para o câncer, seu uso pode resultar em uma alteração da exocitose e/ou transporte líquido das glândulas exócrinas. Este efeito prontamente volta ao normal após a interrupção do tratamento (69, 70). Os quimioterápicos como ciclofosfamida, epirrubina ou metotrexato e 5-fluorouracil parecem afetar a função dos ácinos e células ductais, influenciando na divisão celular, podendo induzir dilatação do ducto excretor, degeneração e inflamação do tecido glandular (70).

#### 1.2.4 Tratamento das disfunções salivares.

Depois de estabelecer um diagnóstico, uma estratégia de gestão em ações clínicas deve ser implementada. Consiste em aliviar os sintomas, instituir medidas preventivas, tratar

condições, melhorando a função salivar no que for possível, levando em conta quaisquer condições sistêmicas subjacentes (71).

Dessa forma, para o indivíduo com DM, uma abordagem multidisciplinar entre os profissionais de saúde é sempre recomendada. O DM é considerado um grupo de distúrbios metabólicos que leva à hiperglicemia e pode causar várias complicações relacionadas a diferentes sistemas orgânicos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos, maior risco de desenvolver problemas de saúde bucal, particularmente periodontais e salivares (72).

Para o tratamento das disfunções salivares, os métodos de estímulo podem ser divididos em mecânicos, gustativos, químicos e físicos, e devem ser diferenciados de ações paliativas de controle de sintomas da xerostomia.

O uso de substitutos salivares é um bom exemplo de conduta que alivia os sintomas, contudo não reestabelece produção salivar. Tais lubrificantes com propriedades umectantes são projetados para proporcionar umidificação/molhamento. Apresentam-se como enxaguatórios, géis ou sprays, que podem conter carboximetilcelulose, um mucopolissacarídeo, base de gel de polímero de glicerato, ou mucinas naturais, de forma isolada ou em combinação. Cremes dentais específicos também estão disponíveis para melhora dos sintomas (73).

Os métodos de estimulação mecânicos e gustativos normalmente estão associados. As gomas de mascar sem adição de açúcares são uma boa indicação para aumento do fluxo salivar. Podem conter sistemas de enzimas antimicrobianas para reduzir infecções e para aumentar a lubrificação da boca, bem como podem apresentar um sistema tampão para compensar o ambiente ácido resultante do baixo fluxo salivar (71).

Os sabores fornecidos às gomas de mascar ativam vários receptores e iniciam a cadeia de eventos que leva à percepção de diferentes qualidades gustativas: doce, salgado, azedo, amargo e umami (salgado). A informação processada nas papilas gustativas é retransmitida para fibras aferentes de três nervos cranianos, o facial (VII), glossofaríngeo (IX) e vago (X). Os corpos celulares dessas fibras aferentes estão localizados nos gânglios do nervo craniano, cujos ramos centrais entram no sistema nervoso central no tronco cerebral. A identificação química dos estímulos gustativos é processada pelos núcleos do tronco cerebral, ascendendo ao tálamo gustativo e finalmente alcançando o córtex gustativo (74).

A ação mastigatória das gomas de mascar ativa o sistema nervoso autônomo, principalmente o parassimpático, estimulando os neurotransmissores à secreção salivar, resultado da combinação de três eventos simultâneos: 1- a estimulação colinérgica nervosa que drena o fluido da filtração do plasma sanguíneo para o lúmen acinar; 2- exocitose de grânulos citoplasmáticos contendo proteínas no lúmen acinar e 3- contração mecânica das extremidades secretoras mediadas por células mioepiteliais especializadas (75).

Ainda no tocante à estimulação mecânica das glândulas salivares, os hábitos alimentares merecem atenção. Os indivíduos com diagnóstico de hipossalivação, pela dificuldade de deglutição do bolo alimentar, optam por alimentos mais macios ou úmidos ou, frequentemente, ingerem mais líquidos ao longo das refeições. Essa mudança de comportamento alimentar resulta em uma hipotonicidade das glândulas salivares, as quais passam a drenar menores volumes de saliva. Nesse contexto, o estímulo mastigatório mecânico pode ser prescrito ou ativado seguindo uma nova rotina alimentar rica em fibras, alimentos frescos e consistentes, bem como alimentos azedos e amargos, com o objetivo de aumentar o fluxo salivar (76).

Nas abordagens terapêuticas para a reparação da produção salivar, outro método de estimulação que tem destaque na literatura é o químico ou medicamentoso. Muitos fármacos imitam os neurotransmissores naturais, particularmente os do sistema parassimpático. Os parassimpaticomiméticos são agonistas dos receptores muscarínicos e podem estimular o fluxo salivar. Dois medicamentos parassimpatomiméticos, pilocarpina e cevimelina, são aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) para tratamento de xerostomia e hipossalivação (63).

A pilocarpina é uma acetilcolina muscarínica não seletiva agonista do receptor muscarínico, um alcalóide extraído das folhas de jaborandi encontradas no Maranhão e Pernambuco, também conhecido como *Pilocarpus microphyllus* e *Pilocarpus jaborandi*, respectivamente (77). Existem cinco receptores muscarínicos (M1 – M5). Desses, a pilocarpina atua principalmente para aumentar o fluxo salivar através dos receptores M3. Estes são expressos em tecidos musculares lisos e glandulares. A pilocarpina também estimula a via lacrimal, gastrointestinal e células mucosas respiratórias e pode causar alterações hemodinâmicas transitórias e intolerância ao uso por indivíduos com doença cardiovascular significativa (78).

A cevimelina, por sua vez, tem afinidade específica para subtipos de receptores não presentes em tecido respiratório e, por isso, mesmo com mecanismo de ação semelhante ao da

pilocarpina, apresenta efeitos colaterais mais amenos. Contudo, ambas as drogas têm efeitos colaterais, incluindo sudorese excessiva, rinite, aumento da secreção pancreática e distúrbios urinários e gastrointestinais. Apesar de serem menos comuns, os mais graves efeitos colaterais adversos da pilocarpina e cevimelina envolvem os sistemas cardiovascular e respiratório. O uso das duas medicações é totalmente contraindicado em indivíduos com úlcera gástrica, asma não controlada, hipertensão ou em indivíduos em uso de betabloqueadores.

Ao analisar o perfil polifarmácia do indivíduo portador de DM, a escolha pela estimulação química torna-se limitada, pois apresenta risco iminente de descompensações sistêmicas e locais importantes. Uma abordagem menos invasiva, com poucos efeitos colaterais, boa aceitação pelo paciente e baixo custo corresponde aos métodos físicos de estimulação (79).

A estimulação física da saliva consiste em utilizar aparelhos que repliquem estímulos fisiológicos para o funcionamento das glândulas salivares. A *Transcutaneous Electric Nerve Stimulation* (TENS) é uma alternativa para o envio de estímulos elétricos que resulta na drenagem da glândula. A hipótese que primeiros pesquisadores (32) da eletroestimulação postularam foi que a salivagem fisiológica normal depende de reflexos aumentados e controlados por nervos eferentes simpáticos e parassimpáticos.

O mecanismo de ação do TENS acontece com a liberação de uma corrente elétrica, através da fixação de eletrodos na região externa das glândulas parótidas, sublinguais e submandibulares, que interage com as membranas celulares provocando modificações na transdução de sinais ao ativar canais de cálcio e AMP cíclico (30), além de atuar no aumento do fluxo sanguíneo, da oxigenação, da produção de ATP e na melhora do transporte da membrana plasmática (32). É possível que o TENS estimule diretamente o nervo auriculotemporal, o qual gera impulso secretomotor para a glândula parótida, podendo também exercer estimulação periférica na glândula, resultando em um reflexo de facilitação de saída do fluxo salivar do núcleo central de secreção da medula (80).

Uma frequência elétrica mais baixa com pulsos curtos estimula melhor o sistema parassimpático, que, por sua vez, atua com maior propriedade nas glândulas parótidas. Por outro lado, a utilização de frequência elétrica alta, com pulsos longos, estimula com maior eficiência o sistema simpático e, conseqüentemente, as glândulas submandibulares e sublinguais. Por isso, a realização e avaliação da sialometria de maneira padronizada são importantes e definem o tipo de eletroestimulação necessária e sua previsibilidade de forma individualizada (24, 81).



Após a estimulação, tanto os nervos parassimpáticos quanto os simpáticos causam secreção de fluidos e proteínas, bem como contração das células mioepiteliais e as duas divisões do sistema nervoso autônomo interagem sinergicamente. Uma vez que a atividade parassimpática resulta em grandes volumes de saliva e a atividade simpática resulta em pequenos volumes, a saliva parassimpática é característica sendo como livre de proteína (em termos de concentração) e a saliva simpática como rica em proteína (82).

O TENS parece atuar mais eficientemente como um acelerador do fluxo salivar em vez de um iniciador. Portanto, é provável que seja mais eficaz em casos de diminuição da função das glândulas salivares, em vez de ausência absoluta de função (81, 82).

Indivíduos que utilizam dispositivos eletrônicos, como marca-passo cardíaco, bomba de insulina ou dreno cerebral, não devem ser submetidos à terapia com o TENS. Indivíduos com diagnóstico de epilepsia estão contraindicados e aqueles que utilizam aparelhos auditivos portáteis devem ser orientados a removê-los durante a terapia. Alguns cuidados na colocação dos eletrodos devem ser respeitados, a fim de evitar possíveis efeitos indesejados, como a fixação de eletrodos na região dos seios carotídeos, na musculatura da laringe, em feridas cutâneas, lesões malignas e osteomielites. Ademais, regiões que tenham histórico de aplicação tópica de íons metálicos, como mercúrio, cromo ou iodo, não podem receber corrente elétrica (24).

Como efeitos adversos ao uso do TENS, alguns pequenos relatos sobre contração da musculatura facial pós-estimulação, anestesia da pele da face ou irritação cutânea em indivíduos alérgicos ao látex podem ser encontrados (32).

Embora apresente boas expectativas, a estimulação salivar com o TENS ainda enfrenta controvérsias na literatura. Ensaios clínicos com metodologia diversificada mostram que o resultado clínico não se mantém a longo prazo. Todavia, estudos clínicos randomizados e/ou longitudinais são necessários para melhores esclarecimentos da técnica (35).

Ainda na descrição da estimulação física o laser terapêutico vermelho/infravermelho ou de baixa potência tem parecido promissor na melhora da função salivar (83). O laser é uma luz que se forma a partir da ativação de elétrons no átomo, e, ao adquirir mais energia, transita por estados superiores e resulta em uma emissão estimulada de fótons (23, 84).

Algumas propriedades são requisitadas para caracterizar a luz laser. A monocromaticidade, a coerência espacial e temporal e a colimação. A monocromaticidade caracteriza-se quando a partir da emissão estimulada um fóton é emitido e outros fótons, através dele, recebem a mesma energia, por consequência um comprimento de onda frequência (85).

A coerência espacial acontece quando a amplitude do campo elétrico de um fóton chega ao seu valor máximo e os demais fótons também alcançam seus valores máximos. A coerência temporal refere-se a um determinado instante em que todos os fótons estarão com o mesmo valor de amplitude. E, finalmente, a característica da colimação, na qual o feixe de luz é emitido de forma paralela (86).

Na estimulação física por meio de fototerapia, com laser de baixa intensidade (FLBI), a radiação não tem energia suficiente para remover um elétron da sua órbita e oferecer a ele uma energia cinética, isto é, promover uma ionização do átomo e quebrar ligações químicas. Na FLBI, a radiação é classificada como não ionizante dentro de um comprimento de onda que opera no espectro vermelho visível (600 - 690nm) e no infravermelho próximo (780- 830nm), com aparelhos de potência que variam entre 1 e 500nW (87).

Para ação do laser nos tecidos, a absorção da luz obrigatoriamente precisa acontecer, sendo as moléculas responsáveis pela absorção denominadas como cromóforos ou fotorreceptores. Entre eles, destacam-se a hemoglobina, mioglobina, porfirinas, citocromos mitocondriais, principalmente a enzima C oxidase (83, 86).

O laser de baixa potência ou intensidade atua na excitação de elétrons e na formação de um campo eletromecânico dentro da mitocôndria, o que resulta no aumento dos níveis de cálcio e aceleração da proliferação celular, além de auxiliar na modulação da inflamação, achado comum quando a atividade das glândulas salivares se apresenta reduzida (27, 29). A terapia com laser de baixa energia (comprimentos de onda entre 660 e 904nm) resulta em melhora do fluxo salivar, devido aumento da microcirculação local e da oxigenação por vasodilatação e angiogênese acelerada (83).

Entretanto, a busca na literatura identifica que a maioria dos estudos que avaliam os tratamentos de hipossalivação com métodos físicos não apresentam grupos paralelos, seja sem tratamento, placebos, padrões ouro, ou controles com outros tipos de tratamentos, como, por

exemplo, medicamentos, outros métodos físicos, métodos mecânicos ou gustativos. Sendo assim, um grande desafio metodológico.

Existe uma escassez de estudos com indivíduos portadores de DM com grupo paralelo, com ou sem tratamento, o que não permite uma comparação mais efetiva entre os grupos de intervenção e de controle desde o início da intervenção.

A heterogeneidade entre os protocolos encontrados, o baixo número de estudos disponíveis e atuações clínicas distintas limitam a avaliação da eficácia dos tratamentos e protocolos. Novos estudos com melhores desenhos metodológicos devem ser realizados com intuito de estabelecer protocolos de tratamento confiáveis e eficazes.

### 1.3 Objetivos

#### 1.3.1 Objetivo geral:

O objetivo geral da dissertação foi testar tratamentos não invasivos para manejo da hipossalivação associada ao Diabetes Mellitus (DM), utilizando métodos físicos para estimulação salivar.

#### 1.3.2 Objetivos específicos:

- Comparar parâmetros salivares (aumento do fluxo salivar, melhora da xerostomia) de indivíduos com DM tratados com diferentes métodos de estímulo: Laser, TENS e associação de ambos (CAPÍTULO 3);

- Analisar o microbioma salivar antes e após a estimulação salivar utilizando métodos físicos salivares, laser, TENS e a associação de ambos para estimulação das glândulas em indivíduos com DM (CAPÍTULO 3).

### 1.4. Referências

1. Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Ferraris MEG, PeydrÓ A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:309-14.
2. Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquitam.F. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem*. 2004;0042;261(1:137-42.
3. Malicka B, Kaczmare U, SkoŚKiewicz-Malinowska K. Selected antibacterial factors in the saliva of diabetic patients. *Arch Oral Bio*. 2015;60(3):425-31.
4. Kogawa EM, Grisi DC, Amorim RFB, Rezende TMB, Rocha DPF, Amorim IA, et al. Salivary function impairment in Type 2 Diabetes patients associated with concentration and genetic polymorphisms of chromogranin A. *Clinic Oral Investig*. 2016;20(8):2083-95.
5. Grisi Dc VIVdALAKdOMMCD-TNSLPdOLAS. The Complex Interrelationship between Diabetes Mellitus Oral Diseases and General Health. *Curr Diabetes Rev*. 2022;18.
6. Vieira Lima CP, Grisi DC, Guimarães MDCM, Salles LP, Kruly PdC, Do T, et al. Enrichment of sulphate-reducers and depletion of butyrate-producers may be hyperglycaemia signatures in the diabetic oral microbiome. *Journal of Oral Microbiology*. 2022;14(1).
7. Sreebny LM, Yu A, Green A, Valdini A. Xerostomia in diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1992;15(7):900-11.
8. Wolff A, Joshi RK, Ekström J, Aframian D, Pedersen AML, Proctor G, et al. A Guide to Medications Inducing Salivary Gland Dysfunction, Xerostomia, and Subjective Sialorrhea: A Systematic Review Sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Drugs in R and D*2017.

9. Han P, Suarez-Durall P, Mulligan R. Dry mouth: A critical topic for older adult patients. *Journal of Prosthodontic Research* 2015.
10. Meurman JH, Collin H-L, Niskanen L, Töyry J, Alakuijala P, Keinänen S, et al. Saliva in non-insulin-dependent diabetic patients and control subjects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1998;86(1):69-76.
11. Lone MA, Shaikh S, Lone MM, Afaq A, Lone MA. Association of salivary gland hypofunction with diabetes mellitus and drugs among the elderly in Karachi, Pakistan. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*. 2017;8(2):e12209.
12. de Lima AKA, Amorim dos Santos J, Stefani CM, Almeida de Lima Ad, Damé-Teixeira N. Diabetes mellitus and poor glycemic control increase the occurrence of coronal and root caries: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*. 2020;24(11):3801-12.
13. Carramolino-Cuéllar E, Lauritano D, Silvestre FJ, Carinci F, Lucchese A, Silvestre-Rangil J. Salivary flow and xerostomia in patients with type 2 diabetes. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2018;47(5):526-30.
14. Memon MA, Memon HA, Muhammad FE, Fahad S, Siddiqui A, Lee KY, et al. Aetiology and associations of halitosis: A systematic review. *Oral Diseases*. 2022(January):1-7.
15. Jo JK, Seo SH, Park SE, Kim HW, Kim EJ, Na CS, et al. Identification of salivary microorganisms and metabolites associated with halitosis. *Metabolites*. 2021;11(6).
16. Artico G, Freitas RS, Santos Filho AM, Benard G, Romiti R, Migliari DA. Prevalence of *Candida* spp., xerostomia, and hyposalivation in oral lichen planus - A controlled study. *Oral Diseases*. 2014;20(3):36-41.
17. Seethalakshmi C, Jagat Reddy RC, Asifa N, Prabhu S. Correlation of salivary pH, incidence of dental caries and periodontal status in diabetes mellitus patients: A cross-sectional study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016;10(3):ZC12-ZC4.

18. Vieira CN, Falcão DP, Nunes FdP, Leal SC, Faber J. Avaliação da condição periodontal e da presença de biofilme lingual como indicadores de risco para halitose TT - Evaluation of periodontal condition and tongue coating as risk factors for halitosis. *Periodontia*. 2010;20(2):53-60.
19. Z S Kodzaeva AYTVD. The long-term results of teeth restoration with composite resin materials: a systematic literature review. *Stomatologiya (Mosk)*. 2019;3:117-22.
20. Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. *Journal of oral rehabilitation*. 2018;45(9):730-46.
21. Fox PC, Busch KA, Baum BJ. Subjective reports of xerostomia and objective measures of salivary gland performance. *Journal of the American Dental Association (1939)*. 1987;115(4):581-4.
22. Braga FDF, Lemos CA, Alves FA, Migliari DA. Acupuncture for the prevention of radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer. *BRAZILIAN ORAL RESEARCH*. 2011;25(2):180-5.
23. Cho JH, Chung WK, Kang W, Choi SM, Cho CK, Son CG. Manual acupuncture improved quality of life in cancer patients with radiation-induced xerostomia. *J Altern Complement Med*. 2008;14(5):523-6.
24. Blom M, Lundeberg T, Dawidson I, Angmarmansson B. Effects on local blood flux of acupuncture stimulation used to treat xerostomia in patients suffering from sjogrens-syndrome. *Journal of oral rehabilitation*. 1993;20(5):541-8.
25. Dabić DT, Jurišić S, Boras VV, Gabrić D, Bago I, Vrdoljak DV. The effectiveness of low-level laser therapy in patients with drug-induced hyposalivation: A pilot study. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2016;34(9):389-93.
26. Louzeiro GC, Cherubini K, de Figueiredo MAZ, Salum FG. Effect of photobiomodulation on salivary flow and composition, xerostomia and quality of life of patients during head and neck radiotherapy in short term follow-up: A randomized

controlled clinical trial. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020;209.

27. Nunes FPS, Alhanati B, Vieira CN. In. *Periodontia no Contexto Interdisciplinar – Integrando as melhores práticas VI2*. Napoleão ed. São Paulo 2015.

28. Falcão DP, Leal SC, Vieira CN, Wolff A, Filgueira Galdino Almeida T, De Paula e Silva Nunes F, et al. Sialometry of upper labial minor glands: A clinical approach by the use of weighing method Schirmer's test strips paper. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.

29. Dawidson I, Angmar-Månsson B, Blom M, Theodorsson E, Lundberg T. The influence of sensory stimulation (acupuncture) on the release of neuropeptides in the saliva of healthy subjects. *Life Sci*. 1998;63(8):659-74.

30. Eduarde FDP, Bueno DF, De Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduarde CDP, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: A preliminary study. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2008;40(6):433-8.

31. Saleh J, Figueiredo MAZ, Cherubini K, Salum FG. Salivary hypofunction: an update on aetiology, diagnosis and therapeutics. *Archives of oral biology*. 2015;60(2):242-55.

32. Vieira CN. Importancia da sialometria, halitometria e da presença de saburra como meios de diagnóstico da halitos e da doença periodontal. *Unb*. 2007;6(2):103-.

33. Johnson MI, Ashton CH, Thompson JW. An in-depth study of long-term users of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). Implications for clinical use of TENS. *Pain*. 1991;44(3):221-9.

34. Pandey M, Reddy V, Wanjari P. Comparative evaluation of citric acid and TENS as means for salivary stimulation in adults: An Invivo study. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*. 2019;31(1):36-9.

35. Weiss WW, Jr., Brenman HS, Katz P, Bennett JA. Use of an electronic stimulator for the treatment of dry mouth. *J Oral Maxillofac Surg*. 1986;44(11):845-50.

36. Mercadante V, Al Hamad A, Lodi G, Porter S, Fedele S. Interventions for the management of radiotherapy-induced xerostomia and hyposalivation: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2017;66:64-74.
37. Paim ÉD, Macagnan FE, Martins VB, Zanella VG, Guimarães B, Berbert MCB. Efeito agudo da Transcutaneous Electric Nerve Stimulation (TENS) sobre a hipossalivação induzida pela radioterapia na região de cabeça e pescoço: um estudo preliminar. *CoDAS.* 2018;30(3):1-7.
38. Sivaramakrishnan G, Sridharan K. Electrical nerve stimulation for xerostomia: A meta-analysis of randomised controlled trials. *J Tradit Complement Med.* 2017;7(4):409-13.
39. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal.* 2016;221(10):657-66.
40. Lynge Pedersen AM, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry.* 2019;80(July 2018):S3-S12.
41. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiology.* 2009;9:1-12.
42. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005;43(11):5721-32.
43. Rafaella Cristhina Rego Marques M, Silva JRd, Camilla Pedrosa Vieira Lima M, Cristine Miron Stefani P, Naile Damé-Teixeira P. Salivary parameters of adults with Diabetes Mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.* 2022.
44. Sandberg GE, Sundberg HE, Fjellstrom CA, Wikblad KF. Type 2 diabetes and oral health: A comparison between diabetic and non- diabetic subjects. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2000.



45. Sabharwal A, Ganley K, Miecznikowski JC, Haase EM, Barnes V, Scannapieco FA. The salivary microbiome of diabetic and non-diabetic adults with periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2019;90(1):26-34.
46. Gomar-Vercher S, Simón-Soro A, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM, Mira A. Stimulated and unstimulated saliva samples have significantly different bacterial profiles. *PLoS ONE*. 2018;13(6):1-12.
47. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research*. 2009;19(4):636-43.
48. Mager DL, Haffajee AD, Delvin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. 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;3:1-8.
49. Faveri M, Mayer MPA, Feres M, De Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology*. 2008;23(2):112-8.
50. Park K, Hurley PT, Roussa E, Cooper GJ, Smith CP, Thévenod F, et al. Expression of a sodium bicarbonate cotransporter in human parotid salivary glands. *Archives of Oral Biology*. 2002;47(1):1-9.
51. Huang N, Pérez P, Kato T, Mikami Y, Okuda K, Gilmore RC, et al. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nature Medicine*. 2021;27(5):892-903.
52. von Bültzingslöwen I, Sollecito TP, Fox PC, Daniels T, Jonsson R, Lockhart PB, et al. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2007;103(SUPPL.):S57.e1-S.e15.
53. Helmerhorst EJ. Whole saliva proteolysis: Wealth of information for diagnostic exploitation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098:454-60.

54. Anderson LC, Garrett JR. Neural regulation of submandibular gland blood flow in the streptozotocin-diabetic rat: Evidence for impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Archives of Oral Biology*. 2004;49(3):183-91.
55. Mozaffari HR, Sharifi R, Vaisi-Raygani A, Sadeghi M, Nikray S, Naseri R. Salivary profile in adult type 2 diabetes mellitus patients: A case-control study. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 2019;69(2):190-4.
56. Jensen S, Pedersen A, Vissink A, Andersen E, Brown C, Davies A, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. *Supportive care in cancer*. 2010;18(8):1039-60.
57. Dawes C. Physiological Factors Affecting Salivary Flow Rate, Oral Sugar Clearance, and the Sensation of Dry Mouth in Man. *Journal of Dental Research*. 1987;66(1967):648-53.
58. Pramanik R, Osailan SM, Challacombe SJ, Urquhart D, Proctor GB. Protein and mucin retention on oral mucosal surfaces in dry mouth patients. *European Journal of Oral Sciences*. 2010;118(3):245-53.
59. Falcão DP, Mota LMHd, Pires AL, Bezerra ACB. Sialometria: aspectos de interesse clínico TT - Sialometry: aspects of clinical interest. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2013.
60. Falcao D. Programa de pós-graduação em ciências da saúde. 2014(June).
61. Dp Falcão CNV. Métodos de diagnóstico da halitose in *Odontologia Arte e Conhecimento: Artes Médicas*; 2003.
62. Osailan SM, Pramanik R, Shirlaw P, Proctor GB, Challacombe SJ. Clinical assessment of oral dryness: Development of a scoring system related to salivary flow and mucosal wetness. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2012;114(5):597-603.

63. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: Potential Functions in the Oral Cavity. *Journal of Periodontology*. 2007;78(6):1094-102.
64. Kavouras SA. Assessing hydration status. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2002;5(5):519-24.
65. Maughan RJ, Shirreffs SM. Dehydration and rehydration in competitive sport. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. 2010;20(SUPPL. 3):40-7.
66. Napeñas JJ, Brennan MT, Fox PC. Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). *Odontology*. 2009;97(2):76-83.
67. Agostini BA, Cericato GO, da Silveira ER, Nascimento GG, Costa FDS, Thomson WM, et al. How common is dry mouth? Systematic review and meta-regression analysis of prevalence estimates. *Brazilian Dental Journal*. 2018;29(6).
68. Elad S, Heisler S, Shlit M. Saliva secretion in patients with allergic rhinitis. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2006;141(3):276-80.
69. Sreebny LM, Valdini A. Xerostomia. Part I: Relationship to other oral symptoms and salivary gland hypofunction. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1988.
70. Lima V, Matos I, Vilana M, Adriano M, Jairo A, Filho D. Fisiologia das secreções salivares e gastrintestinais 19.1 introdução.
71. Tan ECK, Lexomboon D, Sandborgh-Englund G, Haasum Y, Johnell K. Medications That Cause Dry Mouth As an Adverse Effect in Older People: A Systematic Review and Metaanalysis. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2018;66(1).
72. Nagao Y, Hashimoto K, Sata M. Candidiasis and other oral mucosal lesions during and after interferon therapy for HCV-related chronic liver diseases. *BMC Gastroenterology*. 2012;12(1):1-.

73. Jensen SB, Mouridsen HT, Reibel J, Brünner N, Nauntofte B. Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary salivary gland hypofunction. *Oral Oncology*. 2008;44(2):162-73.
74. Villa A, Connell CL, Abati S. Diagnosis and management of xerostomia and hyposalivation Therapeutics and Clinical Risk Management Dovepress Diagnosis and management of xerostomia and hyposalivation. Therapeutics and clinical risk management. 2015;11:45-51.
75. Poudel P, Griffiths R, Wong VW, Arora A, Flack JR, Khoo CL, et al. Oral health knowledge, attitudes and care practices of people with diabetes: A systematic review. *BMC Public Health*. 2018;18(1):1-12.
76. Nieuw Amerongen AV, Veerman EC. Current therapies for xerostomia and salivary gland hypofunction associated with cancer therapies. *Support Care Cancer*. 2003;11(4):226-31.
77. Vincis R, Fontanini A. Central taste anatomy and physiology. *Handbook of Clinical Neurology*. 2019;164(Cn Vii):187-204.
78. Porcheri C, Mitsiadis TA. Physiology, pathology and regeneration of salivary glands. *Cells*. 2019;8(9).
79. Pereira LJ, Duarte Gavião MB, Van Der Bilt A. Influence of oral characteristics and food products on masticatory function. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2006;64(4):193-201.
80. Berk L. Systemic pilocarpine for treatment of xerostomia. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2008;4(10):1333-40.
81. Bernardi R, Perin C, Becker FL, Ramos GZ, Gheno GZ, Lopes LR, et al. Effect of pilocarpine mouthwash on salivary flow. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002;35(1):105-10.

