

BRUNA BASTOS SILVEIRA DA SILVA

EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NAS CÉLULAS OSTEoblásticas: UM ESTUDO *IN VITRO* SOBRE A ETIOPATOGENIA DA OSTEORRADIONECCROSE

BRASÍLA, DISTRITO FEDERAL

2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BRUNA BASTOS SILVEIRA DA SILVA

**EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NAS CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS: UM
ESTUDO *IN VITRO* SOBRE A ETIOPATOGENIA DA OSTEORRADIONECCROSE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientadora: Eliete Neves da Silva Guerra

BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL

2024

BRUNA BASTOS SILVEIRA DA SILVA

EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NAS CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS: UM ESTUDO *IN VITRO* SOBRE A ETIOPATOGENIA DA OSTEORRADIONECCROSE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Aprovada em 1º de novembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliete Neves Da Silva Guerra (Presidente)

Universidade de Brasília

Prof. Dr. André Caroli Rocha

Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ana Gabriela Costa Normando

Ministério da Saúde

Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende (Suplente)

Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho à Deus, ao meu marido e minha família,
por serem sempre meu sustento e minha fortaleza*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que a cada dia me surpreende com Seu amor e infinita misericórdia. As maravilhas de Deus em minha vida são um testemunho diário de que todos os meus passos são guiados e protegidos por Ele. Sou profundamente grata por tantas bênçãos e percebo Seu cuidado em cada detalhe da minha trajetória. Sei que, por minhas próprias forças, nada disso teria sido possível.

À Nossa Senhora, Mãe de Deus e minha mãe, a quem sou consagrada. Estar sob os cuidados de uma mãe tão doce me permite viver em paz e abandonada à Providência Divina, com a certeza de que minha vida está nas melhores mãos. Em especial, agradeço à Nossa Senhora Três Vezes Admirável de Schoenstatt, o título a quem sou devota desde a infância. Ela atende às minhas súplicas silenciosas e vela por cada um dos meus passos.

Ao meu esposo, Gabriel Póvoa, meu maior incentivador, meu porto seguro e minha fortaleza. Todos os dias, de diversas maneiras, o Gabriel me demonstra que ele vive para dar a vida por mim e por nossa família. Ter um sustento como esse é um conforto imerecido. Quando descobri minha gestação no final do mestrado, tive muito medo de avançar com o doutorado, mas o Gabriel me dá a certeza de que, mesmo não sendo fácil encarar a maternidade durante a pós-graduação, também não será nada impossível. Obrigada por me lembrar todos os dias de que existem coisas que valem a pena, mas que o melhor é o que vale a vida. Eu te amo e te admiro cada dia mais por ser um esposo tão fiel, atencioso e cuidadoso. Reconheço meu privilégio em ter encontrado um homem como você para compartilhar a vida.

Aos meus pais, Bárbara e Aidano, que me ensinam sempre sobre sacrifício e amor. Agradeço muito por sempre me incentivarem tanto. Agradeço por estarem sempre tão atentos às minhas necessidades, meus cansaços e por me sustentarem com seu carinho e com suas orações constantes. Obrigada por serem minha rede de apoio, meus incentivadores e por sempre sonharem meus sonhos junto comigo.

Ao meu irmão, Danilo, que será para sempre o caçula da nossa família e por isso, o meu xodó. Sou grata por apoio incondicional e por nosso companheirismo em todos os momentos da minha vida. Ter um irmão é uma alegria. Não sei quem eu seria sem você.

À minha família, meu lugar de amor e carinho. Em especial, agradeço minha vó Diva, vó Nadir, vô Aidano e minhas tias queridas Márcia e Vitória. Agradeço também aos meus sogros que se tornaram também meus grandes apoiadores, Sílvia, Elói e Abadia, obrigada por me receberem na família desde o início do nosso namoro.

À minha orientadora, professora Eliete Guerra, minha grande inspiração de professora, profissional e mulher. Obrigada por tanto carinho, cuidado e dedicação. Ser sua orientada é um orgulho e um privilégio. Carrego com muito carinho seus ensinamentos. Serei sempre muito grata por todas as oportunidades e por sempre acreditar em mim. Todos os estudantes mereciam uma orientadora tão dedicada e que equilibra tão bem a exigência com a compreensão. Obrigada por tudo.

À minha dupla de pesquisa, Larissa, que esteve do meu lado durante tantos experimentos, que está sempre pronta para ajudar e contribuir. Larissa, você é uma pesquisadora e uma amiga incrível. Sou muito grata por nossa amizade que faz o trabalho ser tão mais leve e divertido. Tenho muito orgulho de poder trabalhar com alguém que tanto admiro. Você é incrível, nunca tenha dúvidas disso.

Ao Laboratório de Histopatologia da UnB e ao meu grupo de pesquisa, Isabella, Juliana, Lídia, Maria Luiza, Mylene, Victor, Vitória e Yuri que são também grandes amigos. Obrigada por tantas reuniões e discussões que me ajudaram a aprimorar esse trabalho. Sou grata pelo companheirismo e amizade de todos, é sempre muito bom estar com aqueles que nos inspiram. Estaremos sempre juntos.

Ao grupo de pesquisa Biodonto da Universidade Católica de Brasília por todo o apoio. Em especial, agradeço à professora Taia que nos cedeu as células SaOS-2 e está sempre à disposição para nos ajudar e discutir nossos achados. Suas contribuições foram essenciais na condução desta pesquisa. Agradeço também à Thais, ao Francisco e ao Danilo, por me receberem no laboratório da UCB, me ensinarem a técnica de ELISA e de mensuração de óxido nítrico e também me auxiliarem com a análise dos dados.

Ao laboratório FARMOL, por me apoiarem para a realização do PCR. Agradeço em especial aos professores Angélica, Bruno, Flora e Luciana.

Aos técnicos da radiologia do HuB, Samuel, Ricardo e Felipe, que foram sempre prestativos e acessíveis para fazer a radiação ionizante nas células. Agradeço por me receberem sempre tão bem e por tentarem me ajudar sendo flexíveis em relação aos horários.

Aos meus amigos de faculdade, Ana Gabriela, Ana Luisa, Bruna Endres, Patrícia e Luana, que mesmo após um ano de formatura continuam presentes na minha vida e tanto me incentivaram. Obrigada pelo suporte e carinho de tantos anos.

Aos meus amigos tão queridos da Paróquia São Judas Tadeu, grupo NATAL, DATING e Campus Fidei, que tanto me dão suporte e carinho. Obrigada por sempre me lembrarem da importância da vida intelectual para a vida religiosa e por me relembrem sempre o fim de último de todas as minhas ações. Obrigada por me sustentarem também com suas orações. Em especial, agradeço aos meus amigos e irmãos de caminhada Wanessa, Ângelo, Mirella e Danilo que são também uma família para mim e me deram a graça de ser madrinha do Bernardo e da Marcella.

À minha amiga de infância, Lorrane, que mesmo morando no Rio de Janeiro, se faz presente na minha vida. Obrigada por sonhar comigo e por estar sempre me apoiando.

A todos os professores e professoras que fizeram parte da minha trajetória profissional e foram minha inspiração. Em especial, às professoras Aline, Ana Carolina, Carla, Cristiane, Eliana, Erica, Maria do Carmo, Nailê, Nilce e Paula e aos professores Rodrigo e Paulo.

Aos meus pacientes que tive a oportunidade de prestar atendimento no CACON, obrigada por inspirarem esse trabalho e por me permitirem aprender tanto com a luta diária de vocês.

À Universidade de Brasília (UnB), ao Hospital Universitário e ao Decanato de Pós-Graduação, agradeço pela oportunidade e pelo privilégio de ser estudante de uma universidade pública de tanta excelência. Agradeço também a tantos funcionários e servidores que tanto trabalham para garantir nosso conforto e nossa educação de qualidade.