82. Brzak BL, Cigic L, Baricevic M, Sabol I, Mravak-Stipetic M, Risovic D. Different Protocols of Photobiomodulation Therapy of Hyposalivation. *Photomed Laser Surg.* 2018;36(2):78-82.
83. Lakshman AR, Babu GS, Rao S. Evaluation of effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on salivary flow rate in radiation induced xerostomia patients: a pilot study. *J Cancer Res Ther.* 2015;11(1):229-33.
84. Dyasnoor S, Kamath S, Khader NFA. Effectiveness of Electrostimulation on Whole Salivary Flow Among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Perm J.* 2017;21:15-164.
85. Hargitai IA, Sherman RG, Strother JM. The effects of electrostimulation on parotid saliva flow: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(3):316-20.
86. Golež A, Frangež I, Cankar K, Frangež HB, Ovsenik M, Nemeth L. Effects of low-level light therapy on xerostomia related to hyposalivation: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Lasers Med Sci.* 2022;37(2):745-58.
87. Simões A, De Campos L, Arana-Chavez VE, Nicolau J. Low Level Laser Therapy for hyposalivation and xerostomia. *Lasers in Dentistry: Guide for Clinical Practice* 2015. p. 335-9.
88. Takac S, Stojanović S. [Characteristics of laser light]. *Med Pregl.* 1999;52(1-2):29-34.
89. Musstaf RA, Jenkins DFL, Jha AN. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *International Journal of Radiation Biology.* 2019;95(2):120-43.
90. Sousa AS, Silva JF, Pavesi VCS, Carvalho NA, Ribeiro-Júnior O, Varellis MLZ, et al. Photobiomodulation and salivary glands: a systematic review. *Lasers in Medical Science.* 2020;35(4):777-88.

## Capítulo 2 – Artigo científico: Salivary stimulation in type 2 diabetes mellitus patients using transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS): one-arm clinical trial

### Abstract

**Objective:** The aim of this pilot study was to analyze the effect of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) on the treatment of hyposalivation and xerostomia in patients with type 2 diabetes mellitus. **Methods:** We selected n=10 patients with unstimulated salivary flow (UWS)  $\leq 0.4$  ml/min. Salivary stimulations were performed using low frequencies and pulses (50Hz and 100u sec) continuous electric current, with electrodes located in the parotid, submaxillary and sublingual region. The intensity was defined by the individual tolerance of each patient, lasting 20 minutes in 10 sessions once a week. Resting saliva was collected for 5 minutes before and immediately after each session. Changes in salivary flow were compared, as well as plaque index before and after salivary gland stimulation treatment. **Results:** After each TENS session, patients reported an improvement in xerostomia. Although a slight increase in salivary flow was observed after each session of TENS stimulation (average increase of  $0.14 \pm 0.09$  mL/min), this increment was not maintained throughout the sessions ( $p > 0.05$ ). **Conclusions:** Even though the tested protocol for salivary electrostimulation did not significantly improved hyposalivation in diabetic patients, further studies are needed to evaluate its potential due to the qualitative improvement in xerostomia.

### Keywords

*Saliva. Diabetes. Salivary stimulation. Hyposalivation. Saliva flow.*

## 2.1 Introduction

The salivary fluid is considered a fundamental component for maintaining oral health. Among its functions are the buffer capacity and tooth remineralization booster, protection and repair of oral, gastrointestinal and oropharyngeal mucosa, as well as control of dental calculus formation [1]. Decrease in salivary flow implies in symptoms and signs such as dryness and painful mouth sensation, burning mouth syndrome, speech hassles, difficulty chewing dry food, dry lips, and thirsty. There are different causes for hyposalivation, and some stands out, such as systemic diseases or metabolic disorders, radiotherapy or chemotherapy, and polypharmacy. Moreover, hyposalivation may predispose to several oral diseases, such as increased caries experience and atypical pattern of caries activity (mainly in the cervical region), mucositis, ulcer, excessive epithelial desquamation, opportunistic infections, xerostomia, loss or decrease of taste buds, taste alteration and nutritional deficiency

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by alteration of blood glucose level, which lead to systemic and oral health complications. Its prevalence has been increasing, especially in low- and middle-income countries, and has reached about 422 million people worldwide representing a public health problem [3]. Several studies have demonstrated a higher hyposalivation prevalence in diabetic patients [3-6]. Therefore, there is probably a metabolic regulation playing an important role in salivary production. However, it seems that the salivary glands, when stimulated, can be as efficient as those of controlled individuals. This may suggest plausibility for the use of mechanical stimulation of the salivary glands as treatment for xerostomia / hyposalivation in diabetics.

Despite the influence of DM, the risk of salivary gland hypofunction can increase according to the amount and type of medication patients take, worsening when more than three different medications are taken daily [7]. Thus, a correct diagnosis and the appropriate therapeutic indication for each case cannot be neglected. Unfortunately, few clinicians have access to tested and validated protocols for the treatment of hyposalivation, empirically applying therapies that can range from palliative care to methods of salivary stimulation [2], which may offer some relief from symptoms, such

as drinking cold drinks, sucking ice or using artificial saliva, which provides transient moisture to the oral cavity [7]. Thus, hyposalivation therapies involving different mechanisms, including mechanical, gustatory, chemical and electrical stimulation of the salivary glands can restore salivary flow in a more lasting way.

The electrical method used to salivary glands stimulation can be the Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS). This is a well-known physiotherapy tool that is useful for relieving muscle pain. TENS has also been proposed as one of the possible treatments for hyposalivation [6, 8-10]. Considering that salivary gland stimulation is theoretically effective in improving salivary production, this technique could be beneficial to patients with hyposalivation and type 2 DM. One of the ways to stimulate the salivary gland would be through Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS). The advantage of TENS is related to its easy manipulation, good patient acceptance and just a few contraindications, such as patients using cardiac pacemakers, brain drain, epilepsy, with hearing aids [6, 11]. Although TENS has a positive effect on the hyposalivation of patients with chemotherapy and/or radiotherapy [12] treatment, studies in DM patients are still scarce [13]. Hence, the aim of the present pilot study was to evaluate the effect of a protocol of electrical stimulation on the treatment of hyposalivation in type 2 DM patients.

## 2.2 Methods

2.1. Design: A pilot one-arm clinical trial was conducted in patients with type 2 DM visiting the University Hospital of Brasilia for general dental practice. Forty-four patients attending the Diabetes Dental Clinic, during the period from 2017 to 2018, underwent a preliminary salivary flow diagnosis, dental and periodontal examinations. Individuals with periodontitis and caries were submitted to treatment and follow-up and the others received oral hygiene instruction and professional prophylaxis. All patients who had unstimulated salivary flow (UWS)  $\leq 0.4$  ml / min were invited to participate, informed verbally and in writing of the purpose of the study.



### 2.2.1 Eligibility criteria

The inclusion criteria were: 1) previous diagnosis of type 2 DM; 2) unstimulated salivary flow value  $\leq 0.4$  ml/min and/or dry mouth symptom; 3) previous non-surgical treatment focused in gingival inflammation control. Exclusion criteria included: 1) individuals with severe systemic comorbidities; 2) smokers; 3) solid organ transplanted; 4) positive history for epilepsy; 5) users of electronic devices such a pacemaker, insulin pump and brain drain; 6) difficulty in motor coordination; 7) presence of systemic conditions that could influence salivary gland physiology, such as Sjogren´s syndrome, hypothyroidism, history of head and neck radiotherapy and chemotherapy treatment in the last 3 months.

### 2.2.2 Sialometry diagnosis

The sialometry test was used for both the diagnostic test and the evaluations before and after salivary stimulation therapies. Patients were instructed to refrain from eating, drinking, brushing and using mouthwash 30 minutes before the exam. At the time of the examination, the patient was instructed to performed hand hygiene with alcohol gel and to remain seated with the feet parallel and fixed on the floor during the whole salivary collection period. Saliva was collected in for 5 minutes, with a 10 mL collector cup positioned between the lower lip and chin. Patients were oriented to keep the body inclined forward, with elbows resting on the legs, and to lead the saliva passively drain to the cup. After that, total salivary flow was measured and the resulting unstimulated salivary flow was expressed as ml / minute [11, 12]. All sialometry procedures were performed in the morning between 9:00 and 11:00 am.

General health, DM control strategies (diet, exercise, medications), glycate hemoglobin (A1c) levels, disease duration since the diagnose, type and amount of medication were assessed for each patient, as well as visible plaque index before and after treatment (visually after drying the teeth). Prior to salivary stimulation therapy, a questionnaire was administered to assess the presence of discomfort associated with hyposalivation and xerostomia. The questionnaire used was Treatment Emergent Symptom Scale (TESS)[13], that contains the following options: 1) No complaints of dry mouth; 2) Suspected or mild feeling of dryness at night or upon waking; 3) Mild complaint

of dryness all the time that prevents normal oral functions; 4) Moderate complaint of dryness with some degree of functional impairment but no perceived health risk, as well as difficulty in swallowing dry foods or speaking; 5) Severe complaint, definite perception of diminished well-being, significant impairment or disability, as well as difficulty swallowing any food, patient needs to drink water all the time and complaint of mouth pain. The patients should choose one of the options, equivalent to their complaint. Patients were classified as none (option 1), mild (options 2 or 3), moderate (option 4) or severe (option 5) complaints of dry mouth.

Table 1 Sample characteristics of patients who received complete salivary stimulation treatment.

Patients	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7
<b>Age Years</b>	60	68	56	68	59	70	65
<b>A1c (%)</b>	8.8	6.4	5.4	6.2	7.7	7.1	6.1
<b>Diagnosi s of UWS ml/min</b>	0.1	0.36	0.4	0.2	0.08	0.22	0.3
<b>Medicati ons</b>	Anti- glycemici nsulin  Losartan, Diuretic	Anti- glycemic  Atorvasta tin	Anti- hyperten sive  Gastric protector	Anti- glycemic,Losar tan  Diuretic	Antiglycem ic Losartan, Diuretic	Antiglycem ic, Losartan, Diuretic	Simvastati n, Glucocortic oid Hormone,r eplacemen t
<b>DryMout h Complai nt*</b>	Moderate	Mild	Mild	Moderate	Moderate	No	Mild
continue							
<b>Salivary diagnosi s</b>	Moderate Hyposali vation	Normosia lia	Normosia lia	Moderate Hyposaliva tion	Severe Hyposaliva tion	Moderate Hyposaliva tion	Normosiali a

---

*at*  
*baseline*

---

All patients were female.  
UWS – unstimulated salivary flow

. \*Based on TESS evaluation: NO complaints of dry mouth; Suspicion or MILD feeling of dryness at night or upon waking; or complaint of dryness all the time that hinders normal oral functions; MODERATE complaint of dryness with some degree of functional impairment but no perceived health risk, as well as difficulty swallowing dry food or speaking. 2.3

### 2.2.3 Treatment protocol

For the treatment of hyposalivation, 10 salivary stimulation sessions with TENS were performed, one session a week. After sialometry examination, patients were instructed to rinse their mouth with 0.12% chlorhexidine gluconate solution for 30 seconds. Then, the skin was cleaned with 70% alcohol and gauze to remove residues (sunscreen, skin oils, makeup) that could influence the fixation of the TENS electrodes. With the patient lying in the comfortable dental chair, the electrodes were placed in a standardized way: a conductive gel was applied in the internal part of each electrode; the positive electrodes were placed and fixed with a tape in the external region of parotids and the negative ones in the external region of submandibular and sublingual. The device (Neurodyn III CLASS A Medical Electrical Device -IBRAMED) was set at 100 Hz frequency and 300 nM pulse in TENS (direct current) mode. The intensity was defined by the individual tolerance of each patient. The duration of therapy was 20 minutes. Control sialometries were performed before and immediately after therapy in all sessions and one week after the tenth stimulation session.

### 2.2.4 Statistical analysis

Frequencies, mean  $\pm$  standard deviation (SD) were generated. Increased salivary flow as well as changes in plaque index before and after TENS treatment were assessed by comparing paired means (Wilcoxon test; SPSS v. 26, for Mac). Data normality was checked (Kolmogorov-Smirnov) and a significance level of 95% was used.

## 2.3 Results

Ten patients started the treatment, however only seven finished the salivary stimulation. Three patients dropped off due to the high frequency of appointments needed for the entire treatment, therefore they were excluded from the results. Table 1 shows the characteristics of the participants. All patients who completed the treatment were female, with ages between 50 - 70 years. N=4 patients presented glycated hemoglobin above 6.5%. Interestingly, the patient with the highest uncontrolled levels of A1c (p1; A1c = 8.8%) presented a diagnosis of the lowest UWS

(0.1 ml/min). Additionally, all patients were using medications for glycemic and blood pressure control for over 10 years. At the first visit, six patients complained about dry mouth sensation throughout their daily routine and reported difficulties in talking for a short time and chewing dry food, as well as frequent choking episodes and spontaneous dryness.

In response to the Treatment Emergent Symptom Scale (TESS) assessment questionnaire, three patients reported moderate complaints of dryness with some degree of functional impairment but no perceived health risk, as well as difficulty swallowing dry foods or speaking others. Three patients reported mild complaints of dryness all the time that impaired normal oral functions, while only one patient reported no complaints of dry mouth (Table 1). Improvement in dry mouth sensation was reported by four patients (p1, p3, p5 and p6) from the third stimulation session and this was maintained until the end of treatment.

Patients reported the use of hypoglycemic medications, which may have important side effects, such as taste disorder. Antihypertensive and diuretics were also used as continuous drugs in all patients. Simvastatin medication was reported as frequent use in six out of seven patients who underwent the complete treatment. Only one patient reported using atorvastatin calcium. Two other medications were cited during the anamnesis: budesonide, a glucocorticosteroid for treatment of chronic rhinitis and only one patient reported long-term insulin use once a day. No anticholinergics or antidepressants with an anticholinergic load were in used during the treatment period.

Figure 1 shows averages of UWS after each session. There was a slight increase in the UWS after each salivary electrostimulation session, with no statistically significant differences (Wilcoxon  $p > 0.05$ ). Table 2 shows the average of UWS difference (calculated as UWS difference = “after 10 sessions – before sessions”) and reduction of visible plaque index. The average increase in salivary flow between each session corresponded to 0.02 ml/min. However, there was no statistically significant difference (borderline result) in the UWS at the end of whole sessions of major salivary gland electrostimulation ( $p = 0.09$ ).

The initial and final sialometry values per patient are shown in Table 3. Of the three patients with normosialia at the baseline (p2=0.368; p3=0.44 and p7=0.3 ml/min), two remained with normal UWS after completing the tested intervention (p2=0.424 and p3=0.400 ml/min). Among the patients with hyposalivation at the baseline (p1=0.10; p4=0.2; p5=0.08; p6=0.22ml/min), two remained with moderate hyposalivation (p1=0.24 and p4=0.2 ml/min), one improved from severe to moderate hyposalivation (p5=0.15 ml/min), and the other from moderate to normosialia (p6= 0.7 ml/min).

Table 2. Increased unstimulated salivary flow (UWS) per session (central trend and variability values for 10 sessions) and reduction of Visible Plaque Index after 10 sessions (Wilcoxon,  $p > 0.05$ )

	<i>UWS difference</i> <i>(ml/min)</i>	<i>Visible plaque index difference</i>
Mean (= SD):	0.02 ( $\pm 0.13$ )	- 19% ( $\pm 18\%$ )
Median:	0.06	13%
25th percentile:	0.02	-29.5%
75th percentile:	0.08	-6.25%

Table 3. Clinical changes of salivary volume (ml/min) after TENS treatment: initial unstimulated salivary flow at baseline; and final salivary flow after 10 sessions of TENS treatment to salivary glands stimulation.



Table 3

Patients	Initial UWS ml/min (clinical diagnosis)	Final UWS ml/min (clinical diagnosis)	Final results ml/min- (clinical diagnosis)	49
p1	0.100 (MH)	0.240 (MH)	0.140 (+)	
p2	0.368 (N)	0.424 (N)	0.056 (+)	
p3	0.440 (N)	0.400 (N)	0.040 (-)	
p4	0.200 (MH)	0.200 (MH)	0.000 (=)	
p5	0.080 (SH)	0.150 (MH)	0.070 (+)	
p6	0.220(MH)	0.700 (N)	0.480 (+)	
p7	0.300 (N)	0.220 (MH)	0.080 (-)	
Average	0.244	0.333	+ 0.386 - 0.06	UWS: Unstimulated salivary flow N = normal; MH= moderate hyposalivation; SH =

severe hyposalivation

(+) means increase in the salivary flow, clinical improvement

(-) means decrease in the salivary flow, clinical impairment

(=) means no changes

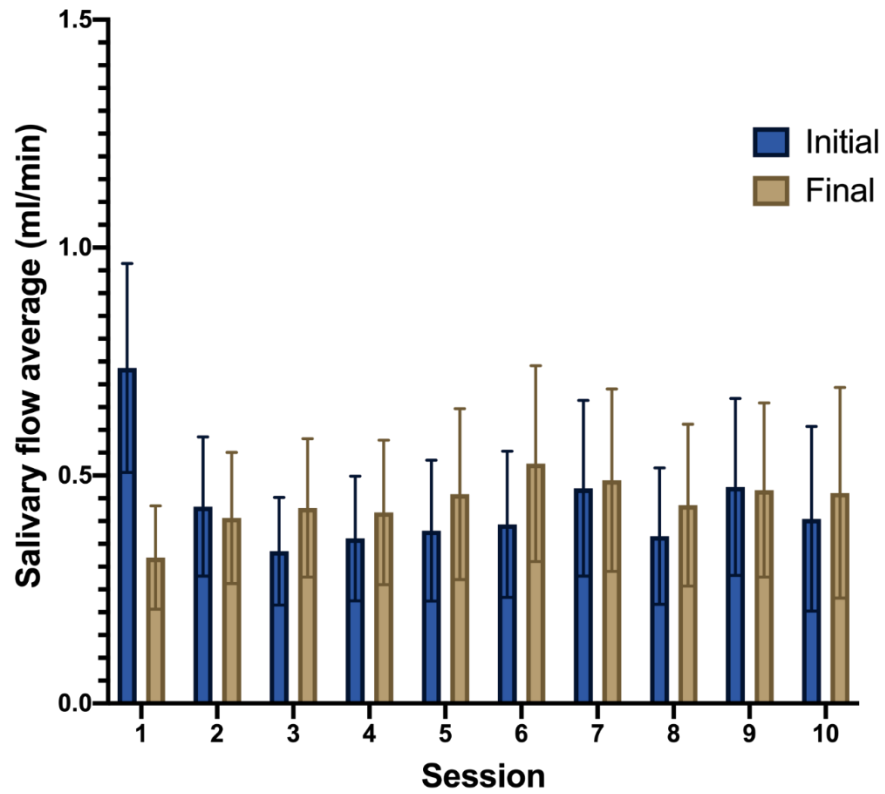


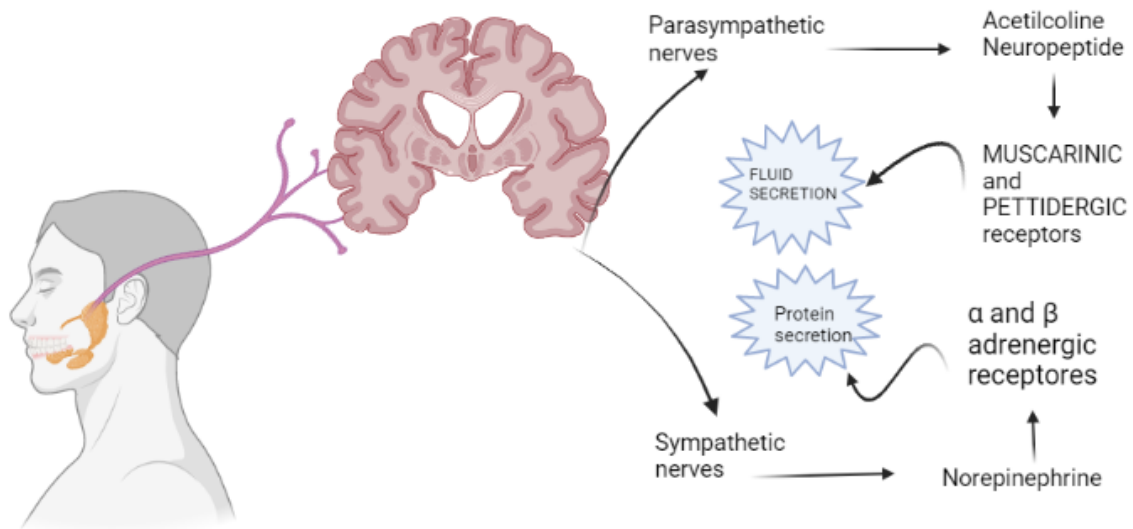
Figure 1. Averages of initial (blue bars) and final (yellow bars) salivary flow in each session. Y-axis represents the average of salivary flow in ml/minute; x-axis represents each session of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) application. (Wilcoxon test);

## 2.4. Discussion

This pilot study aimed to evaluate a protocol of salivary stimulation by using 10 sessions of TENS, once a week for the treatment of hyposalivation and/or dry mouth sensation of Type 2 DM patients. After each session of TENS, a slight immediate increase in the UWS and a higher comfort for the patient in relation to xerostomia could be observed. However, these immediate changes were not maintained from one session to another, demonstrating a tendency to return to the initial level of the salivary flow. Thus, 10 sessions of TENS stimulation were not effective to get a significant salivary volume increase.

Electrical stimulation can be performed using TENS [14] as also described in the electroacupuncture literature [15]. The electric stimulation is consisted by a current emitted by an electrical device which contains electrodes that are fixed in the extern region of the parotid, sublingual and submandibular glands. This electrical current interacts with cell membranes causing changes in signal transduction by activating calcium channels and cyclic AMP [14, 16] increasing blood flow, oxygenation, ATP production and its transportation by the plasma membrane [17].

Figure 2 represents a schematic hypothesis of the mechanism by which the TENS unit worked on the parotid gland, that may be by directly stimulating the auriculotemporal nerve that supplies secretomotor drive to the parotid gland. It is believed that afferent nerves carry such impulses to the salivary nuclei (salivation center) in the medulla oblongata which in turn directs signals to the efferent part of the reflex leading to initiation of salivation [18].



Created in BioRender.com bio

Figure 2. Hypothesis of action of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) in both the sympathetic and parasympathetic nervous systems, activating neuroreceptors that stimulate the specific compartment of acinar cells and results in the production of saliva with serous/fluid characteristic and protein/viscous quality.

It is important to emphasize that the stimulation of the major salivary glands was performed just once a week and probably this frequency was not enough to sustain the results obtained immediately after the electrical stimulus. The pulse and frequency range of the electrical stimulus used in the present study, as well as the number of sessions might have influenced the results. With similar stimulation protocol, menopausal women had increased the salivary flow [16]. The authors highlight the influence of TENS in the direct stimulation of the auriculotemporal nerve that might also stimulate the parotid gland. We believe that the difference in these results could be related to a small sample size and a low weekly frequency of the salivary gland stimulation therapy.

Hyperglycemia is often associated with reduced salivary secretion and high saliva glucose, which may interfere with the salivary functions such as the integrity

protection of the oral mucosa and the physiological cleaning of the oral cavity and oropharynx [19]. Even in patients who have good blood glucose control due to medication and dietary follow-up, significant changes in salivary flow can cause disorders in the routine and quality of life of patients with DM.

In our sample, not all patients had controlled blood glucose levels, which may have generated some confounding bias. Even so, all uncontrolled patients (with initial HbA1C >7.0%) showed clinical improvements regarding dry mouth, which encourages us to improve the saliva stimulation protocol for these patients. However, not only the glycemia level control can alter the physiology of the salivary glands but also the type and number of the medications prescribed. In this context, it is important to emphasize that the patients of the present study were using different types of medication that might have worsened their salivary function [20].

It is important to consider that prolonged ingestion of specific medications often has as a side effect of a decrease in saliva production. The patients included in this pilot study were taking antihypertensives, antiglycemics, antidepressants, among others. It is estimated that over 400 medications can cause hyposalivation, the most common are antidepressants, antiallergics, sedatives, diuretic, and antihypertensive drugs. Some of these medications may have peripheral interactions with the muscarinic salivary gland cholinergic receptor systems, especially antidepressants and antihistamines. Diuretics may change the saliva composition by acting on the balance of salts and water in the body and may have inhibitory effects on electrolytic transporters in the salivary glands [8]. Additionally, the risk of salivary gland hypofunction may increase with the number of medications used, especially when more than three different medications are taken daily [21, 22].

There are several types of antidiabetic drugs that have a negative side effect in the salivary glands. The most common are insulin, metformin, glibenclamide, glimepiride and liraglutide. Metformin and liraglutide often reduce appetite, mainly related to reduced salivation. The medications used to treat hypertension may negatively affect the functioning of the salivary glands [1]. In this study, it was observed that the selected patients used two or more of the above-mentioned medications and this fact may have impaired the hyposalivation treatment. It is important to consider that in most cases it is not possible to change or suppress the medications that are essential for controlling the blood glucose. In this way, the number and type of

medications used by DM patients should represent an important variable to be considered for further studies on hyposalivation treatment.

Several studies have been conducted to determine possible treatments for these hyposalivation conditions, especially in patients with DM [14, 23, 24]. The mechanical, taste, chemical and electrical salivary stimulation methods are possibilities of improvement in the quality of life of these patients and have individualities. The first is to use chewing itself as an activator of the autonomic nervous system; the recommendation towards the consumption of fibrous foods, slow chewing or even the use of chewing gum without added sugars can result in increased salivary flow [2]. The second mechanism of salivary stimulation occurs by excitation of the taste cells that are grouped into taste buds in the mucosae of the tongue, palate, pharynx, epiglottis and upper third of the esophagus. Taste cells extend microvilli and have characteristics of chemical synapses that aid saliva production, especially when sour and bitter taste are stimulated [24]. Thus, the inclusion of citrus or sour fruits and spices may increase the volume of saliva [11]. On the other hand, chemical stimulation is based on the use of parasympathomimetic drugs, mainly pilocarpine and betanecol, capable of increasing salivary flow. Although this strategy of saliva stimulation is effective, it has many adverse effects, such as changes in blood pressure, arrhythmias, and bronchospasm, and should be prescribed with caution and is contraindicated for the group of patients studied [25].

Although TENS did not promote a beneficial effect on the amount of saliva produced by the major salivary gland, patients reported a greater improvement in the dry mouth sensation just after the third session, which was maintained until the end of the treatment. Also, most patients improved the clinical diagnosis of salivary volume. The electrical stimulation performed at the level of major salivary glands might have also stimulated the minor salivary glands which are responsible for mucin secretion. Since mucins are related to oral mucosa's lubrication, the reported comfort might be a consequence of indirect stimulation of the minor salivary glands.

In this way, the electrical nerve stimulation protocol used in the present study improved xerostomia in patients with type 2 DM, but it was not clear regarding hyposalivation. It is important to bear in mind that xerostomic symptoms reported by patients are not necessarily correlated with the volume of produced saliva. It means that it is possible for a normosialic patient have complains of dry mouth even with adequate production of saliva, as demonstrated in patients p2, p3, p7. It is equally true

that hyposalivation (reduction in salivary production) may not be associated with xerostomia [26].

These changes in the perception of comfort and not specifically in the increase in the amount of saliva produced can also reflect on the improvement of the quality of life of patients with DM with hyposalivation, whose management represents a great challenge in the clinical routine, being very important the validation of complaints and sensations reported by patients, which in our study was performed using the TESS questionnaire, which, despite being a subjective assessment, is accepted by the scientific community [27]. In addition, complaints such as difficulty in ingesting dry foods, frequent choking, inherent need to wake up at night to drink water were described and considered common by patients before salivary stimulation and, undoubtedly, a motivation to accept the proposed therapy and participate in the research.

## 2.5. Conclusions

Although no significant positive effect of 10 sessions of TENS on the treatment of hyposalivation in patients with type 2 DM was observed, some xerostomia improvement can be suggested. Further controlled studies with a larger sample size and a different pacing protocol appear to be critical in assessing the salivary electrostimulation strategy using TENS in the treatment of hyposalivation of patients whose systemic condition is compromised, and the discomfort and risks related to saliva deficiency are observed.

### Ethical Approval

Volunteers that accepted participating signed a formal consent. This project was approved by the research ethics committee of the School of Health Sciences of the University of Brasilia (process no. 87962818.4.0000.0030). This study is in accordance with the norms of the Brazilian law, which complies with the Declaration of Helsinki, as revised in 2013.

### Conflict of interest

Authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

This study received honorable mention at the 21st UnB Dental Day, coming from a poster presentation. We thank the patients who collaborated with the research. We also thank the University of Brasilia Scientific Initiation Program – PROIC, 2017/2018. This research was supported by the Research Support Foundation of the Federal District (FAP-DF) (process no. 16991.78.45532.26042017).

## 2.6. References

- [1] López-Pintor RM, Casañas E, González-Serrano J, Serrano J, Ramírez L, De Arriba L, et al. Xerostomia, Hyposalivation, and Salivary Flow in Diabetes Patients. *J Diabetes Res.* 2016; 1-15.
- [2] Han P, Suarez-Durall P, Mulligan R. Dry mouth: A critical topic for older adult patients. *J Prosthodont Res.* 2015;59:6–19.
- [3] Kogawa EM, Grisi DC, Amorim RFB, Rezende TMB, Rocha DPF, Amorim IA, et al. Salivary function impairment in Type 2 Diabetes patients associated with concentration and genetic polymorphisms of chromogranin A. *Clin Oral Investig.* 2016;20:2083–95.
- [4] Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem.* 2004;0042;261:137–42.
- [5] Marques RCR, Silva JR da, Vieira Lima CP, Stefani CM, Damé-Teixeira N. Salivary parameters of adults with Diabetes Mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 2022;134:176-188.
- [6] Weiss WW, Brenman HS, Katz P, Bennett JA. Use of an electronic stimulator for the treatment of dry mouth. *J Oral Maxillofac Surg.* 1986;44:845–50.
- [7] Liu B, Dion MR, Jurasic MM, Gibson G, Jones JA. Xerostomia and salivary hypofunction in vulnerable elders: Prevalence and etiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114:52–60.