Ao Programa de Iniciação Científica (ProIC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) agradeço pelas oportunidades durante a graduação que me inspiraram ao sonho da vida acadêmica. Agradeço também ao CNPq por fomentar esta pesquisa pelo edital Universal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UnB, pela oportunidade, pelas disciplinas multiprofissionais e editais de apoio aos pesquisadores. Agradeço também pela oportunidade de fazer a progressão do mestrado para o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por investirem na pesquisa brasileira e por me contemplarem com a bolsa durante todo o meu mestrado.

A todos que de alguma forma participaram da minha trajetória durante este breve período de mestrado e marcaram minha história. Fica a gratidão e o amor.

“Ao ver-vos ocupados neste complexo e técnico campo de aprendizagem, desejo encorajar-vos a não esquecer nunca o objetivo último e a finalidade principal do vosso estudo, nomeadamente a promoção e a proteção da dignidade da pessoa humana. Trata-se certamente de uma perspectiva profundamente cristã.”

- São João Paulo II

RESUMO

A osteorradionecrose é uma toxicidade tardia da radioterapia do câncer de cabeça e pescoço que é caracterizada por um osso exposto e necrótico em um local previamente irradiado. Muitas hipóteses foram propostas para elucidar a etiopatogênese desta condição, no entanto, o mecanismo preciso permanece pouco compreendido. Com base em modelos teóricos da patogênese da osteorradionecrose, este estudo *in vitro* teve como objetivo estudar os efeitos da radiação ionizante em osteoblastos humanos imortalizados (SaOS-2) e sua resposta celular em co-cultura com fibroblastos gengivais. As células SaOS-2 foram expostas à radiação ionizante e avaliadas quanto à viabilidade celular pelo ensaio de MTT, produção de óxido nítrico (NO) pela mensuração de NO, morfologia celular por imunofluorescência, cicatrização da ferida por ensaio do arranhão e expressão gênica relacionada à via PI3K-AKT-mTOR pela reação em cadeia da polimerase quantitativa/em tempo real (RT-qPCR). Além disso, as células SaOS-2 foram co-cultivadas com fibroblastos gengivais humanos usando membranas transwell e submetidas à mesma irradiação. As avaliações subsequentes incluíram viabilidade celular, mensuração de NO e análise da expressão gênica. Após 24 horas, a dose de 16 Gray foi citotóxica para as células e reduziu a viabilidade celular em 40%. Além disso, houve um aumento na produção de NO em 14%, confirmando o estado inflamatório induzido pela radiação. Também foi observada nesta mesma dose uma alteração morfológica, houve um aumento da área nuclear em relação ao citoplasma e também um atraso no fechamento da ferida. Corroborando com os resultados de redução da viabilidade, foi encontrada uma tendência à regulação negativa de genes relacionados à via PI3K-AKT-mTOR. Em condições de co-cultura, a mesma dose de 16 Gray não afetou a viabilidade celular, mas aumentou a produção de NO e regulou positivamente os marcadores da via PI3K-AKT-mTOR. Os achados deste estudo demonstram que a irradiação ionizante exerce efeitos metabólicos e morfológicos nas células osteoblásticas, fornecendo percepções *in vitro* sobre a etiopatogenia da osteorradionecrose e um potencial modelo para abordagens terapêuticas.

Palavras-Chave: Osteorradionecrose; In Vitro; Osteoblastos; Radiação Ionizante; Neoplasias de Cabeça e Pescoço.

ABSTRACT

Osteoradionecrosis is a late toxicity of radiotherapy for head and neck cancer, characterized by exposed necrotic bone in a previously irradiated site. Numerous hypotheses have been proposed to elucidate the etiopathogenesis of this condition; however, the precise mechanism remains poorly understood. Based on theoretical models of osteoradionecrosis pathogenesis, this *in vitro* study aimed to investigate the effects of ionizing radiation on immortalized human osteoblasts (SaOS-2) and their cellular response in co-culture with gingival fibroblasts. SaOS-2 cells were exposed to ionizing radiation and assessed for cell viability via MTT assay, nitric oxide (NO) production by NO measurement, cell morphology through immunofluorescence, wound healing by scratch assay, and gene expression related to the PI3K-AKT-mTOR pathway via quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). In addition, SaOS-2 cells were co-cultured with human gingival fibroblasts using transwell membranes and subjected to the same irradiation protocol. Subsequent assessments included cell viability, NO measurement, and gene expression analysis. After 24 hours, the 16 Gray dose was cytotoxic to the cells, reducing cell viability by 40%. Furthermore, NO production increased by 14%, confirming the radiation-induced inflammatory state. Morphological changes were also observed at this dose, with an increase in the nuclear area relative to the cytoplasm, along with delayed wound closure. Consistent with the reduction in viability, a trend toward downregulation of genes related to the PI3K-AKT-mTOR pathway was found. In co-culture conditions, the same 16 Gray dose did not affect cell viability but increased NO production and upregulated PI3K-AKT-mTOR pathway markers. The findings of this study demonstrate that ionizing radiation exerts metabolic and morphological effects on osteoblastic cells, providing *in vitro* insights into the etiopathogenesis of osteoradionecrosis and a potential model for therapeutic approaches.

Keywords: Osteoradionecrosis; In Vitro; Osteoblasts; Ionizing Radiation; Head and Neck Neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

Figuras da dissertação:

Figura 1: Apresentação clínica da osteorradição no rebordo alveolar direito do osso maxilar, evidenciando exposição óssea e secreção purulenta. Imagem de arquivo pessoal de paciente atendido na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) do HuB.

Figura 2: Resumo esquemático das principais teorias da patogênese da osteorradição baseado na teoria de Marx (1983) e Delanian & Lefaix (2004). Figura criada com BioRender.com.

Figura 3: Fluxograma metodológico.

Figuras do manuscrito:

Figure 1: SaOS-2 viability (A) and NO production (B) after ionizing radiation. SaOS-2 viability (C) and NO production (D) after ionizing radiation and bacterial stimuli (10µg/mL of lipopolysaccharide and 5µg/mL of *Porphyromonas gingivalis*). **Samples:** N=9 for all conditions. **Statistical analysis:** (A) *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; (B) *p<0.05, **p<0.01, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; (C) #p<0.05, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test; (D) #p<0.05, ### p<0.001, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test.

Figure 2: Immunofluorescence in SaOS-2. A) Qualitative effects of ionizing radiation (40x). Scale: 20 µm. B and C) Area of the nucleus and cytoplasm for the expression of DAPI and Phalloidin. **Samples:** N control=25, n 16 Gy=23 and n 20 Gy=20. **Statistical analysis:** B) **** p<0.0001, comparing DAPI and Phalloidin - Mann Whitney test; C) ## p<0.01, ##### p<0.0001, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test.

Figure 3: Wound closure in SaOS-2 after ionizing radiation. A) Microphotograph images 40x. Scale: 100 μm . B) Relative area after 6, 12 and 24h. C) Relative area after 24h. **Samples:** N=15, for all conditions. **Statistical analysis:** C) * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA.

Figure 4: SaOS-2 responses to the PI3K pathway modulation after ionizing radiation with 16 Gray in monoculture and co-culture conditions. **Samples:** N=3 for all conditions. **Statistical analysis:** * $p > 0.05$, experimental dose compared to control - Mann-Whitney test. Created with BioRender.com and PowerPoint.

Figure 5: SaOS-2 viability (A) and NO production (B) after ionizing radiation in co-culture with gingival fibroblast. SaOS-2 viability (C) and NO production (D) after ionizing radiation and bacterial stimuli (10 $\mu\text{g/mL}$ of LPS and 5 $\mu\text{g/mL}$ of Pg) in co-culture with fibroblasts. **Samples:** N=9 for all conditions. **Statistical analysis:** (A) **** $p < 0.0001$, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; (B) #### $p < 0.001$, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test; (C) *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; (D) ** $p < 0.01$, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA.

Figure 6: Theoretical models of osteoradionecrosis and laboratory models proposed by this study with the effects of ionizing radiation. Created with BioRender.com.

Figure Appendix 1: SaOS-2 viability by the MTT assay after induction with 16 and 20 Gray of ionizing radiation after 48 (A) and 72 (B) hours. **Samples:** N=9 for all conditions. **Statistical analysis:** A) $p > 0.05$, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; B) #### $p < 0.001$, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test.

Figure Appendix 2: Relative expression of PI3K-AKT-mTOR pathway by RT-qPCR in SaOS-2 cells following 24 hours of exposure to ionizing radiation in mono or co-culture with gingival

fibroblasts submitted to 16 Gray. Samples: N=3, for all conditions. Statistical analysis: $p > 0.05$, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA.

LISTA DE TABELAS

Tabelas da dissertação:

Tabela 1 - Subsítios anatômicos de neoplasias de cabeça e pescoço de acordo com o sítio principal. Tabela traduzida e adaptada de Gormley et al., 2022

Tabela 2 – Sistema de classificação e estadiamento clínico da osteorradioneecrose proposto por He et al. (2015)

Tabela 3 – Recomendações para a prevenção da ORN antes do início da radioterapia de cabeça e pescoço. Tabela adaptada do guideline proposto pela ISOO-MASCC e ASCO (Peterson et al., 2024).

Tabela 4 – Recomendações para a prevenção da ORN após a radioterapia de cabeça e pescoço. Tabela adaptada do guideline proposto pela ISOO-MASCC e ASCO (Peterson et al., 2024).

Tabela 5 - Sequências de primers usadas nos ensaios de RT-qPCR.

Tabelas do manuscrito:

Table Appendix 1: The Primers' sequences used in RT-qPCR.

Table Appendix 2: Descriptive analyses of RT-qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT - Protein B kinase (proteína B quinase)

AP-1 - Proteína ativadora-1

ASCO - Sociedade Americana de Oncologia Clínica

CCP - Câncer de cabeça e pescoço

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio eagle modificado por Dulbecco)

DP - Desvio padrão

FG - Cultura primária de fibroblastos gengivais humanos

Gy - Gray

HPV - Vírus do papiloma humano

IL1 - Interleucina-1

IL6 - Interleucina-6

IQR - Intervalo interquartile (Interquartile range)

ISOO-MASCC - Sociedade Internacional de Oncologia Oral - Associação Multinacional para Cuidados de Suporte em Câncer

LPS - Lipopolissacarídeos

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

mTOR - Mammalian target of rapamycin

NF- κ B - Necrosis factor κ B (fator nuclear kappa B)

NO - Óxido nítrico

ORN - Osteorradiocrose

PBMT - Fotobiomodulação

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PIBIC - Programa de Iniciação Científica

PIK3CA - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PI3K - Phosphoinositide 3-kinases

PTEN - Phosphatase and tensin homolog

PPGCS - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Pg - Extrato proteico de *Porphyromonas gingivalis*

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa/em tempo real

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SD - Standard deviation

TCC - Trabalho de Conclusão de Curso

TGF- β - Transforming growth factor β

TNF-1 - Tumor necrosis factor-1

UNACON - Unidade de Alta Complexidade em Oncologia

UnB - Universidade de Brasília

β -ACTIN - Beta-actin

SUMÁRIO

PREFÁCIO	16
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Osteorradionecrose.....	20
1.1.1. Estratégias terapêuticas para o manejo da osteorradionecrose.....	24
1.1.2. Cultura celular para o estudo da ORN.....	29
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MÉTODOS	31
3.1. Fase 1: Estabelecimento de um modelo <i>in vitro</i> de osteorradionecrose.....	31
3.1.1. Cultura celular	31
3.1.2. Indução do modelo de osteorradionecrose em monocultura de SaOS-2	32
3.1.3. Avaliação do modelo de osteorradionecrose em monocultura de SaOS-2	32
3.1.3. Indução do modelo de osteorradionecrose em co-cultura de SaOS-2/FG.....	36
3.1.4. Análise estatística	36
4. CAPÍTULO 1: Manuscrito	37
ABSTRACT.....	37
INTRODUCTION.....	38
MATERIALS AND METHODS.....	39
RESULTS.....	43
DISCUSSION	49
CONCLUSION	53
REFERENCES.....	55
SUPPLEMENTARY MATERIAL	60
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6. REFERÊNCIAS (introdução e métodos).....	67
7. ANEXOS	74

PREFÁCIO

Nas últimas décadas, a área da saúde tem avançado de forma significativa na busca de novos tratamentos para o câncer. No entanto, a radioterapia continua a ser a principal forma de tratamento para pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Porém, sabe-se que a radiação ionizante tem toxicidades agudas e crônicas. Dentre as possíveis alterações, a osteorradionecrose é um efeito tardio caracterizada como uma complicação grave que impacta negativamente na qualidade de vida do paciente. Existem hoje possíveis tratamentos a serem utilizados, mas não há uma definição na literatura de um tratamento ideal.

Este trabalho faz parte do projeto “Modulação do processo de reparo em modelos pré-clínicos de osteorradionecrose” que foi contemplado pelo Projeto Universal do CNPq em 2021. Sob a orientação da professora Eliete Guerra, o projeto foi idealizado durante o meu período de graduação em Odontologia e tive a oportunidade de contribuir desde o início do desenvolvimento da proposta do projeto. Trata-se de um projeto com duas etapas, uma etapa *in vitro* utilizando cultura de células humanas imortalizadas osteoblasto-like (SaOS-2) e uma etapa *in vivo* usando um modelo animal de osteorradionecrose. A primeira etapa foi também dividida em duas fases, a primeira com o objetivo de estabelecer um modelo *in vitro* de osteorradionecrose utilizando as células SaOS-2. Após o estabelecimento deste modelo, na segunda etapa o objetivo será avaliar a modulação do processo de reparo utilizando curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação, analisando a morfologia, a viabilidade e migração celular, produção de células-tronco progenitoras, bem como a expressão gênica de citocinas inflamatórias e biomarcadores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR.

Inicialmente, foram realizados alguns experimentos pilotos, estes trabalhos foram desenvolvidos como meu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) e me permitiu participar do Programa de Iniciação Científica (PIBIC) 2022/2023 como bolsista CNPq. Sendo assim, comecei a trabalhar com a equipe do Laboratório de Histopatologia Oral da Universidade de Brasília (UnB) em 2021. A partir desse período, tive a oportunidade de aprender sobre cultura celular e entender mais a importância da pesquisa básica. Esse trabalho não teria sido possível sem o apoio de todo o meu grupo de pesquisa, que auxiliaram na execução dos experimentos, na análise de dados e na discussão dos achados. Em 2023, após finalizar a graduação, iniciei o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) como bolsista CAPES. Pude me dedicar ainda mais aos experimentos e finalizar a fase 1 da parte *in vitro* deste

projeto. Em 2024, por conta da finalização da fase 1 e o aceite da publicação de um dos meus trabalhos desenvolvidos ainda durante a graduação, tive a oportunidade de solicitar uma progressão do curso de mestrado para o doutorado. Dessa forma, o objetivo é desenvolver a fase 2 da etapa *in vitro* do projeto como pesquisadora em nível de doutorado do PPGCS.

Sendo assim, esta dissertação de mestrado foi estruturada, contendo: Introdução, Objetivos, Materiais e métodos, Capítulo 1, Considerações finais, Referências e anexos. O capítulo apresentado é o manuscrito final que resume nossos principais achados durante a fase 1 do projeto. De acordo com as duas principais teorias da patogênese da osteorradiocrose, foram propostos dois modelos experimentais: uma monocultura de SaOS-2 e uma co-cultura de SaOS-2 e fibroblastos gengivais empregando membranas Transwell®. Este artigo está em processo de revisão na revista *Archives of Oral Biology* (Qualis A1 CAPES e fator de impacto = 2.2). Nos anexos, encontram-se: a aprovação no comitê de ética em pesquisa, demais artigos aceitos e em preparação durante o mestrado.