- [8] Nimma VB, Ramesh T, Sudhakara Reddy R, Lavanya Reddy R, Swapna LA. Effect of TENS on whole saliva in healthy adult Indians: Evaluation of influence of protocol on quantity of saliva measured. *Cumhur Dent J.* 2012;15:235–40.
- [9] Pattipati S, Patil R, Kannan N, Kumar B, Shirisharani G, Mohammed R. Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation induced parotid stimulation on salivary flow. *Contemp Clin Dent.* 2013;4:427–31.
- [10] Ojha S, Bhovi TV, Jaju PP, Gupta M, Singh N, Shrivastava K. Effectiveness of transcutaneous electrical nerve stimulation on saliva production in post-radiated oral cancer patients. *J Indian Acad Oral Med Radiol.* 2016;28:246–51.
- [11] Falcão DP. Métodos de diagnóstico da halitose in *Odontologia Arte e Conhecimento.* Artes Médicas; 2003. 2-19.
- [12] Simões A, De Campos L, Arana-Chavez VE, Nicolau J. Low Level Laser Therapy for hyposalivation and xerostomia. In: *Lasers in Dentistry: Guide for Clinical Practice.* 2015.335-339.
- [13] Louzeiro GC, Cherubini K, de Figueiredo MAZ, Salum FG. Effect of photobiomodulation on salivary flow and composition, xerostomia and quality of life of patients during head and neck radiotherapy in short term follow-up: A randomized controlled clinical trial. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2020;209:111933.
- [14] Nunes FPS, Alhanati B, Vieira C. Aspectos gerais da halitose. In: Silva EB, Grisi DC. *Periodontia no Contexto Interdisciplinar – Integrando as melhores práticas: a interface periodontia e condições sistêmicas.* Nova Odessa, SP: Napoleão; 2015; 214-225.
- [15] Johnson IM, Ashton HC, Thompson W. An in-depth study of long-term users of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). Implications for clinical use of TENS. *Pain.* 1991; 44:221–9.
- [16] Konidena A, Sharma D, Puri G, Dixit A, Jatti D, Gupta R. Effect of TENS on stimulation of saliva in postmenopausal women with or without oral dryness – An interventional study. *J Oral Biol Craniofacial Res.* 2016;6:S44–50.
- [17] Dyasnoor S. Effectiveness of Electrostimulation on Whole Salivary Flow Among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Perm J.* 2017;1–6.
- [18] Saraf KV, Shashikant MC AI. Evaluation of the effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on whole saliva flow: A clinical study. *J Indian Acad Oral Med Radiol.* 2009; 21:7-11.
- [19] Da Rosa AM, M Marques MS, Albuquerque IP, Correa FS. Hipossalivação e aumento da glicose salivar em diabéticos. *Odonto.* 2007;15:78.
- [20] Villa A, Wolff A, Aframian D, Vissink A, Ekström J, Proctor G, et al. World Workshop on Oral Medicine VI: a systematic review of medication-induced salivary

gland dysfunction: prevalence, diagnosis, and treatment. *Clinical Oral Investigations*. 2015;19. 1-28.

[21] Yarid SD, Garbin, CAS, Garbin, AJI, Francisco, KMS, Sumida D. Conduta odontológica no atendimento a portadores de diabetes mellitus. *Rev Saúde Com*. 2010;6:74–85.

[22] Bretasi LP, Rocha I, Esteves M, Vieira MS, Rodrigues ACP. Fluxo Salivar e Capacidade Tamponante da Saliva como Indicadores de Susceptibilidade à Doença Cárie. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2008;289-293.

[23] Dhillon M, M Raju S, S Mohan R, Tomar D. Efficacy of Transcutaneous Electric Nerve Stimulation on Parotid Saliva Flow Rate in Relation to Age and Gender. *J Dent (Shiraz, Iran)*.2016;17:164–70.

[24] Kandel E R, Schwartz, James H, Siegelbaum SA. [Olfacção e Gostação: os sentidos químicos] [in Portuguese]. 5. In: *Princípios da Neurociência*. 2014. 1544 p.

[25] Bernardi R, Perin C, Becker FL, Ramos GZ, Gheno GZ, Lopes LR, et al. Effect of pilocarpine mouthwash on salivary flow. *Brazilian J Med Biol Res*. 2002;35:105–10.

[26] Dawidson I, Angmar-Månsson B, Blom M, Theodorsson E, Lundeberg T. Sensory stimulation (acupuncture) increases the release of calcitonin gene-related peptide in the saliva of xerostomia sufferers. *Neuropeptides*. 1999;33:244–50.

[27] Han P, Suarez-Durall P, Mulligan R. Dry mouth: A critical topic for older adult patients. *J Prosthodont Res*. 2015;59:6–19.

### **Capítulo 3 – Artículo científico: Clinical and microbiological shift after management of hyposalivation in individuals with Diabetes Mellitus using of physical stimulation methods: preliminary results of a randomized clinical trial.**

#### 3.1 Introduction

Salivary fluid is an important tool for clinical diagnose of a wide range of diseases and conditions due to the practicality of use, reliability, content richness, and the low cost for its evaluation. It has emerged as a powerful marker for the sequencing of the human genome and microbiome (1, 2). A healthy salivary flow plays a vital role in oral health due to the capacity to balance the oral pH, to promote oral cleanness, and controlling the development of oral dysbiosis related to caries (3), periodontitis (4), and halitosis (5, 6).

An insufficient salivary flow alters the saliva composition and function, reducing the oral mucosal lubrication, and impairing the healing process and the antimicrobial capacity. Qualitative and quantitative salivary alterations increase the risk of traumatic oral lesions and fungal, bacterial, and viral diseases. Furthermore, salivary dysfunction can hamper the masticatory function, altering the ability to chew and to form the food bolus properly (7). In individuals with Diabetes Mellitus (DM), reduced salivary flow increases the risk of caries, as well as negatively impact their quality of life (1–3). Individuals with DM have reduced stimulated and unstimulated salivary flow and altered biochemical parameters when compared with those without DM, including higher salivary urea and glycemia (8, 9). Hyperglycemia can cause acidification of the oral environment and alter the oral microbial diversity of diabetic individuals (10). Moreover, uncontrolled glycemic levels cause a higher impact in unstimulated salivary flow levels than controlled ones (8). This might be caused by adverse hormonal function, microvascular, and neuronal changes in poorly controlled DM (11).

Thus, the management of the salivary flow by stimulating the residual function of the salivary gland become indispensable for the establishment of microbial balance in the oral cavity in individuals with DM (12, 13). The management of their salivary flow might mechanically remove microorganisms from dental and tongue biofilms, helping to maintain a microbial population compatible with oral health. This has been shown

when comparing the microbiota of stimulated and unstimulated saliva: stimulated saliva may contain a number of species more than three times greater than the unstimulated one (1).

However, standardized protocols for the diagnosis and treatment of hyposalivation are still scarce in the daily clinical practice. Clinical management is unknown to most dental professionals, and many undergraduate courses do not approach the subject (14, 15). Different methods have been used to establish a healthy saliva and/or to improve the quality and quantity of saliva, such as chemical/drug stimulation with the use of pilocarpine and cevimeline (16); gustatory stimulation in which the patients were advised to include citrus or sour foods in their diet mechanics; mechanical stimulation by chewing either hyperboloids or gum; and physical stimulation such as low-level laser therapy and transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS).

In the present study, we aimed to test two physical methods as strategy for hyposalivation management of individuals with DM: Transcutaneous electric nerve stimulation (TENS) and low-level laser therapy. This preliminary results from a randomized clinical trial includes the data on nine individuals diagnosed with DM and hyposalivation, submitted to salivary stimulation by physical methods: low-level laser (group 1), TENS (group 2) and the association of laser and TENS (group 3), for 10 sessions, twice a week. Analysis of saliva volume, biochemical and microbial composition using 16S rRNA Illumina sequencing were performed before and after stimulation.

## 3.2 MATERIALS AND METHODS

### 3.2.1 Trial design

This is a preliminary result of a randomized clinical trial with parallel groups with allocation ratio of 1:1, registered at the REBEC, and reported according to the CONSORT checklist (<http://www.consort-statement.org>). The acronym PICO was used to design the research question, where P= adults diagnosed with type 2 diabetes mellitus; I=TENS and Laser; C=association of laser and TENS; O= salivary flow volume, microbial composition, and diversity.

### 3.2.2 Participants

Individuals were selected at the Diabetes Dental Clinics of the University Hospital of Brasilia. All Individuals with controlled DM were invited to participate, informed verbally and in writing of the purpose of the study and had signed the Free and Informed Consent Form. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Brasília, under the number 4.748.761 CAAE 45184721.7.0000.0030.

### 3.2.3 Eligibility criteria

Individuals to be included should be adults with age ranging from 30 to 65 years, with previous medical diagnose of type 2 DM, and controlled periodontal disease, considering the bleeding on probing index and the percentage of visible plaque (17). They should also present unstimulated (resting) salivary flow  $\leq 0.2$  ml/min, stimulated salivary flow  $\leq 0.7$  ml/min, and/or dry mouth complaint according to TESS questionnaire in which they would choose one of the four alternatives of dry mouth complaint (details on the instrument will be detail later).

Individuals were excluded if they had severe systemic complications and comorbidities such as Sjogren's syndrome, hypothyroidism, history of radiotherapy in the head and neck regions and chemotherapy treatment preceding 3 months; who do not have their glycated hemoglobin levels tested; smokers; transplanted; with history for epilepsy; using electronic devices such as: pacemaker, insulin pump and brain drain; difficulty in motor coordination.

### 3.2.4 Interventions

After recruiting, participants were randomly distributed in 3 groups to receive the following treatments for hyposalivation:

- Group 1 (G1) – Salivary stimulation through low-level laser
- Group 2 (G2) - Salivary stimulation through TENS
- Group 3 (G3) - Association of both therapies: low level laser + TENS

Hyposalivation treatment was performed according to the study group to which the individual was allocated. In all treatments, 10 sessions of salivary stimulation were done, twice a week, respecting each clinical protocol: after the sialometry exam, the individuals were instructed to rinse the mouth with a 0.12% chlorhexidine gluconate solution for 30 seconds. Then, the skin was cleaned with alcohol 70% and gauze to remove residues (sunscreen, skin oil, makeup), which could influence the penetration of laser light or the fixation of the TENS electrodes.

Laser irradiation included the following steps: The individuals were instructed to lie down in the dental chair. The RED LASER (100W, 660nm – 0.5 J/point) was applied in the intraoral region, in 10 points in the lower labial mucosa, 6 points in the upper labial mucosa, 3 points in the buccal mucosa, 2 points in the floor of the tongue, 4 points at the boundary of soft palate and hard palate. The INFRARED LASER (100W- 808nm – 1J/point) was applied in the extraoral region, in 6 points in the parotid region and 2 points in the submandibular and sublingual region. Both the dentist and the individuals wore specific protective eyewear for irradiation during the entire treatment with the use of laser. Device used: Laser DMC – Therapy EC.

For the application of TENS, the individuals were lying in the dental chair, in a comfortable position. The placement of the electrodes was standardized with the placement of positive electrodes in the external region of parotids and negative electrodes in the external region of the submandibular and sublingual, smeared with conductive gel and fixed with masking tape. The device (Neurodyn III CLASS A Medical Electrical Device – IBRAMED) was set at 100 Hz frequency and 300 nm pulse

in TENS (direct electrical current) mode., for 20 minutes. The intensity was defined by the individual tolerance of each individual.

### 3.2.5 Sample Size

The sample size was performed using the web tool OpenEpi.com for average differences of the main outcome salivary flow using a pilot study. The expected mean difference before and after salivary flow stimulus was 0.11 ml/min, and standard deviation (SD)= 0.09 ml/min and 0.002 ml/min, with a significance ( $\alpha$ ) = 0.05; power ( $1-\beta$ ) = 0.80; and dropout = 0.40. The final sample size was n=8 individuals per group, totaling n=16 research subjects. For these preliminary results on the microbiological outcomes, 9 participants were evaluated, and each donated both unstimulated and stimulated saliva for sequencing.

### 3.2.6 Randomization

A table with random numbers was generated using the free tool available at the website Openepi.com. The numbers were hidden in a brown envelope by a different researcher than the operator. Each envelope contained the group in which the individuals would be allocated and only revealed to the operator immediately before starting the saliva stimulation and after the periodontal treatment.

### 3.2.7 Blinding

A blinding studying protocol was not feasible due to the inner characteristics of each hyposalivation treatment. Therefore, both the clinical operator who had performed the treatments and the Individuals who had received the saliva stimulation were aware of the treatment group they were allocated to. Only one operator performed the diagnosis of periodontal disease and was also responsible for the application of electrical methods of salivary stimulation.

## 3.3 Outcomes

### 3.3.1 Sialometry

The sialometry exams were used both for the diagnostic exam and for the pre and post salivary stimulation therapy assessments. Stimulated and unstimulated saliva flow samplings were performed in the morning (8-10 am) to minimize the effect

of circadian rhythms. The participant was instructed to refrain from eating, drinking, using mouthwash and performing oral hygiene half one hour before the sialometry

Immediately before the sialometry, the individuals performed hand hygiene with alcohol in gel. For saliva collection, Individuals were advised to seat with the feet parallel and fixed on the floor and to keep the body inclined with elbows resting on the legs. A disposable cup was positioned between the lower lip and the chin, leaving themouth slightly open for five minutes, during which the volume of saliva produced was passively drained to the cup. The saliva was aspirated with a millimeter syringe to measure the total amount of saliva. The amount of saliva collected was then divided by 5 to express the unstimulated saliva flow in ml/minute.

The analysis of stimulated saliva was performed using a duly standardized sterilized tourniquet (1 cm) fixed in dental floss. In the same body position, the individuals received the tourniquet and was advised to chew it for five minutes. The volume of saliva produced was actively deposited in a disposable cup (individuals was able to spit out all the saliva that was in the mouth), and then measured as for the unstimulated saliva flow. Upon collection, 500 $\mu$ L of the unstimulated and stimulated saliva samples were aliquoted into microtubes and pellets and stored at -20°C until further DNA extraction and sequencing, for microbiological analysis.

The unstimulated and stimulated salivary flow were measured after the 6<sup>th</sup> of hyposalivation treatment session and at the end of the 10<sup>th</sup> session, using the same protocol described for the saliva diagnose.

Qualitative assessment was also addressed before and after the 10 treatment sessions with the application of the questionnaire using the Treatment Emergent Symptom Scale (TESS) method, using the following scores: (0) No complaints of dry mouth; (1) Suspicion or slight feeling of dryness at night or upon waking;(2) Mild complaint of dryness all the time that impedes normal oral functions; (3) Moderate complaint of dryness with some degree of functional impairment, but no perceived health risk, as well as difficulty in swallowing dry foods or speaking; and (4) Severe complaint, definite perception of diminished well-being, significant impairment or disability, as well as difficulty in swallowing any food, needs to drink water all the time and with complaint of pain in the mouth (18).



### 3.3.2 Visual analysis of tongue coating

Tongue coating analysis was performed visually in virtual sextants on the lingual dorsum, which received the following scores: 0 = no substrate; 1= light substrate (visible papillae); 2= severe substrate (no visible papillae). The sum of the scores was the final score described for each participating individual (19). *Salivary microbiome analysis using 16S rRNA*

Total salivary DNA was extracted, the 16S rRNA gene was partially amplified, and sequenced using the Illumina protocol as described elsewhere (13). Briefly, DNA was extracted from saliva using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), the V4 region of the 16S rRNA gene was (primers 564F/806R), and sequenced paired end sequenced on the Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, USA).

Samples from each participant were coded as follows: Group 1(Laser): P4, samples F282 and F281; P8, samples F181 and F183; Group 2 (TENS): P2, samples F51 and F52; P3, samples F201 and F202; P5, samples F171 and F172; P7, sample F311; P9, no microbiological samples; Group 3 (Laser + TENS): P1, samples F111 and F112; P6, samples F44 and F3.

### 3.3.3 Bioinformatics and statistical methods

The amplicon sequence variants (ASVs) were generated by DADA2 – (20). Reads were trimmed, and filtered by quality and size, as previously described (21). The taxonomy was assigned using the Silva v.138 database. ASVs assigned to Eukaryote, Chloroplast, and Mitochondria were removed before downstream analysis.

The alpha diversity was estimated for a dataset of sequence variants rarefied by the rare curve function from vegan R package (22). The Shannon's index, Chao1's index, and the Pielou index of samples were determined using the Microbiome R package (23) transformed relative abundances of sequence variants combined at genus level (or the highest taxonomic level annotated) were used to build a Bray-Curtis similarity matrices. The ordination plot was plot in a non-metric multidimensional scaling (nMDS) using the Phyloseq package in R (24). Microbial taxa with differential abundance between groups of treatments were obtained by DESeq algorithm with Benjamini-Hockenberg (BH) correction test (DESeq2 package) (25).

Mean and standard deviation were calculated for clinical characteristics, according to the treatment group. Pearson's correlation, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis non-parametric tests were applied for data comparison using SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

### 3.4 RESULTS

Clinical and sociodemographic characteristics of the individuals are shown in table 1. The average age of individuals within the laser, TENS, and laser + TENS groups were  $57.0 \pm 6.3$ ,  $54.8 \pm 5.4$ , and  $53.5 \pm 4.9$ , respectively. Only male participants were allocated in the laser and laser + TENS groups, although a randomization was performed. However, in the TENS group, the number of allocated individuals was higher, and then a balanced male-female rate was achieved. Dry mouth complaint was confirmed in a 100% of the individuals included. Most Individuals concluded the treatments, except for one from the TENS group. The initial glycated hemoglobin level was described in table1.

A randomization was carried out to obtain a regular distribution of the saliva diagnosis between the groups. However, in this preliminary sample, a higher number of individuals with assialia were allocated in the TENS group. The initial unstimulated saliva flow for diagnosis is described in table 1. This was not a problem for the stimulated salivary flow, where the clinical diagnose of hyposalivation and normal saliva was balanced. Since three individuals presented an initial stimulated salivary flow of 0.0 ml/min, those individuals have only the final sample with the salivary microbiome evaluation.

Table 1 also shows the baseline (immediately before starting the protocol of salivary stimulus) and final salivary flow (after the conclusion of each treatment). Individuals who presented a normal unstimulated saliva at the baseline (P8 and P5) did not worsen or improved their unstimulated saliva flow after treatment. Only one individual (P3) presented an improvement. However, promising results were observed in the stimulated salivary volume improvement. Few individuals presented saliva clinical improvement: 1 in laser group (P4); 3 in TENS group (P2, P3, P5), and one in laser + TENS group (P6). Two individuals presented severe hyposalivation at the baseline (P4, laser group) and P6 (laser + TENS group), which improved for a normal saliva after the treatment. On the other hand, P7 (TENS group) remained with severe

hyposalivation even after saliva stimulation. One individual who presented a normal stimulated saliva in the baseline (P1) did not worsen or improved their unstimulated saliva flow after treatment. Only one individual (P8) had decreased the stimulated salivary flow after laser treatment.

In the TENS group it is not possible to observe an improvement in the unstimulated and in the clinical diagnose after unstimulated sialometry in most individuals, except for P5 who already presented normal saliva at the baseline. Individuals in the TENS group demonstrated a better improvement in their stimulated saliva and in their clinical diagnose after TENS stimuli. Higher stimulated salivary flow was observed in most individuals, except for individual P9 who did not conclude the saliva stimulation sessions. P7 did not respond properly to TENS stimuli, since his/her unstimulated and stimulated saliva remained unchangeable (Table 2)

Salivary stimulation through the association of laser+TENS improved the stimulated salivary flow of individuals P1 and P6 and showed a slight increase, 0.1 and 0.05 ml/min respectively, in the non-stimulated flow.

Individual P4 of the laser group exhibited improvement in unstimulated and more pronounced in the stimulated saliva, presenting a clinical diagnose of hyposalivation in the unstimulated sialometry and a normal saliva after stimulation. Interestingly, P8 had no unstimulated saliva improvement, but had a slight reduction in the stimulated salivary flow (Table 2).

Table 2 shows the analysis of the tongue coating before and after salivary stimulation treatments. In the laser group, P4 presented a score 0 initially and score 3 after saliva stimulation, however P8 showed no difference. In the TENS group, one participant showed improvement in the tongue coating index, showing only one surface with accumulation. On the other hand, individuals P3 and P5 presented a worsened index by 4 and 3 points, respectively. Participant P7 with a diagnosis of severe hyposalivation and no improvement in salivary flow did not present alteration in the tongue coating. However, when laser + TENS group was analyzed, both P1 and P6 had a significant improvement, even without changes in the diagnosis of hyposalivation, in the case of P1.

---

**Tabela1- Characteristics of the participants with Diabetes Mellitus, initial diagnosis for recruitment, and salivary characteristics before (baseline) and after management of salivary gland hypofunction using of physical stimulation methods.**

Treatment/Group	Laser/ G1		TENS /G2					Laser+TENS/ G3	
Participant label	F281 (P4)	F183 (P8)	F51 (P2)	F201 (P3)	F171 (P5)	F311 (P7)	P9*	F11 (P1)	F43 (P6)
<i>Participants characteristics and initial diagnosis for recruitment</i>									
Gender	Male	Male	Male	Female	Male	Female	Female	Male	Male
Age	53	62	55	51	56	63	49	50	57
Age (Mean age ± SD)	57.5 ± 6.36		54.8 ± 5.40					53.5 ± 4.94	
HbA1C level (%)	5.8	6	7.9	8.4	7.8	8.3	*	8	7.1
Diagnosis of NSF for recruitment	Assialia	Normal	Assialia	Hiposi alia	Normal	Assialia	Assialia	Hiposi alia	Hiposi alia
SSF (ml/min) for recruitment	0.12	1.60	0.0	1.4	0.20	0.40	0.0	1.80	0.20

Treatment conclusion	yes	yes	Yes	yes	yes	yes	no	yes	yes	
<i>Continue Baseline (immediately before the treatment)</i>										
<b>Baseline SSF (ml/min)</b>	1.00	1.20	0.50	1	0.62	0.28	--	2.54	0.80	
<b>Diagnosis of SSF</b>	Severe hyposalivation	Normal	Assialia	Moderate hyposalivation	Severe hyposalivation	Severe hyposalivation	Assialia	Normal	Severe hyposalivation	
<b>Baseline NSF (ml/min)</b>	0.02	0.40	0.0	0.18	0.30	0.0	0.0	0.2	0.20	
<b>Diagnosis of SSF</b>	Severe hyposalivation	Normal	Assialia	Normal	Severe hyposalivation	Severe hyposalivation	Assialia	Normal	Severe hyposalivation	
<b>Dry mouth complaint-TESS - baseline</b>	4	2	2	2	2	4	4	4	1	
<i>After treatment</i>										
<b>Final SSF (ml/min)</b>	1.50	1.20	0.80	1.50	1.10	0.34	--	1.60	1.60	
<b>Final NSF (ml/min)</b>	0.02	0.40	0.0006	0.2	0.6	0.01	--	0.3	0.15	
<b>Final Clinical Diagnose</b>	Normal hyposalivation	Moderate hyposalivation	Moderate hyposalivation	Normal	Moderate hyposalivation	Severe hyposalivation	--	Normal	Normal	
<b>Final dry mouth complaint-TESS final</b>	2	1	1	1	1	2	--	1	1	

Legend: \* individuals did not conclude the treatment; SSF= stimulated salivary flow; NSF = unstimulated salivary flow; Dry mouth complaint after treatment (TESS) :1=Suspicion or slight feeling of dryness at night or upon waking; 2= Mild complaint of dryness all the time that impedes normal oral functions; 3= Moderate complaint of dryness with some degree of functional impairment, but no perceived health risk, as well as difficulty swallowing dry foods or speaking.; 4= Severe complaint, definite perception of diminished well-being, significant impairment, or disability, as well as difficulty in swallowing any food. Individual needs to drink water all the time and you feels pain in mouth.

Table 2 - Tongue coating index before and after stimulation treatment

Individuals	P4	P8	P2	P3	P5	P7	P9*	P1	P6
Group	Laser		TENS					Laser+TENS	
	G1		G2					G3	
Initial Tongue coating score	0	6	8	3	1	0	12	12	10
Final Tongue Coating Scorel	3	6	1	7	3	0	--	6	2

Analysis of the lingual substrate was performed visually in virtual sextants on the lingual dorsum, which received the following score: 0 = no substrate; 1= light substrate (visible papillae); 2= severe substrate (no visible papillae). The sum of the scores was the final score described for each participating individual

### Diversity and composition of the salivary microbiome

Shannon diversity for rarefied data (30000 sequences) showed significant differences between the Laser and the TENS groups, but no differences for those groups against the combined group TENS + Laser. However, when the type of saliva (unstimulated saliva and stimulated saliva) was considered in the analysis, this difference was not sustained. No differences were found in the Shannon diversity regarding the type of saliva or clinical improvement of the salivary flow comparing the salivary flow diagnosis in the baseline and after treatment (Figure 1).

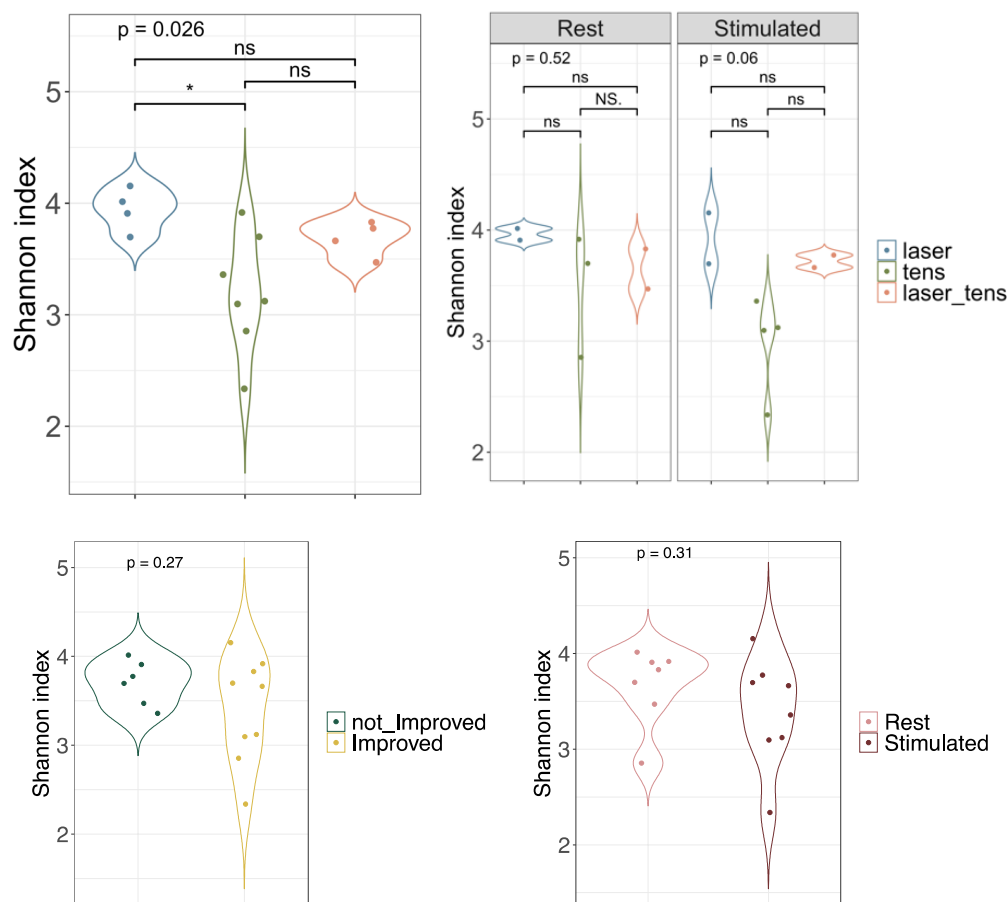


Figure 1. Alpha-diversity indexes displayed by sample group (Laser N=4, TENS N=7, or laser + TENS N=4), clinical improvement of the salivary flow, and type of saliva (rest or stimulated) (Shannon index). Statistics using parametric test ANOVA (for groups), and Shapiro-Wilk normality test ( $W = 0.91343$ ,  $p$ -value = 0.1528).

Beta diversity was measured by Bray-Curtis distance on MDS plot, and displayed by the type of hyposalivation treatment (laser, TENS or laser + TENS), and in relation to

the type of saliva (unstimulated or stimulated saliva). The corresponding samples of both unstimulated and stimulated saliva of TENS were more distant than those of laser or laser + TENS (Figure 2). Samples of unstimulated and stimulated saliva of the laser group were closer than the samples of the combined treatment (laser + TENS), in which unstimulated saliva samples were more distant than stimulated saliva samples (Figure 2).