Dessa forma, este é um projeto ainda em andamento. Espero que possamos progredir muito no nosso conhecimento e explorar as diversas possibilidades para os próximos anos, mas com o objetivo principal de entender mais a modulação do processo de reparo da osteorradiocrose e oferecer alternativas clínicas viáveis para melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Este trabalho é dedicado a todos os pacientes com câncer de cabeça e pescoço que me deixaram marcas profundas quando me permitiram atendê-los no projeto de extensão CACON, me ensinando sobre força, esperança e fé com o testemunho das suas vidas e das suas batalhas. Que os resultados aqui apresentados possam ser explorados e abrir novos horizontes para o aprimoramento do manejo da osteorradiocrose.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é um grupo heterogêneo de neoplasias malignas que afetam diversas regiões, como cavidade oral e lábios, orofaringe, nasofaringe, laringe, hipofaringe e seios paranasais (Rahman et al., 2020). Na Tabela 1, é possível observar os subsítios anatômicos de cabeça e pescoço classificados por sítio principal, conforme adaptação de Gormley et al. (2022). Em 2020, o CCP apresentou aproximadamente 2.276.215 novos casos, o que destaca sua relevância global em termos de saúde pública (Sung et al., 2021). Os principais fatores de risco incluem o tabagismo, isoladamente ou em combinação com o consumo de álcool, o hábito de mascar betel (especialmente em populações do Sudeste Asiático) e a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) no caso do câncer orofaríngeo (Gormley et al., 2022). Embora a biologia molecular dessas neoplasias ainda não seja completamente compreendida, sabe-se que a sua formação está associada à desregulação de processos metabólicos, causada por mutações genéticas induzidas por agentes carcinógenos. Entre os principais fatores de risco, o tabagismo destaca-se como um fator causal primário, uma vez que expõe o organismo a uma variedade de carcinógenos (Szyfter, 2021). Cerca de 90% dos cânceres de cabeça e pescoço são carcinomas de células escamosas, originados do revestimento epitelial da cavidade oral, faringe e laringe (Gormley et al., 2022). Dentre os principais genes frequentemente mutados nesses carcinomas, destacam-se os genes PIK3CA, BRCA1 e BRCA2 (Borkowska et al. 2021).

Tabela 1 - Subsítios anatômicos de neoplasias de cabeça e pescoço de acordo com o sítio principal. Tabela traduzida e adaptada de Gormley et al., 2022 (continua).

Sítio principal

Neoplasias malignas do lábio

Neoplasia maligna da base da língua

Neoplasia maligna de outra parte não especificada da língua

Neoplasia maligna da gengiva

Neoplasia maligna do assoalho da boca

Neoplasia maligna do palato

Neoplasia maligna de outra parte não especificada da boca

Neoplasia maligna da glândula parótida

Neoplasia maligna de outra glândula salivar maior não especificada

Continua na próxima página

Tabela 1 - Subsítios anatômicos de cabeça e pescoço de acordo com o sítio principal. Tabela traduzida e adaptada de Gormley et al., 2022 (conclusão).

Neoplasia maligna da amígdala
Neoplasia maligna da orofaringe
Neoplasia maligna da nasofaringe
Neoplasia maligna do seio piriforme
Neoplasia maligna da hipofaringe
Neoplasia maligna de outras partes mal definidas no lábio, cavidade oral e faringe
Neoplasia maligna da cavidade nasal e ouvido médio
Neoplasia maligna dos seios acessórios
Neoplasia maligna da laringe
Neoplasia maligna de outros locais e de locais mal definidos

A radioterapia é um tratamento importante e frequentemente utilizado para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço. Esta modalidade de tratamento é baseada no uso de altas doses de energia utilizando raios ou substâncias radioativas para danificar e interromper o ciclo celular das células tumorais (Gianfaldonil et al., 2017). Na radioterapia de feixe são empregados fótons de alta energia (6–25 MV) que simultaneamente depositam energia no tecido em profundidade e protegem a pele da exposição à radiação ionizante. As doses de radioterapia podem variar de 8 a 30 Gray (Gy), e podem ser administradas em frações ou aplicadas em dose única (Allen, Her & Jaffray, 2017). O método mais convencional é o modo fracionado, no qual o paciente recebe 2 Gy por fração durante cinco dias por semana em um período de cinco a sete semanas. No entanto, com os avanços na radiobiologia, é possível a administração da radiação com maior precisão e por isso, está crescendo o uso de doses mais altas por fração administrada durante um período mais curto (McBride & Schae, 2020). Dependendo do estágio, a terapia com radiação ionizante pode ser usada de forma isolada e é efetiva no controle da doença (Allen, Her & Jaffray, 2017). Porém, em alguns casos, é necessária a associação da radioterapia com a cirurgia ou em associação com a quimioterapia (Alterio et al., 2019). Atualmente, por conta dos avanços terapêuticos, como as cirurgias minimamente invasivas que preservam mais a função tecidual, os avanços da radioterapia e as abordagens multimodais, houve um aumento da preservação da função e uma redução da morbidade e da mortalidade (Chow, 2020).

O objetivo principal da radioterapia é o controle local do tumor. Porém, há efeitos adversos nos tecidos normais circundantes. A lesão ao tecido normal acontece por mecanismos

moleculares complexos que envolvem estresse oxidativo, desregulação do processo inflamatório, senescência celular e ativação de citocinas pró-inflamatórias e profibrogênicas (Citrin & Mitchell, 2017). A toxicidade decorrente da radioterapia é caracterizada por efeitos adversos ou complicações que surgem após a exposição à radiação, podendo envolver alterações nos tecidos saudáveis, tanto temporárias quanto permanentes (Alfouzan, 2021). No geral, as toxicidades agudas ocorrem próximas ao início do tratamento e são transitórias (Guo et al. 2015). Na mucosa oral e na pele, a alteração aguda inclui eritema local, inflamação, descamação, formação de úlceras, hipersensibilidade, secreção de prurido e dor (Dörr et al., 2002). As principais toxicidades agudas incluem mucosite, dermatite, disfagia, odinofagia, perda de paladar e rouquidão (Alfouzan, 2021). Dentre essas, a mucosite oral é uma complicação frequente e muito sintomática, que pode prejudicar gravemente a função e a qualidade de vida do paciente. Além disso, em alguns casos, pode estar relacionada a maior risco de mortalidade ou atraso do tratamento por reduzir a tolerância do paciente a terapia (Elad et al., 2022). Por outro lado, as toxicidades tardias são mais persistentes e envolvem processos inflamatórios crônicos, alterações vasculares, fibrose e atrofia (Guo et al. 2015). Os processos crônicos podem incluir a osteorradionecrose, xerostomia, fibrose subcutânea, trismo, disfunção tireoidiana, perda auditiva neurossensorial e estenose faríngea ou orofaríngea (Alfouzan, 2021). Dentre as toxicidades tardias, a osteorradionecrose (ORN) é considerada uma complicação grave (Chronopoulos et al., 2017).

1.1.Osteorradionecrose

Na radioterapia de cânceres de cabeça e pescoço, a proximidade de estruturas anatômicas essenciais aumenta o risco de toxicidade. Embora a mandíbula seja relativamente resistente à radiação, é o osso craniofacial mais frequentemente associado à osteorradionecrose, especialmente em doses superiores a 60 Gy (Girardi et al., 2022; Nabil & Samman, 2010). O primeiro termo utilizado para descrever a osteorradionecrose foi "osteíte de radiação", proposto por Ewing em 1926 para caracterizar as alterações ósseas após a radioterapia (Ewing, 1926). Ao longo dos anos, diversos termos foram adotados para nomear essas modificações, incluindo radio-osteonecrose, osteomielite por radiação, osteomielite do osso irradiado, osteonecrose, radio-osteomielite, osteorradionecrose séptica, osteonecrose pós-radioterapia, osteíte de radiação, osteorradionecrose e necrose óssea avascular (Chronopoulos et al., 2017; Iqdal & Kysas; 2020). No entanto, conforme a literatura publicada nos últimos 15 anos, a ORN dos maxilares é definida como a presença de osso irradiado exposto que não cicatriza dentro de um

período de três a seis meses, sem evidências de tumor persistente ou recorrente (Chronopoulos et al., 2017).

A incidência média da ORN varia entre 2% e 23%, com uma redução observada nos últimos anos devido à introdução de tecnologias modernas de radioterapia e à melhoria nos cuidados de saúde bucal (Naseer, Goode & Doyle, 2024). Diversas variáveis têm sido associadas ao desenvolvimento da ORN, incluindo tabagismo, condições de higiene bucal, consumo de álcool, múltiplas comorbidades e fatores relacionados ao tratamento. Entre estes fatores, destacam-se as extrações dentárias e sua relação temporal com os protocolos de radioterapia, além de correlações dose-volume envolvendo a mandíbula irradiada (Aarup-Kristensen et al., 2019). Uma revisão sistemática identificou um risco geral de 2% para o desenvolvimento de osteorradionecrose em pacientes submetidos à radioterapia para câncer de cabeça e pescoço. No entanto, esse risco é significativamente maior em subpopulações específicas, como em pacientes que passam por extração dentária após a irradiação, com uma taxa de aproximadamente 7% (Nabil & Samman, 2010).

Clinicamente, a osteorradionecrose é caracterizada pela presença de osso necrótico exposto em uma área previamente irradiada, que não apresenta cicatrização após três a seis meses (Chronopoulos et al., 2017; Frankart et al., 2021). A figura 1 exibe uma imagem clínica, ilustrando a exposição óssea característica da ORN. Pacientes com ORN podem sofrer de dor persistente, trismo, mau odor, redução na capacidade de regeneração tecidual e, nos casos mais graves, podem desenvolver fístulas orocutâneas e fraturas patológicas (Iqdal & Kysas; 2020). Além disso, é comum que enfrentem deficiências nutricionais, alterações significativas na autoimagem, infecções recorrentes e dependência de opióides (Iqdal & Kysas; 2020). Consequentemente, o quadro debilitante da ORN prejudica profundamente a qualidade de vida dos pacientes, exigindo a adoção de múltiplas abordagens terapêuticas para o tratamento eficaz (Raggio & Winters, 2018). É importante ressaltar também que não se recomenda a biópsia para o diagnóstico da ORN. A excisão tecidual pode gerar a progressão da doença e por isso o diagnóstico baseia-se na avaliação clínica e radiográfica (Peterson et al., 2024). Além disso, há divergências quanto a relação da sequência temporal ou causal entre a presença de lesões características, como osso desvitalizado ou desvascularizado, e a manifestação clínica evidente, como afinamento cortical, fratura mandibular ou ulceração da mucosa. A incerteza também envolve a consideração de outros critérios, como a possibilidade de infecção ou malignidade secundária. Isso implica que, em alguns casos, pacientes podem apresentar alterações vasculares ou na medula óssea, detectáveis por exames como tomografia computadorizada ou

ressonância magnética, meses ou até anos antes da manifestação clínica evidente da osteorradição (Peterson et al., 2024).



Figura 1: Apresentação clínica da osteorradição no rebordo alveolar direito do osso maxilar, evidenciando exposição óssea e secreção purulenta. Imagem de arquivo pessoal de paciente atendido na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) do HuB.

Desde 1985, várias classificações foram sugeridas para o estadiamento da ORN. A primeira proposta de estadiamento da ORN foi desenvolvida por Marx, em 1985, que baseou seu sistema na necessidade de intervenções para promover o fechamento da lesão (Marx, 1985). Ao longo dos anos, as classificações evoluíram para abordagens mais clínicas, descrevendo detalhadamente as características da lesão, bem como os sinais e sintomas associados (Lyons et al., 2014). Em 2015, He et al. propuseram um novo sistema baseado em um estudo retrospectivo com 99 pacientes acometidos por ORN, revisando as metodologias dos sistemas anteriores. A classificação proposta por He et al. (2015) está detalhada na Tabela 2. Porém, o sistema de classificação mais recente para osteorradição proposto por Watson et al., 2024 é mais objetivo, baseando-se exclusivamente na extensão vertical da necrose óssea e na

presença ou ausência de exposição óssea ou fistula. Esse modelo facilita a avaliação da gravidade da ORN, auxiliando na escolha do tratamento adequado (Watson et al., 2024). As lesões podem ser descritas como áreas radiográficas líticas, escleróticas ou mistas do osso, com ou sem exposição visível, e o osso pode ser acessível por sondagem através de uma bolsa periodontal ou fistula, ocorrendo em regiões previamente irradiadas (Peterson et al., 2024).

Tabela 2 – Sistema de classificação e estadiamento clínico da osteorradição proposta por He et al. (2015)

Estágio	Descrição
Estágio 0	
	B0S0: Sem sinais evidentes ou apenas a presença de áreas osteolíticas na radiografia; contudo, o paciente apresenta sintomas característicos da osteorradição, como exposição óssea ou dor.
Estágio I	
	B1S0: A lesão apresenta diâmetro máximo <2 cm na radiografia, sem defeitos na mucosa ou na pele.
	B1S1: A lesão apresenta diâmetro máximo <2 cm na radiografia, com defeito na mucosa intraoral ou fistula cutânea externa, de forma isolada.
	B1S2: A lesão apresenta diâmetro máximo <2 cm na radiografia, com defeito que atravessa completamente de ponta a ponta.
Estágio II	
	B2S0: A lesão apresenta diâmetro máximo >2 cm na radiografia, sem defeitos na mucosa ou na pele.
	B2S1: A lesão apresenta diâmetro máximo >2 cm na radiografia, com defeito na mucosa intraoral ou fistula cutânea externa, de forma isolada.
	B2S2: A lesão apresenta diâmetro máximo >2 cm na radiografia, com defeito que atravessa a cortical óssea completamente na área afetada.
Estágio III	
	B3S0: A radiografia revela uma fratura patológica, sem defeitos na mucosa ou na pele.
	B3S1: A radiografia revela uma fratura patológica, com defeito na mucosa intraoral ou fistula cutânea externa, de forma isolada.
	B3S2: A radiografia revela uma fratura patológica, com defeito que atravessa completamente a área afetada.

Historicamente, acreditava-se que a patogênese da ORN era consequência de trauma e infecção após a radioterapia. No entanto, em 1983, Marx propôs um novo modelo que redefiniu esse conceito, sugerindo que a causa primária da necrose tecidual é a radiação ionizante, com a infecção ocorrendo posteriormente devido à colonização de microrganismos na área lesada (Marx, 1983). A radioterapia compromete a vascularização ao destruir vasos sanguíneos, resultando em necrose tecidual por isquemia e hipóxia (Leonetti et al., 2020). Esse conceito vascular é corroborado clinicamente, já que a mandíbula, por ser um osso menos vascularizado, apresenta maior incidência de ORN (Frankart et al., 2021). Além disso, a radiação ionizante pode desregular a via de sinalização PI3K-PTEN-AKT-mTOR, ativando a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA e proteínas apoptóticas associadas, comprometendo o reparo celular e os mecanismos de apoptose (Guo et al., 2015). Outro efeito da radioterapia é a indução de fibrose, levando à atrofia tecidual (Iqdal, Kysas, 2020). Nesse contexto, a radiação ionizante promove estresse oxidativo, inflamação precoce, fibrose pela desregulação dos fibroblastos e impede a adequada remodelação óssea (Delanian & Lefaix, 2004). As duas principais teorias estão esquematizadas na figura 2.