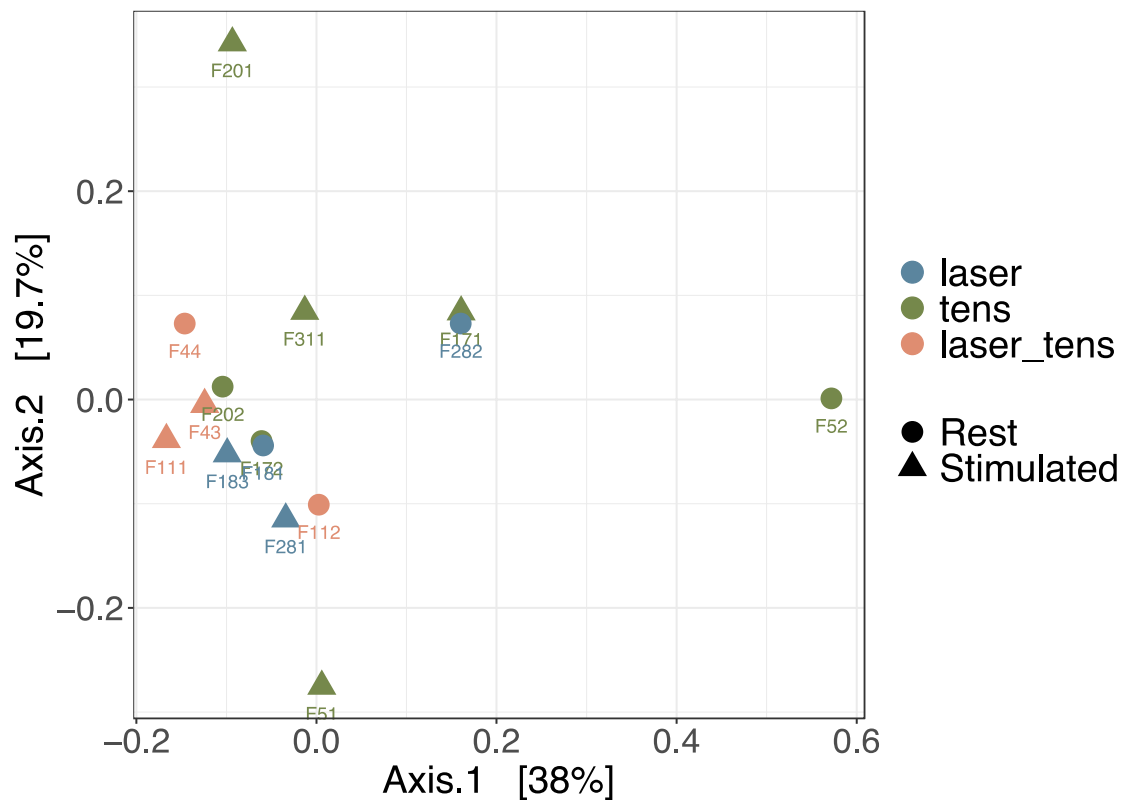


Figure 2. Beta diversity measured by Bray-Curtis distance on MDS plot, displayed by treatment (Laser, TENS or combining Laser and TENS), and in relation to the type of saliva (rest or stimulated). Statistics using PERMANOVA (ADONIS) with 10,000 permutations ( $n=15$ ). Laser: P4, samples F282 and F281; P8, samples F181 and F183; TENS: P2, samples F51 and F52; P3, samples F201 and F202; P5, samples F171 and F172; P7, sample F311; P9, no microbiological samples; Laser + TENS: P1, samples F111 and F112; P6, samples F44 and F3.



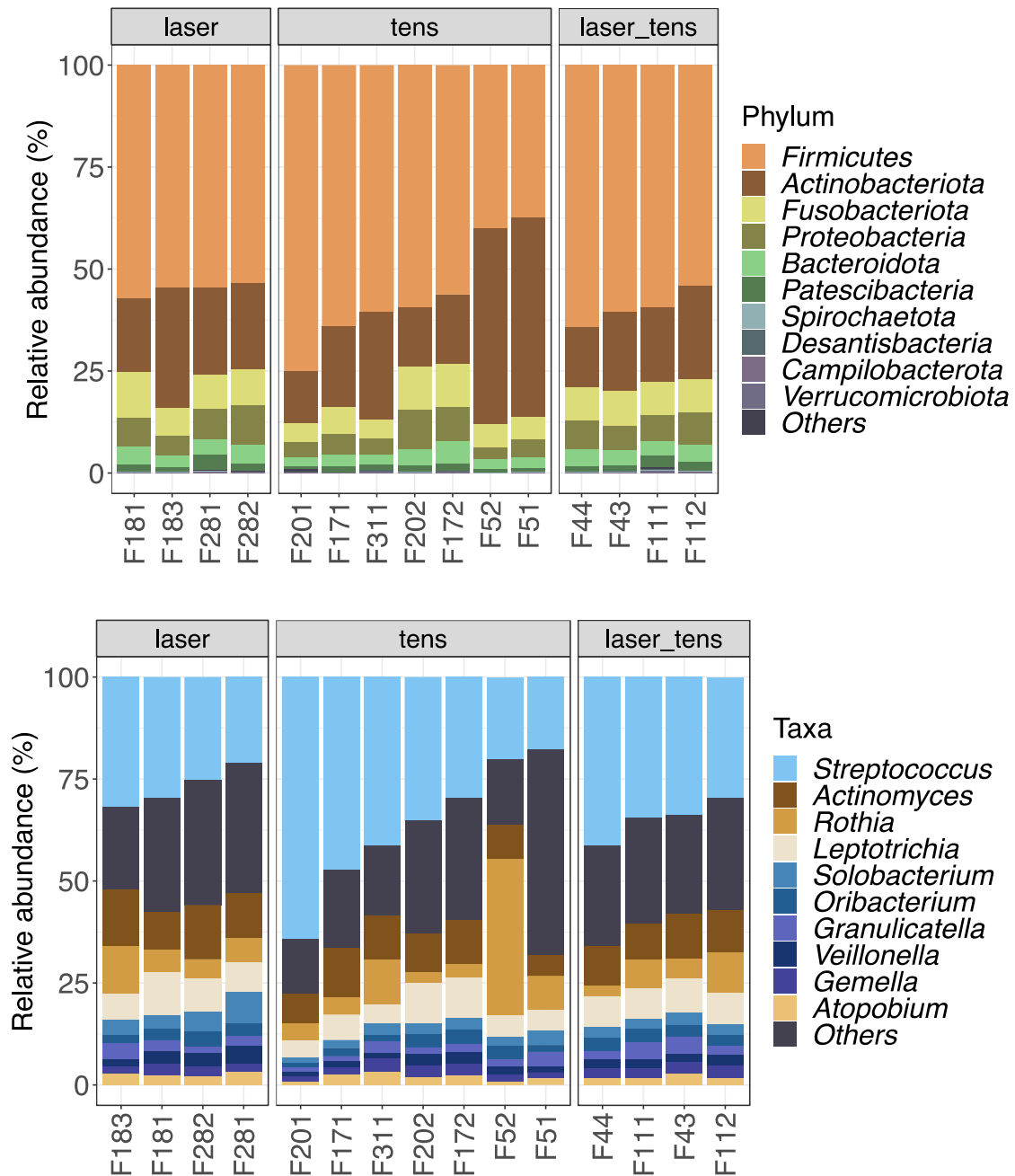


Figure 3. Most abundant phyla in the salivary microbiome after treatment with Laser (N=4), TENS (N=7) or combining Laser and TENS (n=4). Laser: P4, samples F282 and F281; P8, samples F181 and F183; TENS: P2, samples F51 and F52; P3, samples F201 and F202; P5, samples F171 and F172; P7, sample F311; P9, no microbiological samples; Laser + TENS: P1, samples F111 and F112; P6, samples F44 and F3.

Figure 3 represents the relative abundance of saliva microorganisms at the phyla and genera levels before and after the physical salivary stimulation. *Firmicutes* and *Actinobacteriota* were those with higher relative abundance observed in all

samples, despite of the type of treatment. Nevertheless, the relative abundance of *Firmicutes* in the laser group was quite similar between the individuals within this group compared to the samples of TENS group. *Actinobacteriota* was the second phylum most frequent in all samples, showing different percentages between the samples of TENS group. *Fusobacteriota* was also very abundant, irrespective of the group, except for laser+TENS group.

At the genus level, *Streptococcus* and *Actinomyces* were the most frequent ones in all groups. However, in the TENS group the relative abundance of these two genera profoundly varied within each sample. In some samples, the *Streptococcus* were more predominant whereas in other samples the *Actinomyces* were in higher percentage than *Streptococcus* (Figure 3).

Figure 4 demonstrate the most abundant phyla in the salivary microbiome after hyposalivation treatment, also considering the type of saliva and clinical results after treatment. Considering the relative abundance of phylum at the baseline compared to post-treatment, it was observed that the relative abundance of *Firmicutes* was increased after treatment. There was a reduction in the relative abundance of *Actinobacteriota* and *Proteobacteria* and an increased relative abundance of *Fusobacteriota*. After the saliva stimulation, the relative abundance of *Firmicutes* was higher and superior to 50% in all treatment's modalities. *Actinobacteria* was more abundant in the TENS group whereas the abundance of *Fusobacteriota* decreased. The relative abundance of *Bacteriodota* was reduced after treatment in all group

As expected, *Firmicutes* represented more than 50% in the relative abundance in both type of saliva, unstimulated and stimulated saliva, after the hyposalivation treatments. The relative abundance of *Fusobacteriota* and *Proteobacteria* were lower than 2.5% but higher in the unstimulated salivary flow compared to stimulated salivary flow in the post-treatment samples.

Salivary improvement was associated with higher abundance of *Actinobacteriota* than those cases in which the salivary flow did not change or decrease. Lower abundance of *Fusobacteriota* and *Actinobacteriota* were associated with reduced salivary flow. (Figure 4)

Considering the salivary microbiota alterations, the final samples had a higher number of taxa in high abundance, at the phylum and genera levels. *Proteobacteria*

were reduced, while *Fusobacteria* were slightly increased. Levels of *Streptococcus* were maintained, as well as *Veillonella* and *Actinomyces*. Interestingly, the levels of “others” (the low abundant taxa) were reduced after salivary stimulus (Figure 4).

The laser group seems to have a higher number of taxa comprising the majority microbiota (Figure 4) and confirmed by their significantly higher alpha-diversity. When the type of saliva was considered in the microbiological analysis, there were no significant changes in the majority microbiota between unstimulated or stimulated and also in the sialometry results observed after treatments (better, same, or worse clinical hyposalivation) (Figure 4).

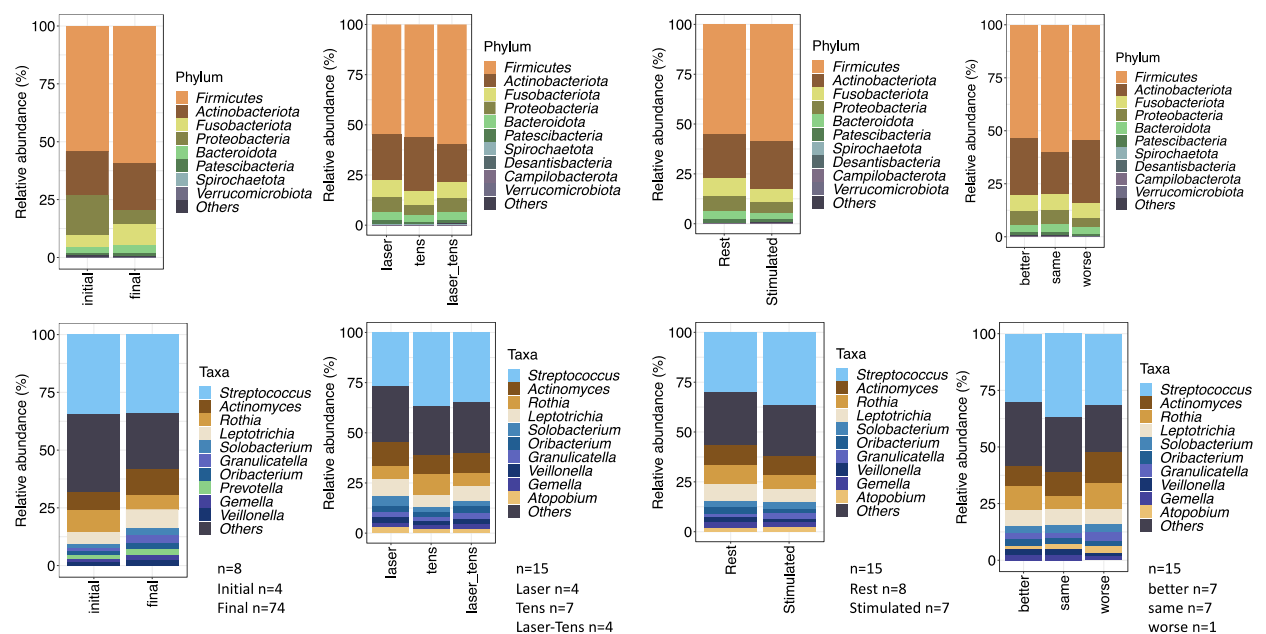


Figure 4. Most abundant phyla in the salivary microbiome after treatment with Laser (N=4), TENS (N=7) or combining Laser and TENS (n=4) and according to the type of saliva and clinical results after treatment.

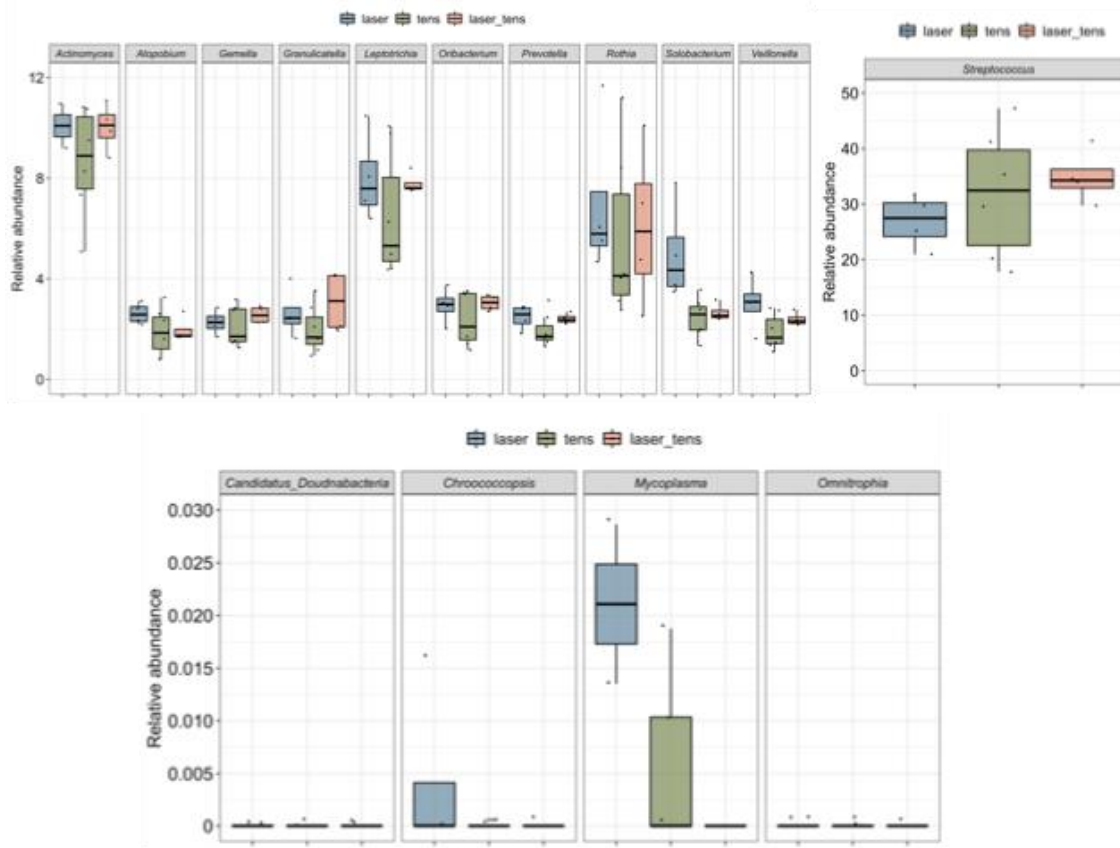


Figure 5. Most abundant taxa (A) and the differential abundant (B) regarding treatments.

Figure 5 shows the most abundant taxa (A) and the differential abundant (B) regarding treatments. Some taxa were differentially abundant between groups (DESeq analysis). The boxplot A (figure 5) demonstrates the mean relative abundance and the percentual of each bacterial species. The most abundant taxa (A) did not have statistically significance differences between the treatment groups. It is possible to note a significant difference between the treatment groups, in the boxplot B (figure 5), in which the differential abundant was highlighted. The levels of *Mycoplasma* and other 3 low abundant bacteria increased in the laser group compared to the TENS

### 3.5 Discussion

Saliva dysfunction observed in individuals with DM can lead to oral dysbiosis, increasing the number of carious lesions, the prevalence of root caries, as well as the risk of periodontal disease. Hyposalivation alters taste and digestive functions, halitosis (26) and predispose to opportunistic infections (13, 27). It is essential to improve the clinical diagnose of any salivary alteration and improve the evidence

regarding clinical management of hyposalivation on glands hypofunction. The aim of this study was to test strategies currently available for restoring the salivary gland function in individuals with DM, based on non-invasive and non-drug therapies. Physical salivary stimulation of residual salivary secretory capacity was chosen, and two therapies were evaluated: TENS, laser and a combination of both. The results confirmed a tendency towards an improvement in the dry mouth sensation, as well as a slight alteration of the salivary microbiota, particularly after laser stimuli. We believe that these results represent an unprecedented analysis that – if confirmed – could enhance the dental practice regarding oral health maintenance of DM individuals in the future.

Our clinical results are in line with other studies that evaluated salivary stimulation using laser or TENS, and that demonstrated a significant improvement in the perception of dry mouth and in the salivary flow (28, 29). Hyposalivation may or may not be correlated with the dry mouth sensation (also known as xerostomia), which is a recurrent complaint in individuals with DM (30, 31).

In the present study, all participants had dry mouth complaint, and all reported some improvement after saliva stimulation therapy without distinction of treatments in test (TENS, laser, or both). It is important to emphasize that a dry mouth complaint can be associated with a normal salivary flow. This was observed in the participant P1, who presented a severe complaint of xerostomia that improved to a slight feeling of dryness at night or upon waking after treatment. Furthermore, after laser therapy alone, participant P4 showed significant improvement in the salivary flow as well as xerostomia from an initial diagnosis of severe hyposalivation (0.12ml/min in stimulus) to normosialic (1.5ml/min) and complaint 4 to 2. This suggests that, even a little increase in the salivary flow, sometimes not detectable by sialometry, can influence xerostomia and reflect on the quality of life and well-being of individuals with DM, and should be better explored in further studies.

Hyposalivation in diabetics can be associated with multiple aspects including autonomic dysfunction, damage to the glandular parenchyma, alterations in the microcirculation of the salivary glands and neuropathy correlated with the regulation of salivary secretion (14). Additionally, the number of medications consumed by type 2 DM is also a possible cause for the reduction of salivary flow, as well as the

oscillation of the glycemic index (32, 33, 34, 35). For this reason, our attempt to establish groups with isolated therapies (laser or TENS) and a third associating both therapies, in order to gather together their different mechanisms of action to improve the stimulation saliva production by the major salivary glands and the minor glands. In three individuals (P1, P3 and P7), the saliva volume did not improve, but some increase in the salivary flow was observed in the others, although this evidence is based in a low sample size.

It is important to highlight that the capacity to improve the salivary flow was influenced by the mechanism of action of each physical method. Whereas TENS stimulation was design to act on the major salivary glands, laser therapy was applied to stimulate the major glands but also the minor salivary glands. The mechanism of action of TENS is associated with the release of an electric current, through the fixation of electrodes in the external region of the major salivary glands: parotid, sublingual and submandibular. It acts as a physiological stimulus mimic, which interacts with cell membranes, causing changes in signal transduction by activating calcium and cyclic AMP channels (36). In response, there is an increase in blood flow, oxygenation, ATP production and improved transport across the plasma membrane (37). TENS seems to act more efficiently as a salivary flow accelerator than as an initiator. Therefore, it is likely to be more effective in cases of decreased salivary gland function than in the absolute absence of function (38, 39). Ours results might suggest an accelerating effect of TENS on the saliva production as proposed by other. Of the nine randomized patients, six received stimulus only with TENS (P2, P3, P5 and P7) or combined with laser (P1 and P6). At baseline, all individuals presented a salivary flow greater than zero, except for P2. An improvement in stimulated salivary flow could be observed in all individuals after the treatments. The position of the electrodes can influence the excretion of saliva by the parotid glands, since the positive poles present a more intense pulse or energy, being considered “stronger”. Thus, a more significant improvement in the stimulated salivary flow could be expected in comparison to the unstimulated salivary flow.

On the other hand, the low-level laser acts on the excitation of electrons and on the formation of an electromechanical field within the mitochondria, which increases calcium levels and promotes an acceleration of cell proliferation, in addition to

inflammatory modulation. It is important to emphasize that inflammation is a common finding when there is a reduction in salivary gland activity, leading to hyposalivation (40, 41). It was shown that the use of laser alleviates the signs of hyposalivation and improves salivary flow and/or indicators of salivary function, such as the concentration of H<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, bicarbonate ions or proteins present in saliva (42), which could also contribute to the relief of xerostomia as observed in our results. Different laser's wavelengths were efficient in the management of hyposalivation, after ten consecutive days of treatment (43). In the present study, we performed ten sessions, twice a week, which we considered to be comfortable for the patient and with a lower risk of dropping out of treatment. Additionally, we also observed an improvement in the salivary flow and xerostomia.

Another factor that could limit the salivary flow improvement after physical stimulation would be the polypharmacy profile. Dabić et al (2016) (44) evaluated the effect of laser therapy for the treatment of drug-induced hyposalivation, with a significant increase of the salivary flow after 10 sessions with laser application. The participants in our study did not change their medication routine and the medicine intake did not seem to limit the effect of physical stimulation therapy.

A recent study by our research group demonstrated that the saliva of individuals with DM showed important alterations and increased salivary acidification (8). It is noteworthy that with the increase in salivary flow, an expected oral environment transition may occur with a significant impact on the composition of the microbiota. The salivary microbiome was shaped by systemic hyperglycemia, as well as changes in salivary pH, which may be linked to local hyperglycemia (21). It was observed a clear enrichment of a sulphate-reducing bacteria, as well as a depletion of the healthy associated butyrate-producing bacteria in individuals with DM, that may be influenced by a pro-inflammatory effect. This observed imbalance in microbial composition could be a result of gut dysbiosis and potentially impair insulin resistance. They also showed higher proportions of *Proteobacteria* when the salivary pH was acidic, after salivary stimulation. This may suggest that the salivary stimulation may "clean" the salivary glucose and help the pH control, even in a slightly increase of the salivary flow.

Another "washing effect" observed in our results may be related to microorganisms in low abundance. These organisms can be part of a transitory

microbiota, which in a favorable situation could become pathobionts leading to oral dysbiosis. In diabetic patients, the reduced salivary flow combined with the increased inflammatory processes can also alter the oral habitat leading to oral dysbiosis. In our results *Bacteriodota* were reduced after all treatments, as well as the low abundance microbiota. Therefore, this might be a proof of a greater physiological cleanliness of the oral cavity and a smaller bacterial volume in a healthy salivary flow. Individuals treated with laser exclusively showed a significant increase in microbial diversity compared to the other treatments. This result was relevant, since diabetic individuals have reduced microbial diversity (45).

As the action of the laser occurs at the cellular level – as discussed before, the increased oxygenation can change the oral environment and consequently the microbial diversity. This is fundamental to maintain oral health and oral balance. Another finding was the significant increase in the *Mycoplasma* in individuals after treatment with laser when compared with the ones treated with TENS. The ability of *Mycoplasmas* to agglutinate blood cells has been used for seroidentification of certain pathogenic species. The agglutination of erythrocytes in the area of the periodontal pocket and within the gingival sulcus has been consistently observed (46). Blood cells act as light collectors and may be a justification for the better laser performance due to greater activation by photomodulation. The association of mycoplasmas with gingivitis has been observed, and some potential to damage host tissues has been credited to them (46). The research participants, in addition to DM, also had periodontal disease, which may have influenced this finding (17). We raised the hypothesis that this response variation may not be related to the type of treatment used to manage hyposalivation, but to the periodontal condition of each patient. Although all had received prior periodontal treatment, the initial periodontal condition may have varied in terms of degree, stage and extent of periodontal disease.

The relationship between salivary microbiota and biofilms are complex (1, 2). Plaque and saliva can act as a source of microorganisms for each other. Thus, high levels in saliva may be a consequence of high levels of plaque or vice versa (47). This reasoning also covers the lingual coating. In our results, participants who showed an increase in coating after treatment coincide with an increase in flow in individuals P4 and P5.



In participants P7 and P8 who did not obtain improvement in the flow volume, they also did not present alteration in the visual analysis of tongue coating. However, P1, P2 and P3, even with the increase in salivary flow, had a reduced tongue coating index. A greater washing effect of saliva on the tongue dorsum may have occurred in these patients. It is important to point out that none of the participants were instructed to clean the tongue or questioned about the quality of the diet consumed in the meal prior to the tongue evaluation session. In microbiological analysis, a reduction of *Rothia* was observed when the salivary flow was increased after stimulation. This was a surprising result, as we expected an increase in the *Rothia*, a great component of the tongue biofilm (48). Also, lower levels of *Rothia* was found in saliva and on the tongue dorsum upon awakening than before going to sleep, which was linked to a reduction in the salivary flow during sleep (49).

It is worth noting the P2 samples (F51 post-treatment non-stimulated saliva and F52 post-treatment stimulated saliva). P2 was the only individual initially asialic in both saliva analyzes, who concluded the treatment since P9, who was allocated in the same TENS group and had the same initial diagnosis, did not complete the therapy. Such an observation raises the hypothesis of an important microbiological change, as described above and clinically with the change from zero to 0.8 ml/min in stimulus and 0.0006 ml/min in non-stimulation.

It is believed that qualitative and quantitative reductions, as well as deviations in metabolic, immunological, endocrine, and neuronal activity would be capable of causing deleterious effects in the oral cavity of individuals with DM, observed by the clinical symptom of oral dryness and by the clinical sign of hyposalivation observed after analysis of unstimulated and stimulated salivary flow.

Obviously, our results were hampered by the small sample size and therefore the clinical results were merely descriptive, in which each treatment could not be accurately compared. The waiting time between the basic periodontal treatment and the beginning of the stimulation treatment, since the complaint of dry mouth was the main motivator in the search for care, the difficulty of locomotion of the participants to attend twice a week at the educational institution to receiving therapy may also have influenced the still timid result.

The absence of a control group with patients without DM, however with a diagnosis of hyposalivation, would also enrich the evaluation of physical therapy for salivary stimulation and increase the methodological quality of the work. Even with such limitations, the clinical and microbiological results are promising. Although it was not possible to compare the different salivary stimulation protocols by physical means, an improvement in the sensation of dry mouth and a trend towards an increase in salivary flow was observed in all groups. A more delineated protocol and closer clinical follow-up may present an even more significant clinical response in relation to the increase in volume itself in quantitative analysis.

In conclusion, the management of hyposalivation associated with DM through physical methods (laser, TENS and the combination of both) seems to somehow modify the salivary flow, the xerostomia, and the salivary microbiome. Laser increased the salivary microbiome diversity when compared to TENS. However, preliminary results are not yet conclusive, and the need for increasing the sample size is clear, particularly to compare treatments according to the salivary flow increasing.

#### Acknowledgment

The authors are grateful to the Scientific Initiation Program from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). Sabin laboratories are acknowledged for the collaboration. This project was funded by the Foundation for Research Support of the Federal District (FAP-DF) [process no. 16991.78.45532.26042017].

#### 3.6 References

1. Gomar-Vercher S, Simón-Soro A, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM, Mira A. Stimulated and unstimulated saliva samples have significantly different bacterial profiles. *PLoS One*. 2018;13(6):e0198021.
2. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. 2009;9:259.

3. Vieira Lima C, Chagas L, Marques R, Salles L, Guimarães M, Grisi D, et al. Can hyperglycemia be associated with caries activity and root caries in adults? *Primary Care Diabetes*. 2022
4. Carramolino-Cuéllar E, Lauritano D, Silvestre FJ, Carinci F, Lucchese A, Silvestre-Rangil J. Salivary flow and xerostomia in patients with type 2 diabetes. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2018;47(5):526-30.
5. Memon MA, Memon HA, Muhammad FE, Fahad S, Siddiqui A, Lee KY, et al. Aetiology and associations of halitosis: A systematic review. *Oral Diseases*. 2022(January):1-7.
6. Jo JK, Seo SH, Park SE, Kim HW, Kim EJ, Na CS, et al. Identification of salivary microorganisms and metabolites associated with halitosis. *Metabolites*. 2021;11(6).
7. Saleh J, Figueiredo MAZ, Cherubini K, Salum FG. Salivary hypofunction: An update on aetiology, diagnosis and therapeutics. *Archives of Oral Biology*. 2014;(60) 242-55
8. Marques RCR, Silva JRd, Vieira Lima CP, Stefani CM, Damé-Teixeira N. Salivary parameters of adults with Diabetes Mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2022.
9. Mozaffari HR, Sharifi R, Vaisi-Raygani A, Sadeghi M, Nikray S, Naseri R. Salivary profile in adult type 2 diabetes mellitus patients: A case-control study. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 2019;69(2):190-4.
10. Rahiotis C, Petraki V, Mitrou P. Changes in saliva characteristics and carious status related to metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of*

Dentistry. 2021;108(February):103629-.11. Chávez EM, Borrell LN, Taylor GW, Ship JA. A longitudinal analysis of salivary flow in control subjects and older adults with type 2 diabetes. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2001;91(2):166-73.

12. Grisi Dc VIVdALAKdOMMCD-TNSLPdOLAS. The Complex Interrelationship between Diabetes Mellitus Oral Diseases and General Health. *Curr Diabetes Rev*. 2022;18.

13. Vieira Lima CP, Grisi DC, Guimarães MDCM, Salles LP, Kruly PdC, Do T, et al. Enrichment of sulphate-reducers and depletion of butyrate-producers may be hyperglycaemia signatures in the diabetic oral microbiome. *Journal of Oral Microbiology*. 2022;14(1).

14. Sreebny LM, Yu A, Green A, Valdini A. Xerostomia in diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1992;15(7):900-11.

15. Wolff A, Joshi RK, Ekström J, Aframian D, Pedersen AML, Proctor G, et al. A Guide to Medications Inducing Salivary Gland Dysfunction, Xerostomia, and Subjective Sialorrhea: A Systematic Review Sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Drugs in R and D*2017.

16. Napeñas JJ, Brennan MT, Fox PC. Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). *Odontology*. 2009;97(2):76-83.

17. Baeza M, Morales A, Cisterna C, Cavalla F, Jara G, Isamitt Y, et al. Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Oral Science*. 2020;28:1-13.

18. Wang S, Zhao Z, Li J. Investigation of the clinical value of total salival flow rates. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology*. 1998;33(6):360-2.
19. Shimizu T, Ueda T, Sakurai K. New method for evaluation of tongue-coating status. *J Oral Rehabil*. 2007;34(6):442-7.
20. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-3.
21. Vieira Lima CP, Grisi DC, Guimarães MDCM, Salles LP, Kruly PC, Do T, et al. Enrichment of sulphate-reducers and depletion of butyrate-producers may be hyperglycaemia signatures in the diabetic oral microbiome. *J Oral Microbiol*. 2022;14(1):2082727.
22. Oksanen J, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R. *vegan: Community Ecology Package*. 2012
23. Lahti L, Shetty S. Tools for microbiome analysis in R. 2017;9(3) 37.
24. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*. 2013;8(4):e61217.
25. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
26. Malicka B, Kaczmare U, SkośKiewicz-Malinowska K. Selected antibacterial factors in the saliva of diabetic patients. *Arch Oral Bio*. 2015;60(3):425-31.

27. Artico G, Freitas RS, Santos Filho AM, Benard G, Romiti R, Migliari DA. Prevalence of *Candida* spp., xerostomia, and hyposalivation in oral lichen planus - A controlled study. *Oral Diseases*. 2014;20(3):36-41.
28. Stewart CM. Comparison between saliva stimulants and a saliva substitute in patients with xerostomia and hyposalivation. *Special Care in Dentistry*. 1998;18(4):142-7.
29. Sivaramakrishnan G, Sridharan K. Electrical nerve stimulation for xerostomia: A meta-analysis of randomised controlled trials. *J Tradit Complement Med*. 2017;7(4):409-13.
30. Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquitam.F. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem*. 2004;0042;261(1):137-42.
31. Fox PC. Salivary enhancement therapies. *Caries Res*. 2004;38(3):241-6.
32. Han P, Suarez-Durall P, Mulligan R. Dry mouth: A critical topic for older adult patients. *Journal of Prosthodontic Research* 2015.(59):6-19.
33. Meurman JH, Collin H-L, Niskanen L, Töyry J, Alakuijala P, Keinänen S, et al. Saliva in non-insulin-dependent diabetic patients and control subjects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1998;86(1):69-76.
34. Lone MA, Shaikh S, Lone MM, Afaq A, Lone MA. Association of salivary gland hypofunction with diabetes mellitus and drugs among the elderly in Karachi, Pakistan. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*. 2017;8(2):e12209.

35. de Lima AKA, Amorim dos Santos J, Stefani CM, Almeida de Lima Ad, Damé-Teixeira N. Diabetes mellitus and poor glycemic control increase the occurrence of coronal and root caries: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*. 2020;24(11):3801-12.
36. Johnson MI, Ashton CH, Thompson JW. An in-depth study of long-term users of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). Implications for clinical use of TENS. *Pain*. 1991;44(3):221-9.
37. Weiss WW, Jr., Brenman HS, Katz P, Bennett JA. Use of an electronic stimulator for the treatment of dry mouth. *J Oral Maxillofac Surg*. 1986;44(11):845-50.
38. Hargitai IA, Sherman RG, Strother JM. The effects of electrostimulation on parotid saliva flow: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(3):316-20.
39. Dyasnoor S, Kamath S, Khader NFA. Effectiveness of Electrostimulation on Whole Salivary Flow Among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Perm J*. 2017;(21):15-164.
40. Simões A, Nicolau J, de Souza DN, Ferreira LS, de Paula Eduardo C, Apel C, et al. Effect of defocused infrared diode laser on salivary flow rate and some salivary parameters of rats. *Clin Oral Investig*. 2008;12(1):25-30.41. Vieira CN. Importancia da sialometria, halitometria e da presença de saburra como meios de diagnóstico da halitos e da doença periodontal. *Unb*. 2007;6(2):103p

42. Park K, Hurley PT, Roussa E, Cooper GJ, Smith CP, Thévenod F, et al. Expression of a sodium bicarbonate cotransporter in human parotid salivary glands. *Archives of Oral Biology*. 2002;47(1):1-9.
43. Brzak BL, Cigić L, Baričević M, Sabol I, Mravak-Stipetić M, Risović D. Different Protocols of Photobiomodulation Therapy of Hyposalivation. *Photomed Laser Surg*. 2018;36(2):78-82.
44. Dabić DT, Jurišić S, Boras VV, Gabrić D, Bago I, Vrdoljak DV. The effectiveness of low-level laser therapy in patients with drug-induced hyposalivation: A pilot study. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2016;34(9):389-93.
45. Sabharwal A, Ganley K, Miecznikowski JC, Haase EM, Barnes V, Scannapieco FA. The salivary microbiome of diabetic and non-diabetic adults with periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2019;90(1):26-34.
46. Holt RD, Wilson M, Musa S. Mycoplasmas in Plaque and Saliva of Children and Their Relationship to Gingivitis. *Journal of Periodontology*. 1995;66(2):97-101.
47. Ruth D. Holt, Michael Wilson, and Sabri Musa. Mycoplasmas in Plaque and Saliva of Children and Their Relationship to Gingivitis *Journal of Periodontology*. 1995;66(2):97-101.
48. Spatial Ecology of the Human Tongue Dorsum Microbiome. *Cell Rep*. 2020;30(12):4003-15.e3.
49. Sotozono M, Kuriki N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, et al. Impacts of sleep on the characteristics of dental biofilm. *Sci Rep*. 2021;11(1):138-157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259850> Editor:



## **Capítulo 4 - Discussão Geral e conclusões**

### 4.1 Discussão Geral

Os estudos que compõem a presente dissertação objetivaram avaliar a eficácia da estimulação física das glândulas salivares no aumento do fluxo salivar, na xerostomia e na alteração do microbioma salivar. A hipótese é que tais tratamentos são alternativa terapêutica para o manejo das disfunções salivares causadas pelo DM e suas consequências. Inicialmente, destacamos dois pontos principais em nossos resultados. O primeiro a queixa regular da boca seca e sua correlação com a qualidade de vida dos indivíduos participantes. Tanto no estudo apresentado no capítulo 2, quanto no estudo apresentado no capítulo 3 esse questionamento foi aplicado e avaliado nos distintos protocolos terapêuticos, sendo o principal desfecho que sofreu alteração após os tratamentos em teste. Quando apenas em estímulo com o TENS, uma vez por semana em 10 sessões, os participantes obtiveram resultado positivo na avaliação qualitativa da sensação de boca seca (xerostomia)(Capítulo 2). Em protocolo semelhante, conduzido duas vezes por semana, nas mesmas 10 sessões, os participantes alocados ao grupo tratado com TENS (capítulo 3), também relataram melhora da queixa. Tal percepção foi acompanhada pelo demais grupos de tratamento que receberam estímulo combinado com laser de baixa intensidade e estímulo apenas com o laser.

Interessantemente, o volume salivar não foi aumentado de forma estatisticamente significativa em nenhum dos tratamentos aqui testados. Todavia, correlacionamos a percepção de melhora da queixa de boca seca, acima relatada, com o mínimo de acréscimo salivar após terapia de estimulação com o aumento da presença de mucinas salivares, responsáveis por formar uma camada protetora na mucosa e auxiliar no conforto bucal, como relatado por Fox, 1987 e Pramanik, 2010 (3,4). Essa hipótese de correlacionar o conforto relatado pelos participantes com a maior produção de proteína salivar está embasada, de certa forma, nos resultados do grupo que recebeu estimulação salivar exclusivamente com laser de baixa potência

(capítulo 3). Em nossa análise, o uso do laser parece fornecer melhores condições biológicas para o estímulo da produção salivar, isso porque as glândulas salivares menores possuem secreção exclusivamente proteica e um posicionamento anatômico subepitelial vantajoso para a absorção da luz laser(5). A atuação do laser a nível celular atua no processo de oxigenação e desinflação do parênquima da glândula, melhorando seu funcionamento(6). Isso foi observado nos desfechos microbiológicos, onde uma modulação microbiana foi identificada com uso do laser. Identificamos redução de microrganismos em baixa abundância, aumento de Firmicutes, Actinobacteria e Fusobacteriota e redução de Actinobacteriota e Proteobacteria nesse grupo quando comparados aos grupos tratados com TENS. Dentre os microrganismos em baixa abundância (correspondendo a barra “*others*” nos gráficos), podemos ter a presença de potenciais patógenos transitórios, que podem se beneficiar dos sítios bucais e alterar o microbioma para disbiose.

É provável que o fluxo salivar, mesmo com um discreto aumento, possa exercer um papel antimicrobiano. As concentrações salivares de fatores antimicrobianos variam entre os indivíduos, mas também podem ser bastante diferentes a depender de quando/onde eles entram em contato com micro-organismos, muitas dessas moléculas aderem à superfície dentária e mucosas, se agregam com mucinas podem ser reunidas em saliva. Esses componentes interagem sinergicamente uns aos outros para exercer efeitos que podem ser diretamente antimicrobianos ou interferir na colonização microbiana ou nutrição (7). Isso também pode estar relacionado com a mudança no conteúdo da microbiota minoritária.

Um maior aumento da diversidade microbiana no grupo laser pode estar correlacionada ao seu mecanismo de ação, devido sua capacidade de biomodulação e alteração do ambiente celular. Melhores resultados clínicos e microbiológicos com a associação de laser e TENS eram esperados, justamente pela possibilidade de somar os distintos mecanismos de funcionamento. A nível celular, como comentado anteriormente com o laser atuando diretamente em glândulas salivares menores e indiretamente em glândulas maiores e por meio da condução nervosa com o TENS atuando em estímulos neurais com maior propriedade em glândulas salivares maiores. Todavia, não alcançamos o esperado.

Limitações sabidamente conhecidas como o perfil polifarmácia, desidratação e controle glicêmico duvidoso não pareceram ser impedidores pétreos para o alcance de melhores fluxos salivares. Essa observação é importante já que os participantes das pesquisas não sofreram alteração na rotina medicamentosa e mesmos assim obtiveram alguma melhora. Tais observações são indícios que o restabelecimento das condições salivares pode ser fundamental para reequilíbrio da microflora bacteriana em indivíduos com DM.

Apesar de nossos resultados serem promissores para a melhoria da xerostomia (tanto para TENS quando para laser) e para a modulação positiva do microbioma com uso do laser, é necessário que novos ensaios clínicos randomizados e com bons controles sejam realizados para qualquer indicação clínica.

#### 4.2 Conclusões

Os trabalhos levantam hipóteses ainda inconclusivas, como a modulação da microbiota, sua capacidade de aumento de diversidade e manutenção da homeostase bucal e conforto clínico. Todavia, apontam para uma terapia de fácil execução clínica, boa aceitação por parte do paciente e com resultados interessantes que merecem atenção e novos estudos bem delineados. Torna-se motivador a busca por um protocolo de tratamento que supra todas as lacunas observadas, dessa forma novos estudos são imprescindíveis para a execução de uma Odontologia clínica baseada em evidências científicas.

## Referencias

1. Mauri-obradores E, Estrugo-devesa A, Jané-salas E, Viñas M, López-lópez J. Oral manifestations of Diabetes Mellitus . A systematic review. 2017;22(5):586-94.
  2. Albert DA, Ward A, Allweiss P, Graves DT, Knowler WC, Kunzel C, et al. Diabetes and oral disease : implications for health professionals. 2012;1255:1–15.
  3. Fox PC, Busch KA, Baum BJ. Subjective reports of xerostomia and objective measures of salivary gland performance. J Am Dent Assoc. 1987;115(4):581–4.
  4. Pramanik R, Osailan SM, Challacombe SJ, Urquhart D, Proctor GB. Protein and mucin retention on oral mucosal surfaces in dry mouth patients. Eur J Oral Sci. 2010;118(3):245–53.
  5. Sousa AS, Silva JF, Pavesi VCS, Carvalho NA, Ribeiro-Júnior O, Varellis MLZ, et al. Photobiomodulation and salivary glands: a systematic review. Lasers Med Sci. 2020;35(4):777–88.
  6. Golež A, Frangež I, Cankar K, Frangež HB, Ovsenik M, Nemeth L. Effects of low-level light therapy on xerostomia related to hyposalivation: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. Lasers Med Sci [Internet]. 2022;37(2):745–58. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03392-0>
  7. Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. Periodontol 2000. 2016 Feb;70(1):80-92. doi: 10.1111/prd.12098. PMID: 26662484.
-

## APÊNDECES

**Apêndice 1-** Relatório final de projeto de iniciação científica – Aluna: Camila Pinho e Souza Coelho

**Meios físicos de estimulação salivar em pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço: uma revisão de escopo.**

Camila Pinho e Souza Coelho

Jéssica Luiza Mendonça Albuquerque de Melo

Fernanda de Paula e Silva Nunes

Maria do Carmo Machado Guimarães

Daniela Corrêa Grisi

Nailê Dame-Teixeira

Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, Brasil

\*Autor correspondente:

Maria do Carmo Machado Guimarães

Departamento de Odontologia

Faculdade de Ciências da Saúde

Campus Universitário Darcy Ribeiro – Universidade de Brasília

Asa Norte - Brasília – DF - Brasil

CEP: 70910-900

Email: [mcarmo@unb.br](mailto:mcarmo@unb.br)

**Palavras-chave:** Hipossalivação. Radiação. TENS. Laser de baixa potência. Acupuntura. Goma de Mascar. Estimulação Salivar.

## RESUMO

**OBJETIVO:** A hipossalivação está entre os efeitos adversos do tratamento radioterápico em nível de cabeça e pescoço mais relevantes para a saúde bucal. Ainda não existe evidência acerca da eficácia de métodos físicos no manejo dessa hipossalivação. Essa revisão de escopo objetivou mapear a literatura científica sobre os protocolos dos métodos físicos atualmente disponíveis e seus efeitos para a estimulação salivar de pacientes com hipossalivação provocada por radioterapia.

**METODOLOGIA:** O protocolo foi baseado no PRISMA - extensão para revisões de escopo. A busca sistemática foi feita em seis bases de dados eletrônicas e na literatura cinzenta. Os estudos foram incluídos quando a população-alvo consistia em seres humanos adultos de qualquer idade, que passaram ou iriam passar por tratamento envolvendo irradiação da região de cabeça e pescoço, e apresentaram quadro de hipossalivação ou potencial risco para hipossalivação. Dois revisores independentes extraíram dados sobre o tipo de terapia física utilizada (laser de baixa potência, TENS-*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation* e acupuntura), o grau de comprometimento do tecido glandular, e o percentual de alteração do fluxo salivar.

**RESULTADOS:** Foram incluídos dezessete artigos, dos quais 4 utilizaram TENS, todos apresentando aumento do fluxo salivar após o tratamento. N=3 artigos utilizaram laser de baixa potência. Dos estudos envolvendo acupuntura, 8 foram incluídos. Os desfechos dos estudos profiláticos mostraram efeito benéfico após tratamento, apesar da maioria não apresentar grupo controle passível de comparação. Dos desfechos dos estudos terapêuticos, 3 mostraram resultados positivos e 3 não mostraram diferença estatisticamente significativa, apesar de alguns pacientes apresentarem aumento no fluxo salivar. N=2 dos artigos incluídos utilizaram ALTENS (*Acupuncture-like TENS*), ambos após a radioterapia, 1 com resultado satisfatório e 1 que não mostrou diferença. **CONCLUSÃO:** Pode-se concluir que a utilização dos métodos físicos de estimulação salivar de forma profilática sugere efeitos mais efetivos em relação àqueles que utilizam durante o tratamento radioterápico, talvez por conta da presença do parênquima glandular intacto antes de receber a radiação. Entretanto, a escassez e baixa qualidade dos estudos (principalmente quanto aos grupos controle), além da ausência de protocolos definidos, inviabilizam uma avaliação concreta, sendo necessária a realização de mais ensaios clínicos com grupo controle sem tratamento ou com tratamento padrão-ouro para comprovar a eficácia dos tratamentos analisados.

## INTRODUÇÃO

Apesar das evidências indicarem maior índice de cura para o câncer de cabeça e pescoço pelo tratamento radioterápico adjuvante ou pós-operatório (1), sabe-se que este tratamento apresenta efeitos adversos nocivos à qualidade de vida do paciente (2,3). A dose de irradiação, assim como a região tecidual irradiada influenciam no grau de comprometimento das estruturas, de modo que alterações nas glândulas salivares podem ser observadas com apenas uma semana de tratamento, podendo persistir por meses após finalizar a exposição (3,4). Entretanto, parece que ainda não existe consenso quanto a todos os fatores envolvidos na sensibilidade das células das glândulas salivares à radiação e consequente piora na secreção salivar (5,6). Uma das hipóteses seria a ação da radiação ionizante na interrupção da transdução dos sinais nas membranas dos ácinos, provocando modificações a nível macro e microscópico (7). Em estudos realizados em animais, podem ser observados fenômenos como o aumento no número de células apoptóticas (8), redução na expressão de aquaporinas (9) e hipovascularização (10). Além disso, podem ser encontrados formação de tecido fibroso, vacuolização citoplasmática e edema (11), até uma redução de 30% do volume glandular original (12).

Nesse sentido, a hipossalivação torna-se um sinal clínico importante associado aos tratamentos com radiação. Consiste na diminuição do fluxo salivar a índices inferiores a 0,7mL/min da saliva estimulada e inferiores a 0,1mL/min da saliva não estimulada (13,14). Acompanhada ou não por xerostomia, que por sua vez refere-se à sensação subjetiva de boca seca, a hipossalivação é um dos efeitos indesejados mais comuns da radioterapia de cabeça e pescoço (15–17). Sendo assim, dada a importância da saliva na cavidade bucal, como a proteção dos tecidos moles e duros a partir da lubrificação e remineralização do esmalte, auxílio na fala, deglutição e digestão, a diminuição do fluxo salivar pode resultar em outras patologias como doença cárie, periodontite, problemas na fala, deglutição e digestão (14).

Atualmente, existe uma variedade de tratamentos e cuidados paliativos para diminuir os efeitos da hipossalivação e xerostomia. Dos cuidados paliativos, o mais usufruído é a saliva artificial, a qual também é utilizada em pessoas sem remanescente glandular funcional (18). Entre as terapias que promovem a estimulação salivar, existem evidências que comprovam a eficácia de tratamentos químicos de uso sistêmico, como a pilocarpina, betanecol e cevimeline (18–20). Contudo, o tratamento químico possui alto risco de efeitos adversos e interações medicamentosas, por serem substâncias ingeridas com possíveis efeitos em outros órgãos além do esperado (19).

Para evitar esses efeitos adversos, a estimulação salivar poderia ser feita por meio de métodos físicos e mecânicos não invasivos. Algumas opções de terapias, já descritas na literatura, incluem o laser de baixa potência, o TENS (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*) e a acupuntura, além da indicação de goma de mascar (18,21–23). O laser de baixa potência é utilizado para a fotobiomodulação, de forma que os fótons são absorvidos por citocromos e porfirinas das mitocôndrias celulares. Isso resulta em uma liberação temporária de óxido nítrico pela enzima citocromo C

oxidase, permitindo que novas ligações sejam feitas e ocorra um aumento na transcrição e respiração celular, responsáveis pela formação de novos ductos glandulares (6). Já o TENS consiste na aplicação de uma corrente elétrica na superfície da pele da região dos terceiros molares inferiores por meio de um eletrodo promovendo estímulo direto do nervo auriculotemporal, o qual é responsável por desencadear o reflexo da salivação no bulbo raquidiano (20,22). A acupuntura é uma terapia presente na medicina chinesa e constitui-se da inserção de pequenas agulhas em pontos específicos, com o objetivo de aumentar a secreção salivar a partir do aumento da atividade parassimpática e liberação de neuropeptídeos com uma série de efeitos trópicos, incluindo aumento do fluxo sanguíneo das glândulas salivares (24,25). As gomas de mascar têm como princípio promover o estímulo mecânico e gustativo para aliviar os sintomas da xerostomia (26).

Há diversas revisões na literatura que buscam encontrar o melhor tratamento para hipossalivação em pacientes irradiados (6,19,27–32). Entretanto, tratam-se de estudos que testam apenas uma das terapias físicas disponíveis (6,27–32), restritos a ensaios clínicos randomizados (19,27,28,32), que não abordam o efeito profilático (19,27,29,31,32) ou são consistentes quanto ao efeito em diversos sintomas, mas pecam no que diz respeito ao desfecho no fluxo salivar (30). Nesse sentido, ainda se torna necessário uma revisão de escopo que avalie também outros designs de estudo, como ensaios clínicos de braço único, e que divida os estudos de acordo com o momento da aplicação dos métodos físicos de estimulação salivar em profiláticos (antes/durante a radioterapia) ou terapêuticos (após a radioterapia), a fim de que seja possível reunir todos os protocolos utilizados.

Essa revisão de escopo objetiva mapear a literatura científica acerca dos protocolos dos métodos físicos atualmente disponíveis e seus efeitos para a estimulação salivar de pacientes com hipossalivação provocada por radioterapia. Assim, torna-se possível responder à pergunta de pesquisa: pacientes que passaram por tratamento com radiação em cabeça e pescoço submetidos à estimulação do fluxo salivar por meios físicos têm potencial aumento do fluxo salivar?

## **METODOLOGIA**

Design de estudo:

Uma revisão de escopo foi conduzida utilizando o PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), extensão para lista de verificação de revisões de escopo (Tricco et al. 2018).

Estratégia de busca:

Uma busca sistemática foi realizada nas bases de dados eletrônicas (MEDLINE/PubMed, Cochrane Library, Scopus, Livivo, Web of Science e Embase) e na literatura cinzenta (Google Acadêmico e Proquest), a qual foi utilizada em duas revisões de escopo. O vocabulário controlado geral (termos MeSH) e as palavras-



chave foram escolhidas (Apêndice 1). Foram selecionados estudos de ensaio clínico, randomizados ou não, e relatos de caso (Apêndice 2). Não houve limitação de idioma ou ano.

#### Critérios de elegibilidade:

Os estudos foram incluídos quando a população-alvo consistia de seres humanos adultos de qualquer idade, os quais foram submetidos ou iniciariam tratamento envolvendo irradiação da região de cabeça e pescoço. Os estudos foram excluídos quando 1) os resultados clínicos não informaram o percentual de alteração do fluxo salivar, 2) não eram pesquisas originais, 3) eram resumos de conferência, 4) avaliaram apenas o efeito mecânico (gomas de mascar, por exemplo), 5) apresentavam viés de confundimento (presença de edêntulos portadores de prótese, uso de substitutos salivares e sialogogos), 6) não apresentavam a etiologia da hipossalivação, 7) não separavam os resultados de acordo com diferentes grupos, ou 8) não estavam escritos no alfabeto latino, passível de tradução usando ferramentas online do tipo Google Translator.

#### Seleção dos manuscritos:

Dois revisores analisaram, de forma independente, a elegibilidade de todos os títulos e resumos identificados para a inclusão na seleção de texto completo. Após essa etapa, ambos utilizaram os mesmos critérios de elegibilidade para análise dos textos completos dos títulos incluídos. Os conflitos foram resolvidos por um consenso com o terceiro revisor (F.P.S.N.). As listas de referência dos artigos selecionados foram analisadas manualmente para identificar manuscritos possivelmente perdidos durante as buscas nas bases de dados eletrônicas e outras literaturas cinzentas.

#### Extração e síntese dos dados:

Dois revisores independentes (C.P.S.C. e J.L.M.A.M.) extraíram os dados em 2 etapas. Inicialmente, as informações foram obtidas considerando o tipo de terapia física utilizada (laser de baixa potência, TENS e acupuntura), o grau de comprometimento do tecido glandular e o percentual de alteração do fluxo salivar, além de observar o ano de publicação, o país onde o estudo foi conduzido e os métodos utilizados para avaliação clínica. Posteriormente, um revisor (C.P.S.C.) reanalisou cada estudo selecionado e avaliou criticamente as principais informações obtidas.

## RESULTADOS

Dos 2.439 títulos encontrados na busca nas bases de dados e literatura cinzenta, 148 estudos foram incluídos na primeira fase para leitura do texto completo. Desses, 10 não estavam disponíveis na íntegra e 14 eram protocolos de estudos sem resultados. Dos 124 restantes, 21 foram excluídos por não utilizarem métodos físicos para estimulação salivar, 17 por não serem pesquisas originais, 12 por não informarem o percentual de alteração do fluxo salivar, 11 por não separarem os resultados de acordo com os diferentes grupos, 8 por conterem participantes portadores de prótese, 9 por apresentarem uso de substitutos salivares simultaneamente ao método físico para estimulação salivar, 5 por não definirem a etiologia da hipossalivação e 1 por conter paciente pediátrico. Sendo assim, 17 estudos foram incluídos na versão final dessa revisão, realizados entre os anos de 1996 e 2020, sendo 4 do Brasil (25,33–35), 3 da Índia (22,36,37), 2 da China (38,39), 2 do Reino Unido (40,41) 2 do Canadá (24,42), 1 da Suécia (43), 1 dos Estados Unidos (44), 1 da Coreia do Sul (45) e 1 da Rússia (46) (Figura 2). A figura 1 mostra o fluxograma que representa as fases da seleção dos manuscritos com base no PRISMA 2020 *flow diagram for new systematic reviews which included searches of databases and registers only*. N = 10 eram ensaios clínicos randomizados (ECR), 3 eram séries de casos ou casos clínicos, 2 eram ensaios clínicos quasi-randomizados e 2 eram ensaios clínicos de braço único (Apêndice 2). Um número total de 547 indivíduos passou por intervenções com métodos físicos para estimulação salivar e foram avaliados quanto ao efeito no fluxo salivar de forma profilática ou terapêutica (Apêndice 3).

Alguns estudos avaliaram a resposta do fluxo salivar ao tratamento profilático (n = 7 estudos, totalizando 165 pacientes nos grupos teste e 143 nos controles), o qual se inicia, na maioria dos casos, no mesmo dia da primeira sessão do tratamento radioterápico e continua durante todo o período de radiação. O objetivo é, não necessariamente um aumento no fluxo salivar, mas uma diminuição dos efeitos adversos da radioterapia. Dessa forma, o desfecho se mostra como sendo uma manutenção do fluxo inicial de antes da exposição à radiação, ou ao menos como um menor percentual de redução do fluxo quando comparado ao grupo placebo. Como o estudo de Lopes et al. (2006), em que os pacientes do grupo teste (n = 31) foram submetidos a sessões diárias de laser terapia até o encerramento da radioterapia, totalizando de 25 a 40 dias. Outros estudos avaliaram o efeito dos meios físicos de estimulação salivar após a radioterapia (n = 11, totalizando 412 pacientes que passaram por intervenção e 138 controles), de forma terapêutica, que tem como objetivo o aumento do fluxo salivar já comprometido em decorrência da radiação. Como no estudo de Paim et al. (2019), em que os pacientes do grupo teste (n = 37) foram submetidos a sessões de TENS duas vezes por semana, durante quatro semanas, totalizando oito sessões. Além disso, os protocolos variaram muito quanto à frequência e tempo de duração das sessões, comprimento de onda, potência, região de incidência e diâmetro da ponta ativa, no caso do laser, frequência e largura do

pulso, no caso do TENS e características das agulhas e pontos de aplicação, no caso da acupuntura. O detalhamento dos protocolos está disponível na Tabela 1.