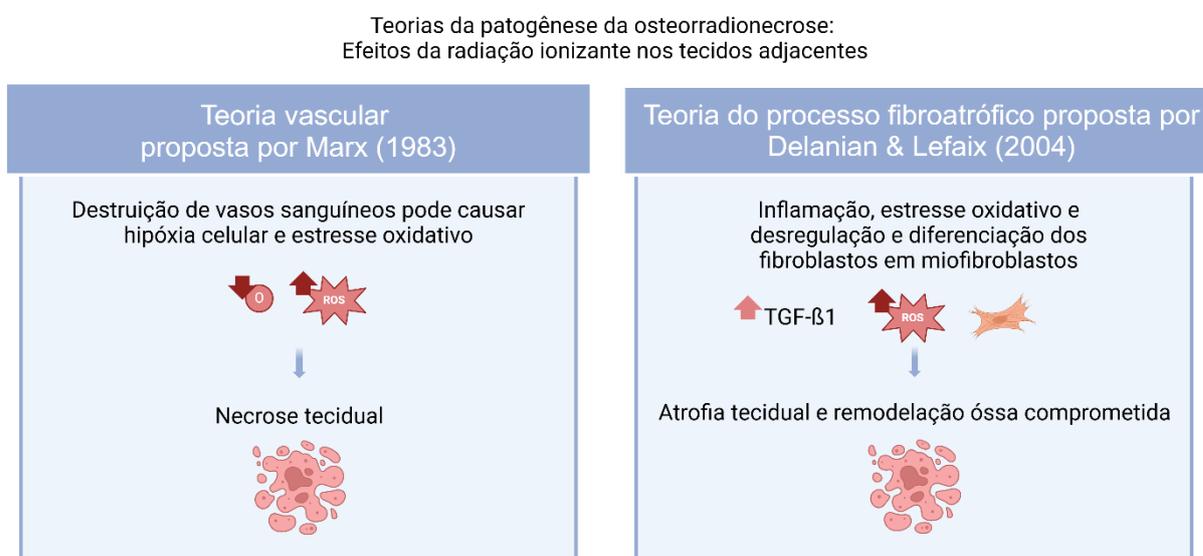


Figura 2: Resumo esquemático das principais teorias da patogênese da osteorradionecrose baseado na teoria de Marx (1983) e Delanian & Lefaix (2004). Figura criada com BioRender.com.

1.1.1. Estratégias terapêuticas para o tratamento da osteorradionecrose

Atualmente, não existe um tratamento ideal estabelecido na literatura, nem diretrizes consensuais sobre a melhor abordagem terapêutica para a ORN. A Sociedade Internacional de Oncologia Oral-Associação Multinacional para Cuidados de Suporte em Câncer (ISOO-

MASCC) e a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) convocaram um painel de especialistas multidisciplinar para a criação de um guia para o tratamento e prevenção da ORN. No entanto, o grupo considerou as evidências disponíveis como limitadas, e, por esse motivo, a diretriz foi elaborada com base apenas em um consenso informal (Peterson et al., 2024). As recomendações em relação à prevenção antes e após a radioterapia estão relacionadas nas tabelas 3 e 4. Após o início da condição, diversas intervenções podem ser consideradas, dependendo da gravidade da necrose tecidual, visando melhorar os resultados clínicos. De modo geral, as opções de tratamento podem ser classificadas em intervenções não cirúrgicas e cirúrgicas. O manejo conservador inclui tratamentos não invasivos, como a oxigenoterapia hiperbárica e a associação de Pentoxifilina com tocoferol, antibióticos e prednisolona. Porém, ambas as terapias possuem baixa força de recomendação e qualidade de evidência moderada a fraca (Peterson et al., 2024). No entanto, em casos de lesões mais avançadas, o tratamento cirúrgico, envolvendo o debridamento do tecido necrótico e a reconstrução óssea, pode ser a opção mais indicada (De Felice et al., 2020; Iqdal, Kysas; 2020).

Tabela 3 – Recomendações para a prevenção da ORN antes do início da radioterapia de cabeça e pescoço. Tabela adaptada do guideline proposto pela ISOO-MASCC e ASCO (Peterson et al., 2024). (Continua).

Recomendação	Qualidade da evidência	Força da recomendação
A cobertura completa do tumor na área irradiada não deve ser comprometida para reduzir a exposição do osso à radiação.	Moderada	Forte
Técnicas avançadas de planejamento radioterápico devem ser utilizadas para minimizar intencionalmente a dose de radiação na mandíbula, sempre que possível.	Moderada	Forte
Deve-se focar na redução da dose média na mandíbula e no volume de osso para que não exceda mais de 50 Gy, sempre que viável.	Moderada	Forte
Recomenda-se uma avaliação odontológica pré-radioterapia para identificar e extrair dentes que possam aumentar o risco de ORN ao longo da vida e para orientar o paciente sobre os riscos contínuos da condição.	Moderada	Forte
Extrações dentárias, quando necessárias, devem ser realizadas pelo menos 2 semanas antes do início da radioterapia. Em casos de tumores de crescimento rápido, as extrações podem ser adiadas para não retardar o início da radioterapia.	Moderada	Forte

Continua na próxima página

Tabela 3 – Recomendações para a prevenção da ORN antes do início da radioterapia de cabeça e pescoço. Tabela adaptada do guideline proposto pela ISOO-MASCC e ASCO (Peterson et al., 2024). (Conclusão).

Recomendação	Qualidade da evidência	Força da recomendação
Dentes com prognóstico desfavorável, como aqueles com doença periodontal moderada ou grave dentro do campo de radioterapia, devem ser extraídos antes do tratamento para reduzir o risco de ORN. Dentes com doença periapical, cáries ou terceiros molares parcialmente erupcionados também devem ser avaliados, considerando o risco de ORN e o tempo disponível para a cura.	Moderada	Forte
Um intervalo de 2 semanas entre as extrações dentárias e o início da radioterapia é recomendado, desde que isso não retarde o início do tratamento oncológico. Caso as extrações alterem a oclusão, estas devem ser feitas antes da confecção da máscara de imobilização usada durante a radioterapia.	Moderada	Forte
Pacientes com risco de hipofunção salivar induzida pela radioterapia devem ser orientados a aplicar flúor tópico diariamente para reduzir o risco de cáries pós-irradiação, o que diminuiria a necessidade de extrações.	Alta	Forte
Fatores de risco modificáveis, como má higiene bucal, cirurgias dentoalveolares e tabagismo, devem ser abordados antes, durante e após a radioterapia.	Alta	Forte

Tabela 4 – Recomendações para a prevenção da ORN após a radioterapia de cabeça e pescoço. Tabela adaptada do guideline proposto pela ISOO-MASCC e ASCO (Peterson et al., 2024). (Continua).

Recomendação	Qualidade da evidência	Força da recomendação
Antes de finalizar o plano de tratamento odontológico em pacientes que receberam radioterapia em cabeça e pescoço, é essencial revisar cuidadosamente o planejamento radioterápico, com atenção especial à dose aplicada na mandíbula e maxila.	Moderada	Forte

Continua na próxima página

Tabela 4 – Recomendações para a prevenção da ORN após a radioterapia de cabeça e pescoço. Tabela adaptada do guideline proposto pela ISOO-MASCC e ASCO (Peterson et al., 2024). (Conclusão).

Recomendação	Qualidade da evidência	Força da recomendação
Para dentes localizados em áreas de alto risco para ORN, deve-se priorizar alternativas à extração, como tratamento endodôntico, restaurações ou coroas, a menos que o paciente apresente infecções recorrentes, dor ou outros sintomas que justifiquem a extração. Da mesma forma, implantes dentários nessas áreas de risco elevado devem ser evitados, exceto quando não houver alternativas viáveis para restaurar a função oral.	Moderada	Forte
Pacientes com maior risco de desenvolver ORN, devido à radioterapia prévia envolvendo a mandíbula ou maxila, devem receber antibióticos profiláticos antes e após procedimentos odontológicos invasivos, como extrações ou colocação de implantes.	Baixa	Fraca
Pacientes em risco de ORN que apresentem cicatrização retardada após extrações podem se beneficiar de enxaguantes bucais antissépticos, como gluconato de clorexidina (0,12% ou 0,2%) ou iodopovidona, usados ao menos duas vezes ao dia até que a cicatrização adequada seja confirmada por acompanhamento odontológico.	Baixa	Fraca
A prescrição de pentoxifilina (400 mg duas vezes ao dia) e tocoferol (1.000 UI uma vez ao dia) é recomendada para pacientes sem câncer, por pelo menos 1 semana antes e 4 semanas após procedimentos odontológicos invasivos, até que o alvéolo esteja cicatrizado.*	Baixa	Fraca
O uso rotineiro de oxigênio hiperbárico como terapia profilática antes de extrações dentárias em pacientes irradiados não é recomendado. Porém, o oxigênio hiperbárico pode ser oferecido a pacientes submetidos a procedimentos odontológicos invasivos em locais onde o tecido ósseo recebeu uma dose >50 Gy.	Baixa	Fraca

* Isso deve ser levado em consideração para pacientes com alto risco de ORN devido à exposição prévia a uma dose de radioterapia igual ou superior a 50 Gy na mandíbula ou maxila, na área planejada para intervenção odontológica. Entretanto, essa abordagem deve ser evitada em pacientes com contraindicações ao uso de pentoxifilina e/ou tocoferol, como aqueles com maior risco de sangramento.