N = 8 estudos utilizaram a acupuntura para estimulação salivar, sendo 3 de forma profilática (25,38,39) e 5 de forma terapêutica (40,41,43–45) (Apêndice 3). Diferentes pontos e agulhas foram utilizados, podendo existir pontos auriculares ou não, mas em todos os estudos as agulhas foram mantidas em posição durante 20 minutos por sessão ou por 7 dias em pontos auriculares. A quantidade de sessões foi variável, mas em sua maioria consistiu de 2 sessões por semana nos estudos terapêuticos e 3 sessões por semana (mesmos dias da radioterapia) nos profiláticos (Tabela 1 e Apêndice 3). N=4 estudos utilizaram TENS, em sua maioria de forma terapêutica (22,33,36,37), e apenas dois grupos de um dos estudos utilizou de forma profilática (22) (Apêndice 3). Em todos os protocolos adotados, os eletrodos foram posicionados sobre a pele na região das glândulas parótidas e/ou submandibulares e/ou sublinguais, com a frequência de pulso variando de 50 a 600 Hz, durante um tempo de 5 a 20 minutos por sessão (Tabela 1). Outros 3 estudos usaram laser, todos de forma profilática (34,35,46), com sessões durante todo o tratamento radioterápico, comprimento de onda variando de 630 a 685 nm, potência real de 30 a 35 mW e os pontos foram variáveis, de forma intraoral ou transcutânea (Tabela 1 e Apêndice 3). Por fim, 2 estudos utilizaram ALTENS (*Acupuncture-like* TENS) de forma terapêutica (24,42) (Apêndice 3). O ALTENS consiste em um aparelho de estimulação elétrica com frequência menor que o TENS e promove sensações semelhantes às agulhas da acupuntura, sendo posicionado em pontos de acupuntura (24). As aplicações foram feitas 2 vezes por semana, durante 6 ou 12 semanas e cada sessão com duração de 20 minutos em pulsos com frequência de 4 Hz e 250 ms. Alguns dos pontos de acupuntura utilizados foram: Sp6, St 36, Li4 e CV24 (Tabela 1).

Apenas 6 estudos possuíam um grupo controle “verdadeiro”, placebo ou sem tratamento (25,33-35,38,46). Nesses casos, foi possível observar um efeito positivo dos métodos utilizados, e apenas um estudo mostrou não haver diferença entre o grupo teste e o controle (34). No estudo de Paim et al. (2019), observou-se um fluxo de saliva estimulada seis vezes maior (0.1 ml/min para 0.6 ml/min) logo após o tratamento com TENS, e cinco vezes maior com 6 meses de acompanhamento, comparando com o fluxo antes do tratamento no grupo teste. Enquanto o grupo controle sem tratamento não apresentou diferença significativa em nenhum dos tempos analisados. (Apêndice 3)

Nos estudos profiláticos, notou-se efeito positivo no sentido de manutenção do fluxo salivar o mais próximo possível do fluxo inicial antes do tratamento radioterápico. No estudo de Braga et al. (2011), houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos após o tratamento radioterápico, com o fluxo salivar do grupo teste ficando aproximadamente 5 vezes maior que o fluxo salivar do grupo controle sem tratamento. No estudo de Libik et al. (2017), após a radioterapia, o fluxo salivar total do grupo teste correspondeu a 89% do fluxo inicial, enquanto do grupo controle sem tratamento esse percentual foi de 34%. E no estudo de Lopes et al. (2006), observou-se, além da manutenção do fluxo inicial, um aumento de 2% no fluxo salivar do grupo teste com 30 dias de acompanhamento, enquanto o grupo controle sem tratamento apresentou

manutenção de apenas 40% do fluxo inicial, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Apêndice 3)

Interessantemente, os demais ensaios clínicos não apresentaram controles adequados, portanto, considera-se que não há evidência para declarar melhora da qualidade do fluxo salivar após esses tratamentos (22,39,43,45). Em sua maioria, constam de estudos que utilizam a acupuntura para estimulação salivar, e o grupo controle é submetido ao tratamento com as agulhas inseridas de forma superficial, e/ou em pontos que não são considerados pontos de acupuntura (39,43,45). Outro consistiu de indivíduos saudáveis que também foram submetidos ao tratamento proposto (22). Dessa forma, a comparação entre os grupos fica prejudicada, pois o grupo controle também recebe algum tipo de intervenção que não pode ser considerada placebo. (Apêndice 3)

Entre os estudos de relato de caso e ensaios clínicos de braço único, todos apresentaram melhora no fluxo salivar após os tratamentos com métodos físicos para estimulação salivar (37,40,44), com média de aumento de 0,105 ml/min, e pelo menos 50% dos indivíduos apresentando esse desfecho. (Apêndice 3)

A Tabela 2 é um quadro resumo dos estudos incluídos organizados de acordo com o método, tipo de estudo, presença ou ausência de grupo controle “verdadeiro”, momento de aplicação do método e o desfecho observado.

## DISCUSSÃO

O objetivo dessa revisão de escopo foi identificar os protocolos atualmente disponíveis na literatura a respeito dos métodos físicos e seus efeitos na estimulação salivar de pacientes com hipossalivação provocada por radioterapia na região de cabeça e pescoço. Os meios físicos têm como principal vantagem a ocorrência reduzida de efeitos adversos quando comparados aos métodos farmacológicos (19). Estudos que utilizaram TENS (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*) (33), laser de baixa potência (47) e a acupuntura (25) para estimulação salivar relatam praticamente não ocorrerem efeitos adversos nos pacientes submetidos a esses métodos.

Sabe-se que a radioterapia é considerada padrão-ouro para o tratamento de câncer de diversos tipos, incluindo na região de cabeça e pescoço (48). A radiação ionizante tem como mecanismo de ação a destruição do DNA de células potencialmente sensíveis com alto índice de divisão celular, como é o caso das células neoplásicas, interrompendo o ciclo de proliferação tumoral (6,48,49). As células das glândulas salivares são altamente especializadas e com baixo nível de divisão celular, entretanto são bastante sensíveis à radiação e não existe clareza quanto a todos os fatores associados a essa sensibilidade e consequente redução no fluxo salivar (3,5,6). Algumas das hipóteses dizem respeito aos possíveis danos causados na vascularização das glândulas salivares, resultando em maior permeabilidade capilar,

fibrose de artérias e veias e infiltração inflamatória, sendo, portanto, um efeito secundário da radiação, e não efeitos diretos nas células ductais (10,50). Outra possibilidade seria diminuição na expressão de aquaporinas nas membranas das células. As aquaporinas são proteínas de transporte que facilitam a passagem de fluidos pela membrana celular, como acontece nos ductos das glândulas salivares (9). Além disso, ainda existem estudos que mostram uma probabilidade de danos na inervação glandular, o que pode prejudicar os estímulos necessários para desencadear a secreção salivar (7). Contudo, o nível de dano parece estar relacionado à dose da radiação à qual o tecido é submetido, de forma que na primeira semana do tratamento já se observa uma redução no fluxo salivar, e quando acumulam altas doses de radiação (em torno de 60 Gy), é possível que ocorram modificações irreversíveis e baixa taxa de recuperação (29).

Nesse sentido, os métodos físicos para estimulação salivar podem ser promissores para o tratamento ou prevenção da hipossalivação de pacientes que passaram ou iriam passar por tratamento radioterápico e ainda possuem algum remanescente glandular funcional, visto que hipóteses sugerem que a acupuntura, por meio da inserção de agulhas, estimula o sistema nervoso autônomo, aumentando a atividade parassimpática com a liberação de neuropeptídeos relacionados ao aumento do fluxo sanguíneo nas glândulas salivares, o que pode regularizar o metabolismo e aumentar a produção salivar (24). O laser de baixa intensidade parece aumentar a expressão de proteínas anti-apoptóticas e diminuir os marcadores inflamatórios (51), além da atividade fotobiomoduladora promover aumento na transcrição e respiração celular, responsáveis pela formação de novos ductos glandulares, por meio dos fótons que são absorvidos por citocromos e porfirinas das mitocôndrias celulares. Isso resulta em uma liberação temporária de óxido nítrico pela enzima citocromo C oxidase, permitindo que novas ligações sejam feitas (6). Por fim, o TENS tem como princípio a estimulação elétrica dos nervos relacionados ao processo de salivação, que se mostra bem complexo e dependente do sistema nervoso autônomo (33), de modo que a colocação dos eletrodos na região da pele sobre os terceiros molares inferiores promove estímulo direto do nervo auriculotemporal, o qual é responsável por desencadear o reflexo da salivação no bulbo raquidiano (22). Além disso, O ALTENS consiste em um aparelho de estimulação elétrica com frequência menor que o TENS e promove sensações semelhantes às agulhas da acupuntura, sendo posicionado em pontos de acupuntura, e possui a vantagem de não ter a necessidade de inserção de agulhas (24). Vale destacar que, apesar de estar contida na estratégia de busca e ser utilizada como palavra-chave, a goma de mascar é considerada como um estímulo mecânico com difícil replicação e padronização do protocolo, visto que o próprio paciente faz a utilização, diferente dos métodos físicos incluídos nessa revisão, em que são os profissionais os responsáveis pela aplicação dos protocolos. Portanto, os estudos que avaliaram somente o efeito das gomas de mascar foram excluídos.

Existem algumas revisões na literatura sobre os métodos que podem ser utilizados para a estimulação salivar de pacientes irradiados (6,19,27–32), mas nenhuma delas realmente inclui todos os estudos com métodos físicos disponíveis, sendo ensaios clínicos randomizados ou não, com o propósito de reunir todos os protocolos e seus efeitos. Sendo assim, essa revisão de escopo compilou todos os protocolos encontrados separando-os em profiláticos e terapêuticos (Apêndice 3), com o objetivo de permitir uma análise mais criteriosa e futuro estabelecimento do protocolo ideal para cada situação. Foi observada uma alta heterogeneidade dos protocolos utilizados, o que inviabiliza a realização de uma análise sistemática quantitativa nesse momento. Nesse sentido, foram incluídos estudos que fizeram a estimulação salivar por meios físicos de forma profilática, em que as sessões se iniciaram antes, ou simultaneamente ao tratamento radioterápico, e continuaram até a finalização da radiação. Nesse caso, o desfecho se mostra como uma manutenção ou menor percentual de redução do fluxo salivar inicial antes da radiação. E outros estudos realizaram a estimulação salivar em pacientes que já haviam finalizado o tratamento radioterápico, e o desfecho se dá no sentido de aumento do fluxo salivar.

Vale destacar que alguns dos ensaios clínicos randomizados incluídos não possuíam grupo controle “verdadeiro” (sem tratamento ou com tratamento padrão-ouro), o que prejudica bastante a avaliação do desfecho, não sendo possível chegar a uma conclusão da real eficácia do protocolo adotado por esses estudos. Isso aconteceu, principalmente, nos estudos que realizaram a estimulação salivar com acupuntura, em que o grupo controle foi submetido ao tratamento com agulhas superficiais ou em pontos que não são de acupuntura. Nesses casos, não houve diferença entre o grupo teste e o grupo controle, o que não permite concluir se realmente existe efeito positivo ou trata-se de uma resposta do próprio organismo à finalização do tratamento radioterápico. Talvez a melhora encontrada após esses tratamentos seja reflexo da história natural do fluxo salivar após alguns meses de radiação, ou seja, da “história natural do agravo” que pode retornar a níveis mais altos após um período de tempo. Por isso, os estudos que não apresentaram grupo controle “verdadeiro” devem ser analisados com muita cautela. Eles servem para entender os protocolos propostos, mas nunca para comprovar a eficácia do tratamento.

Ademais, ainda é possível identificar alguns riscos de viés que podem ter influenciado nos desfechos dos estudos, a exemplo de pacientes que poderiam estar utilizando substitutos salivares durante o estudo e o autor não relata, a dose da radiação, o tempo de duração e há quanto tempo foi finalizada a radioterapia, as diferentes formas e tempos de sialometrias que foram adotados (Apêndice 4), alguns possíveis hábitos e comorbidades que os pacientes poderiam ter, a presença e quantidade de remanescente glandular funcional, além da forma de randomização e pequenos tamanhos das amostras. No estudo de Lopes et al. (2006), a randomização foi feita

de forma que os grupos teste e controle foram definidos de acordo com os números dos prontuários, o que acaba por limitar a distribuição da amostra e pode gerar diferença entre os grupos, como aconteceu no estudo de Cho et al. (2008).

A maioria dos estudos mostrou efeito no fluxo estatisticamente significativo ( $n = 15$ ), enquanto  $n = 2$  relataram não haver diferença entre antes e depois da estimulação salivar (Apêndice 3). Contudo, mesmo não havendo aumento quantitativo após a estimulação salivar com os meios físicos, as diferenças observadas clinicamente podem ser relevantes. No estudo de Simcock et al. (2013), os pacientes submetidos a sessões de acupuntura não apresentaram aumento no fluxo salivar, mas mostraram melhora significativa na sensação de boca seca (xerostomia) nas análises qualitativas. Isso pode ocorrer talvez por conta do possível estímulo provocado nas glândulas salivares menores, as quais produzem uma saliva rica em mucinas, proteína importante para a manutenção da estrutura da saliva e lubrificação da mucosa, contribuindo para um melhor conforto relatado pelos pacientes (24,52). Além disso, o estudo terapêutico de Wong et al (2015) mostrou que os pacientes do grupo teste, os quais foram submetidos a 24 sessões de ALTENS, apresentaram resultados semelhantes ao grupo que utilizou a pilocarpina 5 mg para estimulação salivar, não havendo diferença significativa entre os grupos (Apêndice 3). Isso mostra que os métodos físicos podem ter efeitos similares aos métodos farmacológicos, os quais já possuem evidência da eficácia, mas apresentam alto índice de efeitos adversos (18–20).

## **CONCLUSÃO**

Os meios físicos para estimulação salivar de pacientes com hipossalivação ou potencial risco de hipossalivação como efeito adverso da radiação na região de cabeça e pescoço parecem ser benéficos quanto ao aumento do fluxo salivar ou melhora no conforto da cavidade bucal. Os protocolos preventivos parecem mais promissores em relação aos terapêuticos, talvez em decorrência da presença do parênquima glandular intacto antes de receber radiação, enquanto nos estudos terapêuticos os pacientes já possuem algum percentual de comprometimento. Entretanto, em virtude da baixa qualidade dos estudos existentes, são necessários

mais ensaios clínicos com grupo controle passível de comparação, a fim de que se possa chegar a uma conclusão mais concreta e determinar um protocolo ideal efetivo.

## **APÊNDICES**

<https://docs.google.com/document/d/1HSP6Ex-yyEyJaKGgHprHzZAwuHI1h7sZ5gIJnrl6-Fg/edit?usp=sharing>

(Link de acesso aos apêndices do estudo)

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao CNPq, FAP-DF e ProC/UnB. Esse trabalho recebeu prêmio de segundo lugar na XXV Jornada Odontológica da UnB, 2022; e Menção Honrosa na 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO).

## **REFERÊNCIAS**

1. Scully C, Bagan J V. Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment, prognostication and treatment outcomes. *Oral Oncol* [Internet]. 2009;45(6):e25–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.12.011>
2. Jellema AP, Slotman BJ, Doornaert P, Leemans CR, Langendijk JA. Impact of Radiation-Induced Xerostomia on Quality of Life After Primary Radiotherapy Among Patients With Head and Neck Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;69(3):751–60.



3. Jensen SB, Vissink A, Limesand KH, Reyland ME. Salivary Gland Hypofunction and Xerostomia in Head and Neck Radiation Patients. *J Natl Cancer Inst - Monogr.* 2019;2019(53):95–106.
4. Kawashita Y, Soutome S, Umeda M, Saito T. Oral management strategies for radiotherapy of head and neck cancer. *Jpn Dent Sci Rev [Internet].* 2020;56(1):62–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2020.02.001>
5. Acauan MD, Figueiredo MAZ, Cherubini K, Gomes APN, Salum FG. Radiotherapy-induced salivary dysfunction: Structural changes, pathogenetic mechanisms and therapies. *Arch Oral Biol [Internet].* 2015;60(12):1802–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.09.014>
6. Louzeiro GC, Teixeira D da S, Cherubini K, de Figueiredo MAZ, Salum FG. Does laser photobiomodulation prevent hyposalivation in patients undergoing head and neck radiotherapy? A systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Crit Rev Oncol Hematol [Internet].* 2020;156(October):103115. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103115>
7. Konings AWT, Coppes RP, Vissink A. On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;62(4):1187–94.
8. Avila JL, Grundmann O, Burd R. Radiation-induced salivary gland dysfunction results from p53- dependent apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2009;23(1):1–7.
9. Araujo MVT, Spadella MA, Chies AB, Arruda G V., Santos T de M, Cavariani MM, et al. Effect of low radiation dose on the expression and location of aquaporins in rat submandibular gland. *Tissue Cell [Internet].* 2018;53(June):104–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.06.006>
10. Xu J, Yan X, Gao R, Mao L. EFFECT OF IRRADIATION ON MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS OF PAROTID GLANDS IN THE MINIATURE PIG. *Radiat Phys Chem.* 2010;55(5–6):663–6.
11. Saylam G, Baylr Ö, Gültekin SS, Pınarlı FA, Han Ü, Korkmaz MH, et al. Protective/restorative role of the adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the radioiodine-induced salivary gland damage in rats. *Radiol Oncol.* 2017;51(3):307–18.
12. Fiorentino A, Caivano R, Metallo V, Chiumento C, Cozzolino M, Califano G, et al. Parotid gland volumetric changes during intensity-

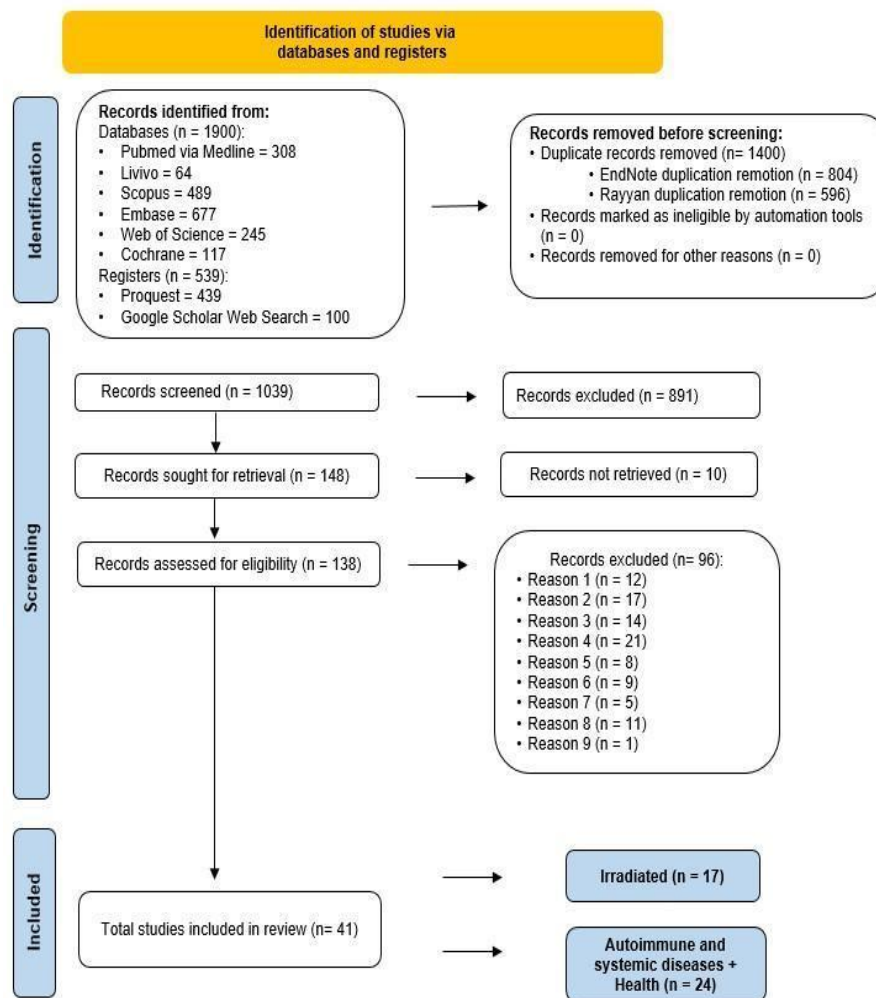
- modulated radiotherapy in head and neck cancer. *Br J Radiol*. 2012;85(1018):1415–9.
13. Dodds M, Roland S, Edgar M, Thornhill M. Saliva A review of its role in maintaining oral health and preventing dental disease. *BDJ Team* [Internet]. 2015;2(1–8):1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bdjteam.2015.123>
  14. López-pintor RM, Casañas E, González-serrano J, Serrano J, Ramírez L, Arriba L De, et al. Xerostomia, Hyposalivation, and Salivary Flow in Diabetes Patients. *Hindawi Publ Corp J Diabetes Res Vol* 2016 <http://dx.doi.org/101155/2016/4372852> Rev. 2016;2016.
  15. Likhterov M, Meng Ru M, Ganz M, Urken M. Objective and Subjective Hyposalivation after Treatment for Head and Neck Cancer: Long Term Outcomes. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2018;176(1):139–48.
  16. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-an update. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(5):401–21.
  17. Lin A, Helgeson ES, Treister NS, Schmidt BL, Patton LL, Elting LS, et al. The impact of head and neck radiotherapy on salivary flow and quality of life: Results of the ORARAD study. *Oral Oncol* [Internet]. 2022;127(February):105783. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2022.105783>
  18. Salum FG, Medella-Junior F de AC, Figueiredo MAZ, Cherubini K. Salivary hypofunction: An update on therapeutic strategies. *Gerodontology*. 2018;35(4):305–16.
  19. Mercadante V, Al Hamad A, Lodi G, Porter S, Fedele S. Interventions for the management of radiotherapy-induced xerostomia and hyposalivation: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* [Internet]. 2017;66:64–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.12.031>
  20. Wolff A, C. Fox P, Porter S, T. Konttinen Y. Established and Novel Approaches for the Management of Hyposalivation and Xerostomia. *Curr Pharm Des*. 2012;18(34):5515–21.
  21. Ed AING, Hoog DE, Ph D, Sutton DA, Ph D. *Clinical*. 2003;134(April):853–8.
  22. Lakshman AR, Subhas Babu G, Rao S. Evaluation of effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on salivary flow rate in radiation induced xerostomia patients: A pilot study. *J Cancer Res Ther*. 2015;11(1):229–33.

23. Paim ÉD, Berbert MCB, Zanella VG, Macagnan FE. Electrical stimulation in the treatment of radiotherapy-induced hyposalivation. *Codas*. 2019;31(4):1–7.
24. Wong RKW, Jones GW, Sagar SM, Babjak AF, Whelan T. A phase I-II study in the use of acupuncture-like transcutaneous nerve stimulation in the treatment of radiation-induced xerostomia in head-and-neck cancer patients treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;57(2):472–80.
25. Braga F do PF, Lemos Junior CA, Alves FA, Migliari DA. Acupuncture for the prevention of radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer. *Braz Oral Res*. 2011;25(2):180–5.
26. Bots CP, Brand HS, Veerman ECL, Valentijn-Benz M, Van Amerongen BM, Nieuw Amerongen A V., et al. The management of xerostomia in patients on haemodialysis: Comparison of artificial saliva and chewing gum. *Palliat Med*. 2005;19(3):202–7.
27. O’Sullivan EM, Higginson IJ. Clinical effectiveness and safety of acupuncture in the treatment of irradiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: A systematic review. *Acupunct Med*. 2010;28(4):191–9.
28. Zhuang L, Yang Z, Zeng X, Zhua X, Chen Z, Liu L, et al. The preventive and therapeutic effect of acupuncture for radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: A systematic review. *Integr Cancer Ther*. 2013;12(3):197–205.
29. Jensen SB, Pedersen AML, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: Management strategies and economic impact. *Support Care Cancer*. 2010;18(8):1061–79.
30. Towler P, Molassiotis A, Brearley SG. What is the evidence for the use of acupuncture as an intervention for symptom management in cancer supportive and palliative care: An integrative overview of reviews. *Support Care Cancer*. 2013;21(10):2913–23.
31. Salimi F, Saavedra F, Andrews B, FitzGerald J, Winter SC. Transcutaneous electrical nerve stimulation to treat dry mouth (xerostomia) following radiotherapy for head and neck cancer. A systematic review. *Ann Med Surg [Internet]*. 2021;63(January):102146. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.01.094>

32. Ni X, Tian T, Chen D, Liu L, Li X, Li F, et al. Acupuncture for Radiation-Induced Xerostomia in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Integr Cancer Ther.* 2020;19(37).
33. Dalbem Paim É, Costa Batista Berbert M, Gonzales Zanella V, Beatris Martins V, Edler Macagnan F. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on the salivary flow of patients with hyposalivation induced by radiotherapy in the head and neck region—A randomised clinical trial. *J Oral Rehabil.* 2019;46(12):1142–50.
34. Dantas JB de L, Martins GB, Lima HR, Carrera M, Reis SR de A, Medrado ARAP. Evaluation of preventive laser photobiomodulation in patients with head and neck cancer undergoing radiochemotherapy: Laser in patients with head and neck cancer. *Spec Care Dent.* 2020;40(4):364–73.
35. Lopes C de O, Mas JRI, Zângaro RA. Prevenção da xerostomia e da mucosite oral induzidas por radioterapia com uso do laser de baixa potência. *Radiol Bras.* 2006;39(2):131–6.
36. Bokkasam V, Puchalapalli Y, Shaik S, Suman SV, Praveen S, Mercy Y, et al. TENS in Radiation Induced Xerostomia - Case Reports. *Int J Contemp Med Surg Radiol.* 2020;5(2):2019–21.
37. Ojha S, Bhovi T V., Jaju PP, Gupta M, Singh N, Shrivastava K. Effectiveness of transcutaneous electrical nerve stimulation on saliva production in post-radiated oral cancer patients. *J Indian Acad Oral Med Radiol.* 2016;28(3):246–51.
38. Meng Z, Garcia MK. Randomized controlled trial of acupunctura for prevention of radiation-induced xerostomia among patients with nasopharyngeal carcinoma. *Tissue Eng.* 2013;23(1):1–7.
39. Meng Z, Garcia MK. Sham-controlled, randomized, feasibility trial of acupuncture for prevention of radiation-induced xerostomia among patients with nasopharyngeal carcinoma. *Tissue Eng.* 2012;23(1):1–7.
40. Simcock R, Fallowfield L, Jenkins V. Group acupuncture to relieve radiation induced xerostomia: A feasibility study. *Acupunct Med.* 2009;27(3):109–13.
41. Simcock R, Fallowfield L, Monson K, Solis-Trapala I, Parlour L, Langridge C, et al. Arix: A randomised trial of acupuncture V oral care sessions in patients with chronic xerostomia following treatment of head and neck cancer. *Ann Oncol.* 2013;24(3):776–83.
42. Wong RKW, Deshmukh S. Acupuncture-like Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation versus Pilicarpine in Treating Radiation-Induced

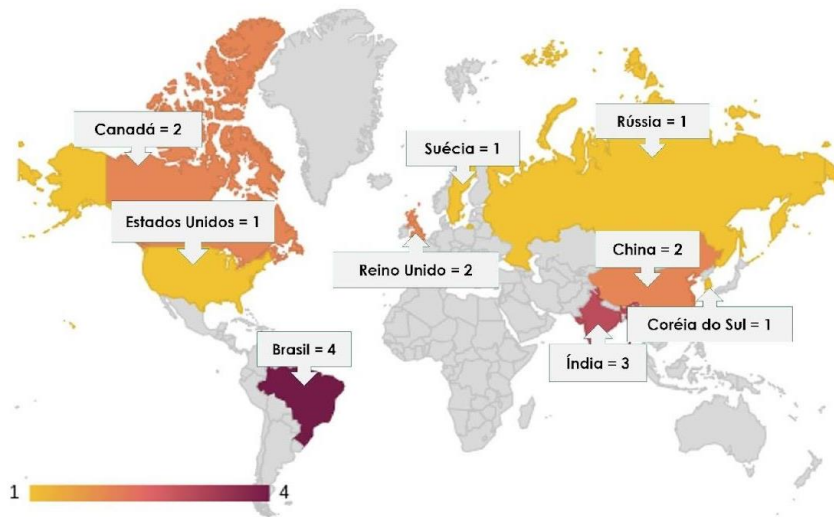
- Xerostomia: Results of RTOG 0537 Phase 3 Study. *Physiol Behav.* 2015;176(1):139–48.
43. Blom M, Dawidson I, Fernberg J, Johnson G. Acupuncture treatment of patients with radiation-induced xerostomia. *Oral Oncol.* 1996;33(2):146–7.
44. Garcia MK, Chiang JS, Cohen L, Liu M, Palmer JL. Acupuncture for radiation-induced xerostomia in patients with cancer: a pilot study. *Head Neck.* 2009;36(10):1391.
45. Cho JH, Chung WK, Kang W, Choi SM, Cho CK, Son CG. Manual acupuncture improved quality of life in cancer patients with radiation-induced xerostomia. *J Altern Complement Med.* 2008;14(5):523–6.
46. Libik T V., Gileva OS, Danilov K V., Grigorev SS, Pozdnyakova AA. Management of cancer therapy-induced oral mucositis pain and xerostomia with extra- and intra oral laser irradiation. *AIP Conf Proc.* 2017;1882(October).
47. Varellis MLZ, Gonçalves MLL, Pavesi VCS, Horliana ACRT, de Fátima Teixeira da Silva D, Motta LJ, et al. Evaluation of photobiomodulation in salivary production of patients with xerostomy induced by anti-hypertensive drugs. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(16):e19583.
48. Anderson G, Ebadi M, Vo K, Novak J, Govindarajan A, Amini A. An updated review on head and neck cancer treatment with radiation therapy. *Cancers (Basel).* 2021;13(19):1–12.
49. Alfouzan AF. Radiation therapy in head and neck cancer. *Saudi Med J.* 2021;42(3):247–54.
50. Limesand KH, Said S, Anderson SM. Suppression of radiation-induced salivary gland dysfunction by IGF-1. *PLoS One.* 2009;4(3):1–8.
51. Almeida FT, Leite AF, de Souza Figueiredo PT, dos Santos PAC, Rosa ECC, Mazzeu JF, et al. Dento-osseous anomalies in patients with familial adenomatous polyposis: A follow-up study. *Clin Oral Investig.* 2020;24(10):3501–11.
52. Wibawa A, Sucharitakul J, Dansirikul R, Pisarnturakit P, Pisarnturakit P, Bhuridej P, et al. Low-Level Laser Therapy to the Major Salivary Glands Increases Salivary Flow and MUC5B Protein Secretion in Diabetic Patients with Hyposalivation: A Preliminary Study. *Makara J Heal Res.* 2018;22(1):14–21.

## TABELAS E FIGURAS



**Reason 1:** Absence of analysis of salivary flow parameters; **Reason 2:** It is not original study or conference summary; **Reason 3:** No result because it was just the study protocol; **Reason 4:** Only chewing gum or other non-physical method; **Reason 5:** Presence of prosthesis wearers; **Reason 6:** Presence of confounding bias (sialogogues and salivary substitutes); **Reason 7:** Hyposalivation without a definite cause; **Reason 8:** No separate of results for different groups; **Reason 9:** Pediatric patient.

**Figure 1.** Flow diagram for study selection according to the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines.



**Figura 2.** Mapa geográfico indicando a distribuição dos estudos por país.

**Table 1.** Protocol details used by included studies that performed salivary stimulation by physical means (TENS, low level laser therapy, acupuncture and ALTENS).

Reference	Power / frequency/ wavelength / needle size and duration of application	Application location	Time of application
Blom et al. (1996)	The needles used were Chinese, sterile acupuncture needles for single use (Cloud & Dragon; diameter 0.30 mm; length 15 and 30 mm). The needles were inserted in acupuncture points which were stimulated manually until the appearance of needling reaction ( <i>de Qi</i> ) and kept in for 20 minutes.	<p>Five to eight points local and distal points: Du 20 Baihui, St 3 Nose-Juliao, St 6 Jiache, St 5 Daying, St 7 Xiaguan, Si 17 Tianrong, Li 18 Neck-Futu, P 6 Neiguan, H 7 Shenmen, Li 11 Quchi, Li 10 Shousanli, Li 4 Hegu, Si 3 Houxi, St 36 Zusanli, Liv 3 Taichong, Sp 3 Taibai, Sp 8 Dijii, Sp 6 Sanyinjiao, Ki 7 Fuliu, Ki 3 Taixi, Ki 5 Shuiquan.</p> <p>Two to four points from auricular points: Shenmen, Sympathetic, Kidney, Mouth, Stomach, Gl. Parotid, Subcortex.</p> <p>Control group: needles inserted 1 cm away from the acupoint.</p>	NA
Bokkasam et al. (2020)	TENS: Pulse width of frequency of 600Hz and 60 microsec. It was activated for 10 minutes.	Electrodes: externally on the skin in the preauricular region (parotid) and in the submandibular region	NA



		(submandibular) with the TENS unit in off position.	
Braga et al. (2011)	<p>Acupuncture needles (0.25 mm x 25 mm) were inserted to depths of 0.5-2.0 cm. The needles were stimulated manually until the appearance of <i>De Qi</i> and were maintained in position for 20 minutes.</p> <p>Auricular points: semipermanent needles (0.20 mm X 1.5 mm) were inserted and maintained in position for 7 days.</p>	Local acupoints (ST-3, ST-4, ST-5, ST-6, ST-7, GB-2, SI-19, TB-21), distal acupoints (LI-4, LI-11, LR-3, ST-36, KI-3, KI-5, GV-20), and auricular (Shen-Men, Central Nervous System, Neurovegetative System, Kidney, Spleen, Pancreas, and Mouth) acupoints, named in accordance with the WHO Standard Acupuncture Nomenclature.	NA
Cho et al. (2008)	Needles (Zeus Korea Acupuncture Dev. Co., Gunpo, Korea, diameter 0.20 mm, length 30 mm) were inserted to a depth of 1.5 cm and maintained in position for 20 minutes.	RA group: at St 6 (jiache, located on the cheek, 1 middle finger breadth anterior and superior to the mandibular angle), Li 4 (hegu, located on the dorsum of the hand, between the 1st and 2nd metacarpal bones), St 36 (zusanli, located on the leg, 1 finger breadth lateral to the tibia's anterior crest), and Sp 6 (sanyinjiao, located 10 cm directly above the tip of the medial malleolus on the	NA

		<p>posterior border of the tibia).</p> <p>SA group: superficial needling at less than 0.5-cm depth was performed and at non-acupoints 2 cm away from the real acupoints.</p>	
Dantas et al. (2020)	<p>Laser: maximum output power of 86.7 mW, active tip area of 0.1256 cm<sup>2</sup>, and continuous wavelength of 660 nm. The dosimetry used in each application was 2 J for 3 seconds, thus totalling 56 J.</p>	<p>28 equidistant points (excluding the location of the tumor): lips (three points each), right and left jugal mucosa (three points each), hard and soft palate (three points), buccal floor/sublingual gland (one point), lateral edge of the tongue (three points on each side), and back of the tongue (six points).</p>	<p>First photobiomodulation after RT and the following immediately before RT.</p>
Garcia et al. (2009)	<p>Standard techniques according to National Acupuncture Foundation. Clean needle technique manual for acupuncturists. Washington, DC: National Acupuncture Foundation; 1997.</p> <p>Needles were inserted until achievement of <i>de qi</i> sensation and maintained in position for 20 minutes.</p>	<p>Acupoints: CV 24, St 36, LI 10 (primed), Lu 7, Ear: Shenmen, Point zero, Salivary gland.</p>	<p>NA</p>

Lakshman et al. (2015)	TENS: continuous frequency of 500 Hz with a sweep of 0.5-2 Hz. The TENS was activated under continuous mode, adjusted for 5 minutes according to each patient comfort and kept on for 10 minutes.	Electrodes: externally on the skin overlying the parotid glands with the TENS unit in the off position.	NA
Libik et al. (2017)	<p>Laser: wavelength 630 nm and the potency of 30 mW. Energy density varied from 5.16 J/cm<sup>2</sup> to 16.2 J/cm<sup>2</sup>. Each parotid and submandibular glands were irradiated extraoral with a special headpiece at a dose of 2.5 J/cm<sup>2</sup>. As soon as OM and X diagnosed, increasing energy density: 6.3 J/cm<sup>2</sup> intraorally and 3.8 J/cm<sup>2</sup> transcutaneous.</p> <p>Control group: anti-inflammatory and analgesic agent benzidamine 0.15% solution (Tantum Verde, Angelini, Italy). 10–15 ml of solution 4–6 times daily, in pure undiluted form (during RT, when OM symptoms appear) or diluted in half with hot distilled water form (in pre-treatment period, during first days of RT start). In some cases the benzydamine solution was recommended to the patients to freeze for further dissolving of the self-made ice chips in the mouth 4–6-</p>	<p>Zones of oral mucosa: buccal (right and left), lips (upper and lower), hard palate, soft palate, the dorsum of the tongue, tongue edge (right and left), floor of the mouth, tonsillar pillar membrane (right and left).</p> <p>Extraoral: each parotid and submandibular gland.</p>	Same day of RT session: laser before RT.

	times daily.		
Lopes et al. (2006)	Laser: wavelength of 685 nm, energy density of 2 J/cm <sup>2</sup> , rated power of 50 mW and real of 35 mW in a fiber with 400 micrometers of diameter and irradiation time of 58 seconds.	Contact application: parotid (two points each), submandibular (one point on each side), buccal mucosa (two points on each side), floor of mouth (one point on each side), tongue (two points), one point on each pillar and uvula (one point).	Same day of RT session: laser after RT.
Meng et al. (2012)	Standard techniques according to "Chinese Acupuncture and Moxibustion" and "A Manual of Acupuncture".  Needles were inserted until achievement of <i>de qi</i> sensation and remained in place for 20 minutes.	Acupoints: Ren 24, Lung 7 (LU 7), and Kidney 6 (K 6), and ear points were Shenmen, Point Zero, Salivary Gland 2-prime (SG 2'), and Larynx. Except for Ren 24 located in the midline, all points were treated bilaterally.	Acupuncture at the same day but prior to RT.

Meng et al. (2012)	<p>The Needles were Seirin, 36-gauge X 30 mm for body points and 40-gauge X 15 mm for ear points.</p> <p>Needles were inserted until achievement of <i>de qi</i> sensation and remained in place for 20 minutes.</p>	<p>Body points: Ren 24, Lung 7 (LU 7), and Kidney 6 (K 6).</p> <p>Ear points: Shenmen, Point Zero, Salivary Gland 2-prime (SG 2'), and Larynx. Except for Ren 24, which is located in the midline, all points were treated bilaterally.</p> <p>Sham acupuncture points: 0.5 cun* below and 0.5 lateral to Ren 24 on the chin; 0.5 cun radial and 0.5 proximal to Sanjiao 6 (SJ 6) between the SJ and LI channels; 2 cun above the last location between the SJ and LI channels and between LI 7 and LI 8; 1.0 cun below and 0.5 cun lateral to Stomach 36 (ST 36), between the ST and GB channels.</p>	Acupuncture at the same day but prior to RT.
Ojha et al. (2016)	TENS: pulse rate of 50 Hz during 5 minutes.	Electrodes: externally on the skin overlying the parotid, submandibular, and sublingual glands with the TENS unit in the "off" position.	NA
Paim et al. (2019)	TENS: wave frequency of 50 Hz and width of 250 $\mu$ s. It was activated for 20 minutes without interruptions and the	Electrodes: over the skin of both facial sides next to parotid and	NA

	intensity was individually adjusted.	submandibular glands.	
Simcock et al. (2009)	<p>Auricular needling: 0.2 X 7 mm.</p> <p>Distal needling: 0.2 mm X 40 mm for the distal point.</p> <p>Points were needled into subcutaneous tissue and were retained in each point for 20 minutes. At 10 minutes retention time the needles were manually rotated to increase the likelihood of <i>de qi</i>.</p>	<p>Four points bilaterally (three points in the bilateral ears) Salivary Gland 2; Modified Point Zero; Shen Men and one point in the distal radial aspect of each index finger (LI1) according to the protocol outlined by Johnstone and colleagues.</p>	NA
Simcock et al. (2013)	<p>Ear needles (0.2 x 7 mm) and distally needles (0.16 x 25 mm) were inserted to dermis, retained for 20 min, and manually rotated at 10 min to increase the likelihood of <i>de qi</i>.</p>	<p>Ears at the following points: Salivary Gland 2, Modified Point Zero, and Shen Men.</p> <p>Distally points: bilaterally in LI2 (index finger) and LI20 (nasolabial groove at the level of the most prominent part of the ala nasi).</p>	NA
Wong et al. (2003)	<p>ALTENS: Nonpolarizing, balanced, biphasic, square electrical pulses of 250-ms duration were delivered in trains with a repetition rate of 4 Hz (recurrence frequency, code III on the Codetron machine). The intensity of stimulation of each acupuncture point was adjusted to produce a deep,</p>	<p>Group A points: Sp6, St36, LI4 (active electrodes) and CV24 (indifferent electrode)</p> <p>Group B: Sp6, St36, P6 (active electrodes) and CV24 (indifferent electrode)</p> <p>Group C: Sp6, St5 and 6, P6</p>	NA



		ent		if f e r e n t		re nt		re nt		e r e nt		ent
<b>TENS</b>	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	2	-
<b>Laser</b>	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acupuntura</b>	2	-	-	-	-	1	2	-	-	-	2	1
<b>ALTENS</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-

\*Randomized controlled trials that compared physical means with other treatments or that the control group was not of interest in this study were considered as single-arm clinical trials in this table.



Apêndice 2 – Relatório final de projeto de iniciação científica – Aluna:  
Jéssica Melo

**Métodos físicos de estimulação salivar em portadores de hipossalivação causada por doenças ou condições sistêmicas: uma revisão de escopo**

Jéssica Luiza Mendonça Albuquerque de Melo

Camila Pinho e Souza Coelho

Fernanda de Paula e Silva Nunes

Nailê Damé-Teixeira

Daniela Corrêa Grisi

Maria do Carmo Machado Guimarães

Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília,  
Brasil

\*Autor correspondente:

Maria do Carmo Machado Guimarães

Departamento de Odontologia

Faculdade de Ciências da Saúde

Campus Universitário Darcy Ribeiro – Universidade de Brasília

Asa Norte - Brasília – DF - Brasil

CEP: 70910-900

Email: mcarmo@unb.br

Palavras-chave: Hipossalivação; Doença autoimune; Estimulação salivar; Estimulação elétrica nervosa transcutânea; Laser de baixa potência; Acupuntura; Tratamento.

## RESUMO

**Objetivos:** Diferentes condições sistêmicas podem resultar em graus distintos de comprometimento das glândulas salivares e alteram o fluxo salivar por diferentes mecanismos. Esta revisão objetiva mapear os estudos disponíveis acerca dos métodos físicos de tratamento para hipossalivação, a fim de avaliar quais alternativas de manejo da hipossalivação existem e quais as respostas de indivíduos com diferentes condições a esses tratamentos.

**Métodos:** Uma revisão de escopo foi realizada com a extensão PRISMA para revisões de escopo. Uma busca ampla e sistemática da literatura foi realizada em seis bases de dados eletrônicas, bem como na literatura cinzenta. Dois revisores avaliaram independentemente a seleção e caracterização dos estudos. Foram incluídos estudos clínicos, randomizados ou não, que utilizaram métodos físicos para tratamento de hipossalivação causada por condições sistêmicas ou saudáveis. Estudos clínicos de braço único ou séries de caso também foram incluídos para mapeamento dos protocolos.

**Resultados:** Foram incluídos 24 estudos: 10 em indivíduos saudáveis e 14 em indivíduos com hipossalivação. Apenas 6 estudos eram ensaios clínicos randomizados e 13 não apresentaram grupos paralelos. Dos 10 estudos em indivíduos saudáveis, 9 aplicaram estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) e 1 aplicou acupuntura e eletroacupuntura (todos resultando em aumento do fluxo salivar após intervenções). Considerando os 14 estudos em indivíduos com hipossalivação, 6 trataram a mesma com laser de baixa potência (LBP), 6 TENS e 2 acupuntura. Dentre os artigos de LBP, 3 estudaram indivíduos com síndrome de Sjögren (SS) (um resultou em aumento do fluxo salivar e dois não apresentaram efeito), 2 foram para indivíduos que fazem uso de medicamentos e 1 para diabéticos (os três com aumento do fluxo). Os estudos do TENS foram em diferentes condições, todos com aumento do fluxo pós-tratamento: quimioterapia, uso de medicamentos, mulheres em pós-menopausa, pacientes em hemodiálise, fumantes e diabéticos. Um estudo combinou a acupuntura em indivíduos em uso de medicamentos, enquanto outro associou acupuntura em indivíduos com SS e outras condições sistêmicas.

**Conclusão:** A grande heterogeneidade entre os protocolos aplicados, o baixo número de estudos disponíveis para as doenças específicas e os diferentes métodos, e o fato de mais da metade dos estudos não apresentarem grupos paralelos limitaram uma avaliação da eficácia dos tratamentos e protocolos. Novos estudos bem delineados

metodologicamente devem ser realizados antes de qualquer indicação clínica para manejo de hipossalivação. Quanto às condições sistêmicas, indivíduos em uso de medicamentos tiveram melhores respostas das glândulas salivares enquanto os com SS tiveram as piores respostas. Os indivíduos saudáveis também responderam com aumento do fluxo salivar.

**PALAVRAS-CHAVE** Hipossalivação; Doença autoimune; Estimulação salivar; Estimulação elétrica nervosa transcutânea; Laser de baixa potência; Acupuntura; Tratamento.

## RELEVÂNCIA CLÍNICA

Os métodos físicos de tratamento para hipossalivação, como o laser de baixa potência, a acupuntura e a estimulação elétrica nervosa transcutânea, poderiam ser alternativas mais conservadoras, menos invasivas, de menor custo e apresentam nenhum ou poucos efeitos adversos. Porém, não há evidência quanto a sua eficácia nesse momento.

## INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido de extrema relevância na manutenção da saúde bucal, desempenhando funções digestivas, de proteção, de lubrificação dos tecidos bucais, além de possuir atividade antimicrobiana, produzir fatores de crescimento e possuir peptídeos reguladores em sua composição. É essencial na fala, deglutição e percepção dos sabores e atua no tamponamento e na remineralização dos tecidos dentários (ASSY; BRAND, 2018; DODDS et al., 2015). Nesse sentido, a redução do fluxo salivar e/ou sensação de boca seca compromete a saúde e é referida como uma das principais variáveis para a redução da qualidade de vida associada à saúde bucal (BOTELHO et al., 2020; ENGER et al., 2011; IKEBE et al., 2007; NIKLANDER et al., 2017). A redução do fluxo salivar (hipossalivação) favorece o desenvolvimento de doenças bucais, dentre as quais se destacam as lesões de cárie, periodontite, candidíase, inflamações e alterações atróficas da mucosa oral, ulcerações e infecções oportunistas (ASSY; BRAND, 2018; IKEBE et al., 2007; PEDERSEN et al., 2018; SALARI; SALARI; MEDICINE, 2017).

A hipossalivação pode ser manifestada junta ou separadamente da xerostomia, mas é importante que se entenda que são duas condições

distintas associadas ao estado de boca seca (AGOSTINI et al., 2018). A xerostomia corresponde à sensação persistente e subjetiva de boca seca, enquanto a hipossalivação se refere à mensuração objetiva da redução do fluxo do salivar (DODDS et al., 2015; GOLEŽ et al., 2022; SALARI; SALARI; MEDICINE, 2017). A prevalência geral de xerostomia, mundialmente, é de 23,0% e a de hipossalivação é de 20,0%, com taxas ainda maiores entre a população geriátrica (AGOSTINI et al., 2018).

Inúmeras doenças sistêmicas são capazes de alterar a secreção salivar, como diabetes (MARQUES et al., 2022), síndrome de Sjögren (SS) (CAVALCANTE et al., 2018), hipertensão, hipotireoidismo, da mesma forma que quadros clínicos que requerem a administração de fármacos anticolinérgicos (SINGH; PAPAS, 2014). A título de exemplo, medicamentos de uso recorrente com efeitos anti-histamínico, antidepressivo, anti-hipertensivo, antiparkinson e ansiolíticos são alguns desses agentes anticolinérgicos mais comumente associados a efeitos adversos nas glândulas salivares (SINGH; PAPAS, 2014; TURNER, 2016). No que se refere a etiopatogenia da hipossalivação, no diabetes a hiperglicemia prolongada pode levar ao aumento da produção de urina e consequente desidratação, insuficiência de estimulação parassimpática ou modificações nas membranas das glândulas salivares (MARQUES et al., 2022). Já a SS é uma doença autoimune e caracterizada por uma série de mecanismos complexos que resultam na destruição e posterior fibrose do parênquima glandular (CAVALCANTE et al., 2018). Em contraste, os fármacos anticolinérgicos não produzem efeito irreversível nas glândulas salivares, não interagem e nem impedem a formação da acetilcolina, mas alteram a salivação ao competirem com os receptores muscarínicos nas glândulas salivares (SINGH; PAPAS, 2014).

Dentre as alternativas para o manejo, a pilocarpina e a cevimelina são exemplos de fármacos agonistas colinérgicos que têm sido amplamente utilizados para a estimulação química da secreção salivar (VON BÜLTZINGSLÖWEN et al., 2007). Entretanto, tais estratégias, além de apresentarem contraindicações, frequentemente resultam em efeitos adversos sistêmicos que podem incluir náusea, febre, diarreia e sudorese (GIL-MONTOYA et al., 2016; GOLEŽ et al., 2022).

Sob essa perspectiva, vários pesquisadores apontam que as alternativas de estimulação física do fluxo salivar, como o laser de baixa potência (LBP) (GOLEŽ et al., 2022), acupuntura (BLOM; DAWIDSON; ANGMAR-MÅNSSON, 1992) e estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) (DHILLON et al., 2016; DYASNOOR; KAMATH; KHADER, 2017), parecem ser mais conservadoras, menos invasivas, de menor custo e

com nenhum ou poucos efeitos adversos (GIL-MONTOYA et al., 2016). O laser de baixa potência e a acupuntura aparentam impactar positivamente no aumento do fluxo salivar por mecanismos semelhantes: aumentam a microcirculação pela liberação de neuropeptídeos sensoriais, aumentam a oxigenação e o metabolismo tecidual (BLOM; DAWIDSON; ANGMAR-MÅNSSON, 1992; DABIĆ et al., 2016; GOLEŽ et al., 2022). Adicionalmente, o laser parece contribuir no reparo tecidual glandular (GOLEŽ et al., 2022). Para o TENS, o mecanismo de atuação na glândula parótida ainda não é muito claro. Em suma, aparenta produzir efeito pela estimulação do nervo auriculotemporal (DHILLON et al., 2016; DYASNOOR; KAMATH; KHADER, 2017; GIL-MONTOYA et al., 2016; SMRITI. B et al., 2014).

Há diversas revisões na literatura em busca de encontrar o melhor tratamento para hipossalivação (BRENNAN et al., 2002; FURNESS et al., 2013; GARLAPATI et al., 2019; JEDEL, 2005; VON BÜLTZINGSLÖWEN et al., 2007). Entretanto, além de serem revisões datadas em sua maioria, ou elas reúnem apenas artigos que aplicam métodos químicos (GARLAPATI et al., 2019), ou tratam apenas de uma terapia (JEDEL, 2005), ou relatam, por exemplo, casos de pacientes com somente uma condição associada, como a SS (GARLAPATI et al., 2019). FURNESS et al., 2013 examinou a literatura existente sobre métodos não farmacológicos, mas incluiu apenas ensaios clínicos randomizados, assim como BRENNAN et al., 2002, o que restringe uma avaliação sobre o que de fato existe na literatura, já que são desconsiderados todos os demais estudos não randomizados e não controlados. Ambos, ainda, combinaram estudos em pacientes irradiados com outras condições sistêmicas. Tal associação é pouco fundamentada, pois, ao contrário da hipossalivação causada por doenças sistêmicas, o tecido glandular de irradiados geralmente apresenta danos severos e irreversíveis (MERCADANTE et al., 2017). Ademais, FURNESS et al., 2013 deu pouca ênfase às condições que causam hipossalivação, o que seria um fator relevante, tendo em vista que as variadas doenças sistêmicas podem responder aos tratamentos de formas diferentes.

Uma vez que cada fármaco e cada doença sistêmica resulta em graus distintos de comprometimento das glândulas salivares e possuem diferentes etiologias, observa-se que a literatura carece de protocolos mais definidos que respeitem as particularidades das condições médicas envolvidas. Sendo assim, para responder se “os indivíduos com hipossalivação causada por condições sistêmicas apresentam melhora no fluxo salivar a partir da estimulação do fluxo salivar por meios físicos?”, esta revisão de escopo mapeou a literatura quanto aos métodos físicos disponíveis para manejo da hipossalivação em pacientes comprometidos

sistemicamente, bem como realizou avaliação de seus efeitos, vantagens e desvantagens para os diferentes desafios terapêuticos associados aos quadros de hipossalivação. Como objetivo secundário, esperou-se responder se indivíduos com condições diferentes respondem de forma distinta aos tratamentos.

## METODOLOGIA

### *Design do estudo*

A extensão PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) para revisões de escopo foi utilizada como guia para desenvolvimento dessa metodologia (TRICCO et al., 2018).

### *Estratégia de busca*

Uma busca ampla e sistemática da literatura foi realizada, em bases de dados eletrônicas (MEDLINE/PubMed, Biblioteca Cochrane, Scopus, Livivo, Embase, Web of Science), bem como na literatura cinzenta (Google Scholar e ProQuest). Foram escolhidas palavras-chaves e vocabulários controlados gerais (termos MeSH), sem restrição de idioma, ano ou tipo de publicação. Os principais termos incluíam “hyposalivation”, “autoimmune disease”, “salivary stimulation”, “transcutaneous electrical nerve stimulation”, “low-level light therapy”, “acupuncture”, “treatment”. As referências duplicadas foram removidas pelo gerenciador de referências EndNoteWeb (Clarivate Analytics, Mumbai) e, depois, manualmente (apêndice quadro 1).

### *Crítérios de elegibilidade*

Os estudos foram incluídos se satisfizessem os seguintes critérios: estudos clínicos, randomizados ou não, que utilizaram métodos físicos para tratamento de hipossalivação causada por condições sistêmicas ou saudáveis. Os estudos foram excluídos se 1) a população-alvo fosse de indivíduos irradiados, 2) tivessem resultados clínicos sem análise do aumento do fluxo salivar, 3) não fossem pesquisas originais, 4) fossem resumos de conferências ou 4) fossem escritos em alfabeto não latino, sem a possibilidade de tradução por ferramentas de tradução como o Google Translator.

### *Seleção dos manuscritos*

Dois revisores (J.L.M.A.M. e C.P.S.C.) selecionaram independentemente a elegibilidade dos títulos e resumos utilizando a ferramenta de livre acesso Rayyan QCRI® (Qatar Computer Research Institute, Qatar). Em uma segunda fase, os mesmos revisores realizaram

análise dos artigos completos para inclusão usando os mesmos critérios de elegibilidade. Os conflitos foram resolvidos por consenso com um terceiro revisor, especialista no assunto (F.P.S.N.). As listas de referências dos artigos selecionados foram analisadas manualmente para identificar os manuscritos que poderiam ter sido perdidos durante as buscas nos bancos de dados eletrônicos e na literatura cinzenta.

#### *Extração e síntese de dados*

A extração de dados foi realizada pelos dois revisores (J.L.M.A.M. e C.P.S.C) de forma independente e incluiu as seguintes informações: autor (ano), país, desenho do estudo, faixa de idade dos pacientes, causa da hipossalivação, diagnóstico da hipossalivação, tipo de tratamento, fluxo salivar prévio ao tratamento, fluxo salivar após o tratamento. Todos os dados extraídos foram verificados por um terceiro revisor (F.P.S.N.).

## RESULTADOS

#### *Caracterização dos estudos*

Dos 1900 títulos encontrados na busca nas bases de dados eletrônicas, 148 estudos foram incluídos na primeira fase para leitura do texto completo após remoção de duplicatas, dos quais 24 foram incluídos na versão final do estudo (apêndice tabela 1). Desses, 6 eram estudos pilotos ou apresentavam resultados preliminares. Dentre os artigos incluídos, 14 aplicaram métodos físicos de tratamento em indivíduos com hipossalivação causada por doenças ou condições sistêmicas e 10 aplicaram as alternativas de manejo em pessoas saudáveis. A figura 1 apresenta um fluxograma que descreve o processo de seleção dos estudos. Dos estudos incluídos, 12 eram da Índia, 3 do Brasil, 1 da Suíça, 1 da Itália, 1 do Egito, 1 da Croácia, 1 da China, 1 da Suécia e 1 dos Estados Unidos. Um número total de 1262 indivíduos foi avaliado (figura 2).

Apenas 6 eram ensaios clínicos randomizados (ECR), com números amostrais variando de 9 a 33. Destes, os grupos controle consistiam em acupuntura superficial, aplicação de laser com o dispositivo desativado, laser com potência e comprimento de onda diferentes, hiperbolóide (dispositivo mastigatório em silicone) e sem tratamento. Outros 4 estudos eram ensaios clínicos não randomizados, com números amostrais variando de 3 a 38, sendo os grupos paralelos correspondentes a aplicação de outros métodos (como borrifar água), protocolos diferentes (como a variação da frequência do TENS), uso de TENS em saudáveis ou em pacientes sem hipossalivação. A maioria dos estudos incluídos

(N=13) eram ensaios clínicos de braço único e 1 estudo era relato de caso. Dos ECR, 2 avaliaram pacientes em uso de medicamentos, 2 com SS, 1 após tratamento quimioterápico exclusivamente e 1 avaliou pacientes com diferentes condições: doenças cardíacas, hipertensão, pós-menopausa, em uso de medicamentos, causa desconhecida, hipotireoidismo, SS e outras doenças reumáticas. Os demais estudos avaliaram pacientes com hipossalivação causada por diabetes, uso de tabaco, pós-tratamento quimioterápico, uso de medicamentos, pós-hemodiálise, pós-menopausa e SS.