O uso de agentes antioxidantes, como a combinação de pentoxifilina e tocoferol (vitamina E), tem demonstrado resultados positivos no tratamento da ORN ao reduzir a

produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteger as membranas celulares (Kolokythas et al., 2019; Iqdal, Kysas; 2020). Entre os fitoterápicos atualmente estudados, a curcumina surge como uma opção terapêutica promissora, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Guan et al., 2019). A curcumina é capaz de inibir enzimas como COX-2, LOX e iNOS, além de reduzir a produção de citocinas inflamatórias (como interferon- γ e fator de necrose tumoral) e a ativação de fatores de transcrição (NF κ B e AP-1) (Menon e Sudheer, 2007). No contexto da mucosite oral, a aplicação tópica de curcumina tem mostrado eficácia na diminuição da dor, eritema, extensão das úlceras e gravidade da mucosite (Normando et al., 2018). Em um estudo de Ma et al. (2021), a curcumina, aplicada em um modelo *in vitro* de osteoporose diabética, reduziu a apoptose celular, o estresse oxidativo e a autofagia induzida por ROS. De forma semelhante, Hatefi et al. (2018) relataram que a curcumina apresentou efeitos protetores contra a osteoporose, diminuindo a perda óssea e os biomarcadores relacionados ao osso. Assim, a curcumina mostra potencial como um agente promissor para a prevenção e tratamento da ORN, embora ainda não tenha sido testada com esse foco.

Os compostos de bisperoxovanádio (bpV) são fármacos que inibem o gene supressor tumoral PTEN, o qual desempenha um papel antagonista na via PI3K-AKT-mTOR (Chauhan et al., 2021). Dessa forma, a inibição de PTEN resulta em uma superativação dessa via, promovendo o aumento da proliferação celular (Cao et al., 2011). No entanto, ainda se sabe pouco sobre a modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR no processo de reparo ósseo. Portanto, é relevante explorar o impacto do bpV(pic) no mecanismo da ORN.

A terapia de fotobiomodulação (PBMT), com comprimento de onda entre 600 e 1000 nm, é reconhecida como um tratamento não invasivo eficaz para várias condições orais (Kalhori et al., 2019; Bensadoun, 2018; Bensadoun et al., 2020). O laser de baixa intensidade opera emitindo fótons que transferem uma baixa quantidade de energia para os tecidos sem gerar calor (Pelliccioli et al., 2014), modulando as funções celulares por meio da ativação de diversas vias envolvidas no crescimento, sobrevivência celular, proliferação, migração e transcrição (Pelliccioli et al., 2014; Marques et al., 2016). Durante o processo de cicatrização, a via PI3K-PTEN-AKT-mTOR é uma das ativadas, e, segundo Pelliccioli et al. (2014), a fotobiomodulação pode acelerar a cicatrização da mucosa oral ao promover a migração de células epiteliais. A PBMT tem se mostrado eficaz na cicatrização de feridas crônicas (Mosca et al., 2019) e na modulação da dor e da inflamação (Zadik et al., 2020). Além disso, sob condições de estresse oxidativo, a fotobiomodulação é capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio

(Hamblin, 2017). Em ossos irradiados, essa terapia foi capaz de acelerar a regeneração óssea, aumentando a quantidade de osteócitos, modulando a resposta inflamatória e melhorando a vascularização (Escudero et al., 2019). Assim, a fotobiomodulação se apresenta como uma alternativa eficaz para a prevenção e tratamento da ORN.

1.1.2. Cultura celular para o estudo da ORN

As técnicas de pesquisa *in vitro* e *in vivo* desempenham um papel crucial na avaliação de novas terapias, permitindo análises nos níveis molecular, celular e tecidual antes da aplicação clínica. No entanto, devido à complexidade e natureza multifatorial da ORN, replicar essa condição em modelos laboratoriais continua sendo um desafio significativo. Na literatura, as estratégias terapêuticas para o tratamento da ORN são predominantemente investigadas em modelos *in vivo* (de Oliveira et al., 2022). No modelo *in vivo*, são utilizados camundongos que tem um dente molar extraído um período após braquiterapia com dose de 20 Gy (Tamplen et al., 2011). Por outro lado, os modelos *in vitro* utilizando cultura celular permitem o screening de fármacos, possibilitando uma triagem inicial das terapias de forma mais rápida e evitando custos mais elevados e o uso indiscriminado dos animais. Além disso, o cultivo celular permite um maior controle experimental, redução da variabilidade e modelagem de condições específicas (Alves & Guimarães, 2010). Apesar de haver estudos sobre os efeitos da radiação em células osteoblásticas (Amler et al., 2021; He et al., 2011; Dudziak et al., 2000; Gal et al., 2000), não há na literatura o estabelecimento de um modelo *in vitro* de ORN.

Nesse contexto, esta dissertação de mestrado tem como principal objetivo a avaliação dos efeitos da radiação ionizante em células humanas imortalizadas osteoblasto-like (SaOS-2) tendo em vista o estudo da etiopatogenia da ORN e o estabelecimento de um modelo *in vitro* que possa ser usado em estudos futuros para a avaliação de possibilidades terapêuticas. Esta pesquisa foi realizada na Universidade de Brasília (UnB), utilizando o laboratório de histopatologia bucal e o laboratório de farmacologia da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB e a Unidade de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da radiação ionizante em células humanas imortalizadas do tipo osteoblasto-like (SaOS-2) tendo em vista o estudo da etiopatogenia da ORN e o estabelecimento de um modelo *in vitro* que possa ser usado em estudos futuros para a avaliação de possibilidades terapêuticas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular, a capacidade de fechamento da ferida e a morfologia celular após a radiação ionizante em células SaOS-2;
- Estabelecer um modelo *in vitro* de osteorradição necrose, utilizando monocultura de células SaOS-2 e co-cultura SaOS-2/cultura primária de fibroblastos gengivais humanos (FG);
- Analisar a expressão gênica e proteica de citocinas inflamatórias e biomarcadores da via PI3K-PTEN-AKR-mTOR em modelo *in vitro* de osteorradição necrose.

3. MÉTODOS

3.1. Fase 1: Estabelecimento de um modelo *in vitro* de osteorradionecrose

Nessa fase, pretendeu-se estabelecer um modelo de osteorradionecrose *in vitro* a partir do estímulo radioinduzido em células humanas imortalizadas do tipo osteoblasto-like (SaOS-2) em monocultura e em co-cultura com fibroblastos gengivais humanos (FG). Um fluxograma foi elaborado para ilustrar o método empregado (Figura 1).