### *Terapias utilizadas para estimulação salivar*

As terapias avaliadas foram o laser de baixa potência (LBP), a estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS), a acupuntura e a eletroacupuntura. Entretanto, houve comparação direta (estudos com pelo menos dois braços paralelos) em apenas 4 estudos. Conforme explicitado nos apêndices gráficos 2, 3 e 4, o laser foi o método selecionado em 3 estudos para ser o tratamento de hipossalivação causada por SS (CAFARO et al., 2015; FIDELIX et al., 2018; SIMÕES et al., 2009) e em 2 para ser utilizado em pacientes em uso de medicamentos (BRZAK et al., 2018; DABIĆ et al., 2016). N=3 estudos aplicaram a acupuntura, sendo que 1 utilizou em saudáveis (DAWIDSON et al., 1997), 1 em pacientes em uso de medicamentos (TERLEVIĆ DABIĆ et al., 2016) e 1 em pacientes com condições variadas (BLOM; DAWIDSON; ANGMAR-MÅNSSON, 1992). A eletroacupuntura também foi utilizada em 1 estudo para pacientes saudáveis (DAWIDSON et al., 1997). Já o TENS foi aplicado em 16 estudos, dos quais os saudáveis foram a amostra de 9 desses estudos (AGGARWAL et al., 2015; BHASIN et al., 2015; CHANDRA et al., 2022; HARGITAI; SHERMAN; STROTHER, 2005; NIMMA et al., 2012; PANDEY; REDDY; WANJARI, 2019; PATTIPATI et al., 2013; RAMESH et al., 2021; SINGH et al., 2015; VILAS; SHASHIKANT; ALI, 2009), 3 em diabéticos (CHANDRA et al., 2022; DYASNOOR; KAMATH; KHADER, 2017; SMRITI. B et al., 2014), 2 em mulheres em pós-menopausa (KONIDENA et al., 2016; SMRITI. B et al., 2014), 2 em pacientes em quimioterapia (AMARAL et al., 2012; CHANDRA et al., 2022) e 1 em hemodiálise (YANG et al., 2022).

### *Efeito quanto ao aumento da salivação por diferentes tratamentos e diferentes condições causadoras da hipossalivação*

Os grupos comparados nos ECR foram laser vs. placebo em pacientes em uso de medicamentos, laser vs. placebo em SS, e TENS vs. placebo em pacientes após quimioterapia, totalizando 171 pacientes. Desses ensaios clínicos, a randomização foi - em geral - pouco descrita



(AMARAL et al., 2012; CAFARO et al., 2015; DABIĆ et al., 2016; FIDELIX et al., 2018). Houve cegamento (FIDELIX et al., 2018) e calibração (CAFARO et al., 2015) dos avaliadores em poucos estudos. Nenhum seguiu o CONSORT. No estudo de BLOM; DAWIDSON; ANGMAR-MÅNSSON, 1992, os indivíduos possuíam hipossalivação causada por condições sistêmicas variadas. O grupo que recebeu acupuntura apresentou taxas de fluxo salivar melhoradas durante e após o tratamento e os resultados persistiram após 12 meses. De mesmo modo, o grupo que recebeu acupuntura superficial (intradérmica), considerada como um placebo, obteve resposta satisfatória no fluxo salivar. Entretanto, essas mudanças desapareceram após o fim do protocolo. No estudo de CAFARO et al., 2015, os pacientes com SS que foram tratados com laser apresentaram aumento do fluxo salivar ao final do protocolo, maior do que o grupo placebo, com estabilidade até o 3º mês de acompanhamento e redução do 3º ao 6º mês. Por outro lado, FIDELIX et al., 2018, que também utilizou laser em SS, não apresentou diferença na salivação dentro dos grupos ou entre os grupos. BRZAK et al., 2018 e DABIĆ et al., 2016 utilizaram laser em pacientes que fazem uso de medicamentos, ambos com resultados positivos. Já AMARAL et al., 2012, ao comparar, basicamente, o tratamento com TENS comparado com um grupo paralelo de estimulação salivar por método mecânico (mastigação de um hiperbolóide de silicone após as refeições) antes e depois do transplante de células-tronco hematopoiéticas, concluiu que o TENS, além de prevenir a redução do fluxo salivar, apresentou tendência de aumento da salivação.

A maioria dos ensaios clínicos não randomizados testaram o efeito do TENS em indivíduos com hipossalivação causada por condições variadas, como diabetes, fumantes, pós-quimioterapia, saudáveis, pós-menopausa e pós-hemodiálise. Para esses estudos, todos os pacientes tiveram o fluxo salivar aumentado, sendo que, dentre os pacientes com hipossalivação, os diabéticos apresentaram melhor resposta ao tratamento (CHANDRA et al., 2022). Dos ensaios de braço único, 12 dos 13 estudos aplicaram TENS. Dentre eles, 9 abordaram o uso desse método para pacientes saudáveis, todos com resultado favorável ao aumento do fluxo salivar. Oito desses estudos foram desenvolvidos na Índia, com números amostrais variando de 50 a 130. Um dos estudos foi realizado nos Estados Unidos, com número amostral de 22 indivíduos.

Com relação ao tipo de condição, considerando todos os tipos de estudos incluídos, os resultados foram mais positivos quando o paciente tinha hipossalivação causada por uso de medicamentos. Apenas 2 estudos não resultaram em aumento do fluxo salivar e ambos associaram tratamento com laser de baixa potência para hipossalivação em indivíduos com SS (FIDELIX et al., 2018; SIMÕES et al., 2009).

### *Tipos de protocolos de tratamento*

No que se refere aos protocolos apresentados pelos estudos, a variação de tempo de aplicação dos métodos, tempo de acompanhamento e dos parâmetros utilizados foi significativamente extensa. Para a acupuntura, BLOM; DAWIDSON; ANGMAR-MÅNSSON, 1992, que apresentou os melhores resultados dentre os estudos que utilizaram esse método, foi o que aplicou as agulhas em mais pontos e por mais tempo, totalizando 12 semanas no total, com aplicação 2 vezes por semana. Para o laser, os pontos de aplicação foram similares entre os estudos, mas o comprimento de onda, a potência do aparelho e a energia total recebida pelos pacientes foi bastante diversificada. Já para o TENS, os estudos que avaliaram os seus efeitos foram, majoritariamente, com ajuste de frequência em 50Hz e duração de pulso variável (além de não ter sido descrita para todos os casos).

Além disso, apenas 4 estudos fizeram acompanhamento da sialometria além da realizada imediatamente após a aplicação do tratamento: BLOM; DAWIDSON; ANGMAR-MÅNSSON, 1992 acompanhou os resultados do tratamento com acupuntura por 3, 6 e 12 meses após o término (maior período entre os estudos), observando persistência dos resultados. CAFARO et al., 2015 prosseguiu a avaliação da sialometria por 30, 90 e 180 dias depois do último dia de tratamento, constatando estabilidade nas respostas até o 3º mês e redução do 3º ao 6º mês. Já BRZAK et al., 2018. e YANG et al., 2022 acompanharam por menos tempo: 10 e 7 dias, respectivamente, após o final do protocolo dos métodos físicos. Em ambos os casos, a salivação permaneceu melhorada.

## DISCUSSÃO

Esta revisão de escopo objetivou mapear os estudos avaliando métodos físicos disponíveis para o manejo da hipossalivação em pacientes comprometidos sistemicamente e saudáveis, além dos seus efeitos, vantagens e desvantagens para os diferentes desafios terapêuticos associados aos quadros de hipossalivação. Até o momento, são escassas as informações sobre como o fluxo salivar de indivíduos com diferentes condições respondem aos tratamentos. Nesse mapeamento da literatura, foi possível identificar que mais da metade dos estudos utilizando esses tratamentos não apresentam grupos paralelos, sejam eles sem tratamento, placebos, padrões-ouro ou controles com outros tipos de tratamentos (medicamentosos, outros métodos físicos, métodos mecânicos, etc). Acreditamos, portanto, que esse é o maior desafio para identificar eficácia dos tratamentos. Novos estudos bem

delineados metodologicamente devem ser realizados antes de qualquer indicação clínica.

Os estudos incluídos nesta revisão associaram os métodos físicos de tratamento da hipossalivação causada por condições muito diversas, além de, normalmente, os pacientes reunirem mais de uma das condições. As principais causas encontradas foram: SS, uso de medicamentos, diabetes, período pós-menopausa e quimioterapia. Nesse sentido, porém, estudos que representam alta qualidade de evidência - ECRs - para avaliar a eficácia da maioria dessas intervenções são limitadas ou de qualidade inferior à ideal. Há um número muito pequeno de estudos com grupo com paralelo, com ou sem tratamento, o que permitiria a comparação entre os grupos intervenção e controle desde o início da intervenção de forma mais efetiva. Por outro lado, a inclusão de todas as formas de ensaios clínicos garante que tudo o que está descrito na literatura foi avaliado.

Poucos ECR explicitaram o processo de randomização, cegamento e calibração dos avaliadores. Tendo em vista que o uso do CONSORT tem sido associado à melhoria da qualidade no relato de ECR (MOHER; JONES; LEPAGE, 2001), o fato de nenhum estudo ter utilizado tal ferramenta pode indicar uma possível baixa qualidade de evidência dos achados. Ademais, o desfecho do estudo pode sofrer influência pelo conhecimento da alocação, o que caracteriza o viés de observação no caso dos estudos sem cegamento.

A obtenção de evidências de eficácia é dificultada, também, por problemas metodológicos como a escolha de um controle nos estudos. A título de exemplo, para o método da acupuntura, 1 estudo usou acupuntura superficial (BLOM; DAWIDSON; ANGMAR-MÅNSSON, 1992) e 1 estudo usou água como grupo comparativo (TERLEVIĆ DABIĆ et al., 2016). Como a acupuntura superficial e o uso de água em borrifador podem ter efeitos específicos próprios, as evidências derivadas de tais estudos podem subestimar os benefícios da acupuntura.

A hipossalivação causada pelo uso de medicamentos foi a condição mais repetida dentro dos estudos, sendo citada por 5 deles. Dois desses estudos utilizaram como método de tratamento a acupuntura (BLOM; DAWIDSON; ANGMAR-MÅNSSON, 1992; TERLEVIĆ DABIĆ et al., 2016), 2 utilizaram laser (BRZAK et al., 2018; DABIĆ et al., 2016) e 1 aplicou TENS (SMRITI. B et al., 2014). Apenas dois estudos descreveram a categoria de fármacos administrados (BLOM; DAWIDSON; ANGMAR-MÅNSSON, 1992; SMRITI. B et al., 2014). Os fármacos anticolinérgicos atuam competindo com a acetilcolina, neurotransmissor responsável pela

estimulação salivar parassimpática e, assim, alteram a sua função secretora. Considerando que os medicamentos não causam danos físicos às células das glândulas salivares e que o processo de ligação aos receptores é simples e reversível, os melhores resultados obtidos por esses pacientes podem ser justificados (SINGH; PAPAS, 2014). Ainda sob essa perspectiva, os estudos não relatam se os indivíduos, ao longo do período de acompanhamento, estavam sob uso contínuo ou se cessaram o uso de tais medicamentos, o que é um fator que dificulta a análise do aumento do fluxo salivar após a estimulação nesses casos.

Por outro lado, os únicos estudos que não apresentaram respostas favoráveis à salivação foram dois em que laser foi associado à SS (FIDELIX et al., 2018; SIMÕES et al., 2009). Isso pode ser explicado pelo complexo mecanismo através do qual a SS afeta o tecido glandular inicia com a agressão ao epitélio glandular (YANNOPOULOS et al., 1992) e evolui gradualmente para a fibrose e destruição completa do parênquima das glândulas (BARRERA et al., 2013). Sendo assim, com o passar do tempo e a progressão da doença, a hipofunção salivar, devido à degeneração das glândulas, se torna cada vez mais intensa e irreversível, dificultando a atuação de qualquer modalidade de tratamento físico para melhoria do fluxo salivar nesses pacientes (HARGITAI; SHERMAN; STROTHER, 2005). Isso fica ainda mais evidente quando se compara os resultados com os estudos utilizando estimulação física das glândulas em indivíduos sistemicamente saudáveis e que, provavelmente, apresentaram hipossalivação (HARGITAI; SHERMAN; STROTHER, 2005).

É válido apontar a importância de aplicação dos métodos mesmo para os dois estudos que não encontraram diferença estatisticamente significativa no fluxo salivar após o tratamento ou nos demais estudos que encontraram aumento, mas sem alcançar níveis normais (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Isso, pois, clinicamente, o papel dos tratamentos no manejo da xerostomia já contribui consideravelmente com a melhora da qualidade de vida. Em SIMÕES et al., 2009, embora o fluxo salivar não tenha aumentado mais do que 10% (de 0,033 para 0,036ml/min), o paciente relatou melhora na lubrificação e na umidade da boca durante a terapia com laser.

No que se refere aos métodos físicos, os estudos usando TENS apresentam números amostrais bastante significativos, com resultados consistentes de aumento do fluxo salivar após estimulação. Entretanto, é um padrão não haver grupo tratamento controle, seja um placebo ou padrão-ouro para afirmar a eficácia do mesmo.

Essa revisão de escopo apresenta algumas limitações. Dentre os estudos incluídos, os indivíduos utilizados nas amostras apresentavam mais de dez condições sistêmicas distintas (apêndice gráfico 1). Porém, para cada uma delas, há um número muito baixo de estudos, não ultrapassando cinco ensaios clínicos incluídos para uma mesma condição (conforme ocorreu com os indivíduos em uso de medicamentos). Do mesmo modo, apenas os indivíduos em uso de medicamentos receberam o tratamento com os três métodos físicos citados. Nenhuma das demais condições recebeu tratamento com os três métodos físicos diferentes (laser, TENS e acupuntura). Esse fator atrapalha fortemente a comparação entre as eficácias dos métodos para uma mesma condição causadora de hipossalivação. Além disso, não foi realizada análise do risco de viés dos estudos incluídos, o que possibilitaria um desfecho mais imparcial e objetivo para a presente revisão.

## CONCLUSÃO

Os resultados dessa revisão de escopo indicam que novos estudos bem delineados metodologicamente devem ser realizados antes de qualquer indicação clínica para manejo de hipossalivação. A grande heterogeneidade entre os protocolos aplicados, o baixo número de estudos disponíveis para as doenças específicas e os diferentes métodos, e o fato de mais da metade dos estudos não apresentarem grupos paralelos limitaram uma avaliação da eficácia dos tratamentos e protocolos. Apesar disso, quanto às condições sistêmicas, indivíduos em uso de medicamentos tiveram melhores respostas das glândulas salivares enquanto os com SS tiveram as piores respostas. Os indivíduos saudáveis também responderam com aumento do fluxo salivar.

## APÊNDICES

Link de acesso aos apêndices:

<https://docs.google.com/document/d/1iZEN-8bNSH1K5r4fOzevbQ0LuFbIOvoK/edit?usp=sharing&oid=106745845282484962072&rtpof=true&sd=true>

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade de Brasília. J.L.M.A.M. e C.P.S.C reconhecem a bolsa do CNPq. Os autores declaram não haver potenciais conflitos de interesse com relação à autoria e/ou publicação deste artigo

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, H. et al. Evaluation of the effect of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on whole salivary flow rate. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 7, n. 1, p. e13–e17, 2015.

AGOSTINI, B. A. et al. How common is dry mouth? Systematic review and meta-regression analysis of prevalence estimates. **Brazilian Dental Journal**, v. 29, n. 6, p. 606–618, 2018.

AMARAL, T. M. P. et al. Effect of salivary stimulation therapies on salivary flow and chemotherapy-induced mucositis: A preliminary study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 113, n. 5, p. 628–637, 2012.

ASSY, Z.; BRAND, H. S. A systematic review of the effects of acupuncture on xerostomia and hyposalivation. p. 1–14, 2018.

BARRERA, M. J. et al. Sjögren's syndrome and the epithelial target: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v. 42, p. 7–18, 2013.

BHASIN, N. et al. A Study on Duration of Effect of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation Therapy on Whole Saliva Flow. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 16, n. 6, p. 479–485, 2015.

BLOM, M.; DAWIDSON, I.; ANGMAR-MÅNSSON, B. The effect of acupuncture on salivary flow rates in patients with xerostomia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 73, n. 3, p. 293–298, 1992.

BOTELHO, J. et al. Perceived xerostomia, stress and periodontal status impact on elderly oral health-related quality of life: Findings from a cross-sectional survey. **BMC Oral Health**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.

BRENNAN, M. T. et al. Treatment of xerostomia: a systematic review of therapeutic trials. **Dental clinics of North America**, v. 46, n. 4, p. 847–856, 2002.

BRZAK, B. L. et al. Different Protocols of Photobiomodulation Therapy of Hyposalivation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n. 2, p. 78–82, 2018.

CAFARO, A. et al. Effect of laser acupuncture on salivary flow rate in patients with Sjögren's syndrome. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 6, p. 1805–1809, 2015.

CAVALCANTE, W. S. et al. Síndrome de Sjögren primária: aspectos relevantes para os dentistas. **Clinical and Laboratorial Research in Dentistry**, p. 1–11, 2018.

CHANDRA, R. et al. Evaluation of the efficacy of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on salivary flow rate in patients with xerostomia

- A case control study. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 11, n. 2, p. 767–771, 2022.

DABIĆ, D. T. et al. The effectiveness of low-level laser therapy in patients with drug-induced hyposalivation: A pilot study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 34, n. 9, p. 389–393, 2016.

DAWIDSON, I. et al. The influence of acupuncture on salivary flow rates in healthy subjects in K<sup>r</sup> « n<sup>^</sup>. **Journal of Oral Rehabilitation**, p. 204–208, 1997.

DHILLON, M. et al. Efficacy of Transcutaneous Electric Nerve Stimulation on Parotid Saliva Flow Rate in Relation to Age and Gender. **Journal of dentistry (Shiraz, Iran)**, v. 17, n. 3, p. 164–70, 2016.

DODDS, M. et al. Saliva A review of its role in maintaining oral health and preventing dental disease. **BDJ Team**, v. 2, n. 1–8, p. 1–3, 2015.

DYASNOOR, S.; KAMATH, S.; KHADER, N. F. A. Effectiveness of Electrostimulation on Whole Salivary Flow Among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **The Permanente journal**, v. 21, p. 1–6, 2017.

ENGER, T. B. et al. Oral distress in primary Sjögren's syndrome: Implications for health-related quality of life. **European Journal of Oral Sciences**, v. 119, n. 6, p. 474–480, 2011.

FIDELIX, T. et al. Low-level laser therapy for xerostomia in primary Sjögren's syndrome: a randomized trial. **Clinical Rheumatology**, v. 37, n. 3, p. 729–736, 2018.

FURNESS, S. et al. Interventions for the management of dry mouth: Non-pharmacological interventions. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2013, n. 9, 2013.

GARLAPATI, K. et al. Meta-analysis on pharmacological therapies in the management of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 41, n. 2, p. 312–318, 2019.

GIL-MONTOYA, J. A. et al. Treatment of xerostomia and hyposalivation in the elderly: A systematic review. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 21, n. 3, p. e355–e366, 2016.

GOLEŽ, A. et al. Effects of low-level light therapy on xerostomia related to hyposalivation: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 2, p. 745–758, 2022.

HARGITAI, I. A.; SHERMAN, R. G.; STROTHER, J. M. The effects of electrostimulation on parotid saliva flow: A pilot study. **Oral Surgery, Oral**



**Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 99, n. 3, p. 316–320, 2005.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. Saliva Review.Pdf. **J Prosthet Dent.**, v. 85, n. 2, p. 162–169, 2001.

IKEBE, K. et al. Impact of dry mouth and hyposalivation on oral health-related quality of life of elderly Japanese. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 103, n. 2, p. 216–222, 2007.

JEDEL, E. Acupuncture in xerostomia - A systematic review. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 32, n. 6, p. 392–396, 2005.

KONIDENA, A. et al. Effect of TENS on stimulation of saliva in postmenopausal women with or without oral dryness – An interventional study. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, p. S44–S50, 2016.

MARQUES, R. C. R. et al. Salivary parameters of adults with Diabetes Mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, 2022.

MERCADANTE, V. et al. Interventions for the management of radiotherapy-induced xerostomia and hyposalivation: A systematic review and meta-analysis. **Oral Oncology**, v. 66, p. 64–74, 2017.

MOHER, D.; JONES, A.; LEPAGE, L. Use of the CONSORT statement and quality of reports of randomized trials. **Journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 15, p. 1992–1995, 2001.

NIKLANDER, S. et al. Risk factors, hyposalivation and impact of xerostomia on oral health-related quality of life. **Brazilian oral research**, v. 31, p. e14, 2017.

NIMMA, V. B. et al. Effects of protocol utilized for collection of whole saliva stimulated by TENS in healthy adult Indians. *Cumhuriyet Dental Journal*, v. 15, n. 3, p. 235–240, 2012.

PANDEY, M.; REDDY, V.; WANJARI, P. Comparative evaluation of citric acid and TENS as means for salivary stimulation in adults: An Invivo study. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, v. 31, n. 1, p. 36–39, 2019.

PATTIPATI, S. et al. Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation induced parotid stimulation on salivary flow. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 4, n. 4, p. 427–431, 2013.

PEDERSEN, A. M. L. et al. Salivary secretion in health and disease. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 45, n. 9, p. 730–746, 2018.

RAMESH, C. et al. Efficacy of transcutaneous electrical nerve stimulation on salivary flow rates in normal healthy adults according to gender and age groups. **Asian Journal of Neurosurgery**, v. 16, n. 4, p. 770, 2021.

SALARI, R.; SALARI, R.; MEDICINE, C. Electronic Physician ( ISSN : 2008-5842 ). **Electronic Physician**, v. 9, n. January, p. 3592–3597, 2017.

SHETAWY, S. S. S. et al. Hyposalivation Response to Low-Level Laser in Diabetic Type 2 Patients. **The Medical Journal of Cairo University**, v. 89, n. 9, p. 1967–1971, 2021.

SIMÕES, A. et al. Laser as a therapy for dry mouth symptoms in a patient with Sjögren's syndrome: A case report. **Special Care in Dentistry**, v. 29, n. 3, p. 134–137, 2009.

SINGH, D. et al. The effects of transcutaneous electric nerve stimulation (TENS) on salivary flow: A study. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, v. 27, n. 1, p. 16–19, 2015.

SINGH, M. L.; PAPAS, A. Oral implications of polypharmacy in the elderly. **Dental Clinics of North America**, v. 58, n. 4, p. 783–796, 2014.

SMRITI, B, D. J. et al. To Evaluate the Effectiveness of Transcutaneous Electric Nerve Stimulation (TENS) in patients with hyposalivation: A Pilot Study. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 13, n. 9, p. 74–77, 2014.

TERLEVIĆ DABIĆ, D. et al. The Effectiveness of Acupuncture in Drug-Induced Hyposalivation. **Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences September – October**, v. 7, n. 2428, p. 2428–2438, 2016.

TRICCO, A. C. et al. PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): Checklist and explanation. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 7, p. 467–473, 2018.

TURNER, M. D. Hyposalivation and Xerostomia. Etiology, Complications, and Medical Management. **Dental Clinics of North America**, v. 60, n. 2, p. 435–443, 2016.

VILAS, S.; SHASHIKANT, M.; ALI, I. Evaluation of the effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on whole saliva flow: A clinical study. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, v. 21, n. 1, p. 7, 2009.

VON BÜLTZINGSLÖWEN, I. et al. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 103, n. SUPPL., p. S57.e1-S57.e15, 2007.

YANNOPOULOS, D. I. et al. Conjunctival epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome inappropriately express major histocompatibility complex molecules, La(SSB) antigen, and heat-shock proteins. **Journal of Clinical Immunology**, v. 12, n. 4, p. 259–265, 199

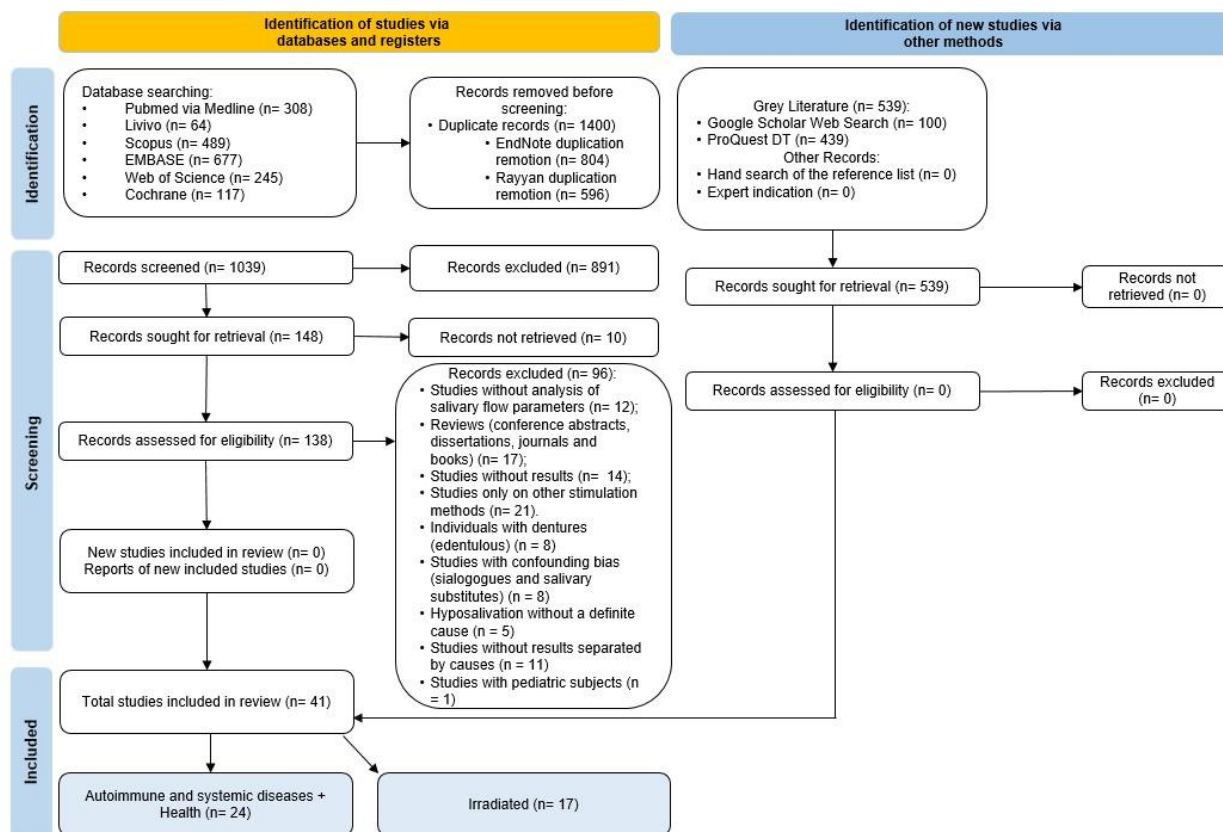


Figura 1. Diagrama de fluxo para seleção de estudos de acordo com as diretrizes PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) para revisões de escopo.

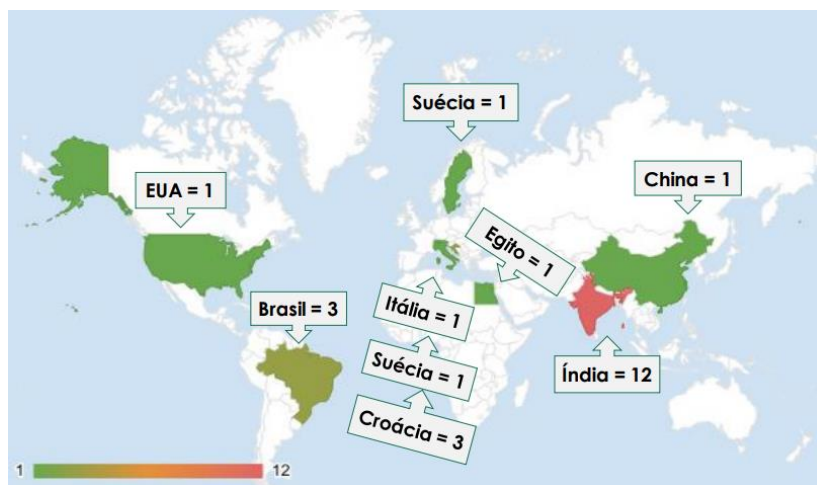


Figura 2. Mapa geográfico indicando a distribuição dos 24 estudos incluídos por país. A escala gradual de cores indica a quantidade de estudos, conforme é apresentado na parte inferior esquerda da figura.

**ANEXO****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Efeito do laser de baixa potência associado ou não ao uso do TENS na estimulação salivar de pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo II : estudo clínico controlado randomizado.

**Pesquisador:** FERNANDA DE PAULA E SILVA NUNES

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 45184721.7.0000.0030

**Instituição Proponente:** Departamento de Odontologia - Faculdade de Ciências da Saúde - UNB

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.748.761

### Apresentação do Projeto:

Conforme documento "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1408218.pdf": "Desenho do Estudo: Intervenção/Experimental"

"Descritores Gerais para as Condições de Saúde:

E11.6 - Diabetes mellitus não-insulino-dependente - com outras complicações especificadas e E10.6 Diabetes mellitus insulino-dependente - com outras complicações especificadas"

"Descritores Específicos para as Condições de Saúde K11.7 Alterações da secreção salivar"

"Natureza da Intervenção:

Dispositivo"

"Descritores da Intervenção Estimulação salivar Fase 1"