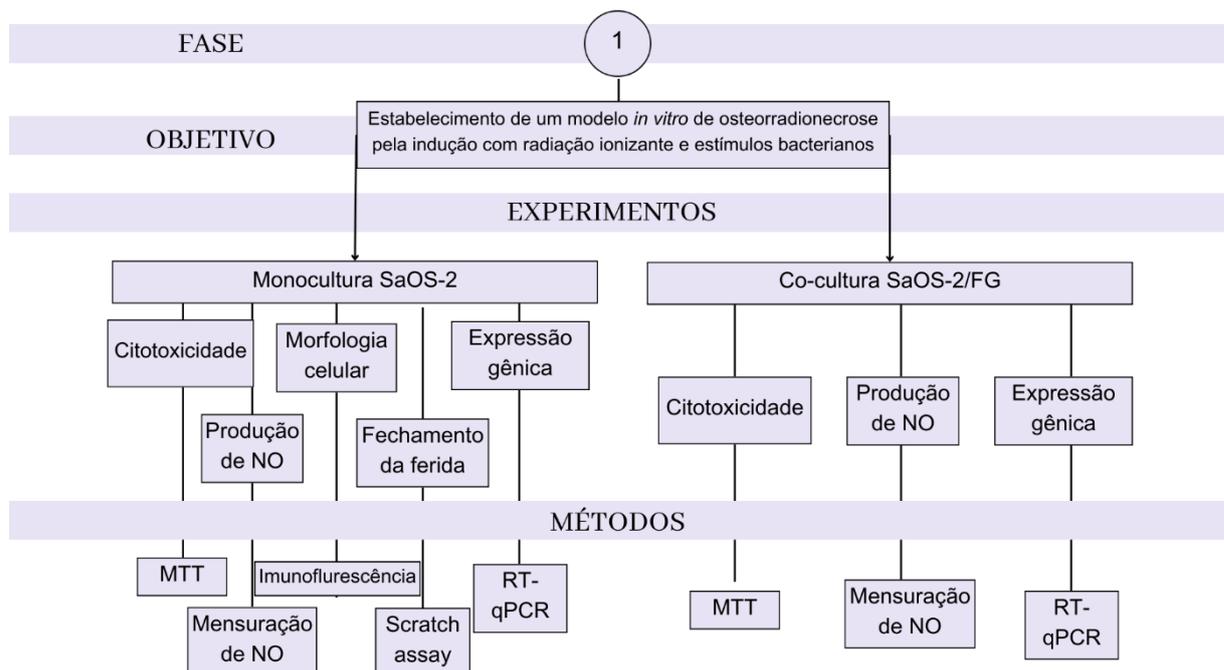


Figura 3 - Fluxograma metodológico.

3.1.1. Cultura celular

Células SaOS-2 foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 µg/mL de penicilina e 50 µg/mL de gentamicina. Durante o cultivo, as células foram mantidas em condições controladas, sendo incubadas em um ambiente umidificado a 37°C com 5% de CO₂, com trocas regulares de meio.

3.1.2. Indução do modelo de osteorradiocrecrose em monocultura de SaOS-2

3.1.2.1. Estímulos bacterianos: O estímulo bacteriano foi realizado utilizando veículo (controle), lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* e extrato proteico de *Porphyromonas gingivalis* (Pg). O LPS de *E. coli* (*E. coli* O111; Sigma-Aldrich) e o extrato proteico de Pg foram empregados para simular a liberação de produtos do biofilme bacteriano em lesões da mucosa. O LPS foi dissolvido em PBS e armazenado a -20°C, enquanto os extratos proteicos de Pg foram preparados conforme descrito por Albiero et al., 2017, diluídos em DMEM e conservados a -80°C. Após as células atingirem 70-80% de confluência, o meio foi substituído por DMEM fresco, e as células foram estimuladas com concentrações de 10µg/mL de LPS e 5µg/mL de Pg por 1 hora antes da aplicação da radiação ionizante.

3.1.2.2. Radiação ionizante: As células foram separadas em dois grupos: 'sem' e 'com' estímulos bacterianos. Após uma hora de exposição ao estímulo bacteriano, todas as células foram encaminhadas para a Unidade de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília, onde passaram pelo processo de irradiação ionizante usando um feixe de fótons lineares de 6 MV (acelerador linear Siemens Primus – Malvern, Pensilvânia, EUA). Foram usadas as doses de 0, 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 20 Gray.

3.1.3. Avaliação do modelo de osteorradiocrecrose em monocultura de SaOS-2

3.1.3.1. Ensaio MTT: Após 24 horas, a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT. Para o experimento, foram adicionados 10 µL de solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e as células foram incubadas por 4 horas no escuro. Em seguida, foi adicionado isopropanol acidificado (25 mL de isopropanol + 104 µL de HCl a 100%). A viabilidade celular foi avaliada comparando os valores de absorvância a 570 nm, utilizando um leitor Thermo Plate TP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os resultados desse experimento embasaram a seleção das doses de radiação ionizante que seriam utilizadas para as análises seguintes.

3.1.3.2. Mensuração da produção de óxido nítrico: Após 6 e 24 horas de estimulação, a mensuração da produção de óxido nítrico (NO) foi medida seguindo a metodologia descrita por Green et al. (1982), com adaptações. Resumidamente, 100 µL dos sobrenadantes das culturas foram transferidos para placas de 96 poços, seguidos pela adição de 100 µL de uma mistura contendo 1% de sulfanilamida (Sigma-Aldrich, EUA) em 2,5% de ácido fosfórico (Vetec, Brasil) e 1% de N-(1-naftil) etilenodiamina (Sigma-Aldrich, EUA) em 2,5% de ácido fosfórico

(Vetec, Brasil), em proporção 1:1. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, as leituras de absorvância foram realizadas a 490 nm utilizando um leitor de microplacas Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A concentração de nitrito foi calculada com base na equação da curva padrão (1,5625 μ M - 200 μ M), e o coeficiente de regressão linear (R^2) foi avaliado. Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo o controle considerado como 100%.

3.1.3.3. Avaliação da morfologia celular: Após 24 horas, a morfologia celular foi avaliada por imunofluorescência. As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro (Fisherbrand, Microscope Cover Glass – Fisher Scientific), e a análise de coloração de actina foi realizada utilizando faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células foram lavadas com PBS e fixadas com 4% de formaldeído e 5% de sacarose por 5 minutos. Após nova lavagem com PBS, as células foram permeabilizadas com 0,5% de Triton (X-100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 10 minutos, seguidas de incubação com faloidina (50 μ g/mL) por 40 minutos. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e os núcleos foram marcados com DAPI (1/1000, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 15 minutos à temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas em lâminas com Fluoromount-G® (SouthernBiotech, EUA). As microfotografias foram obtidas usando o microscópio Axio Observer D1 (Zeiss, Alemanha) com ampliação de 40x, e as imagens foram processadas com o software ZEN (Zeiss, Alemanha) e ImageJ (LOCI, Madison, EUA). Para a análise quantitativa, somente células com contornos bem definidos foram incluídas, e as medições foram feitas com o software ImageJ (LOCI, Madison, EUA).

3.1.3.4. Ensaio de fechamento da ferida: Antes do início do procedimento, as placas foram revestidas com 2 mL de fibronectina (10 μ g/mL) e incubadas durante a noite a 4°C. A lesão foi criada utilizando uma ponta de pipeta p10, formando arranhões verticais e horizontais. Em cada poço, quatro imagens foram capturadas nos intervalos de 0, 6, 12 e 24 horas. A medida inicial (0 horas) foi considerada como 100%, servindo como referência para calcular as porcentagens de área relativa nas horas subsequentes. A área de cada imagem foi mensurada e submetida a análise estatística com base na comparação de áreas relativas. As imagens foram obtidas por meio de microscopia Axio Observer D1 (Zeiss, Alemanha) e processadas com o software ZEN Light (Zeiss, Alemanha).

3.1.3.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa/em tempo real (RT-qPCR): A expressão de mRNA dos genes IL1, IL6, NF κ B1, PIK3CA, mTOR, AKT1 e PTEN foi analisada por RT-qPCR. A sequência dos primers estão listadas na Tabela 5. A extração de RNA total foi realizada

24 horas após o estímulo seguindo o protocolo do TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, EUA), e sua concentração e qualidade foram avaliadas com o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). Amostras de 400 ng de RNA foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich, EUA) para remover contaminação por DNA genômico. O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa usando o kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, EUA). A quantificação dos níveis de expressão foi feita com PowerUp® SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) e primers específicos, confirmados por alinhamento com o banco de dados NCBI via PrimerBLAST. As reações foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços, com volume final de 10 µL por poço contendo 0,2 µL de cada primer, 5 µL de SYBR Green Master Mix, 0,1 µL de água livre de RNase e 4,5 µL de cDNA. A análise de qPCR foi feita com o software StepOne v2.1 (Applied Biosystems), normalizando contra o gene β -ACTIN. A quantificação relativa foi calculada pelo método comparativo CT ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), onde $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre ΔCt do grupo irradiado e ΔCt do grupo controle (Schmittgen & Livak, 2008).

Tabela 5 - Sequências de primers usadas nos ensaios de RT-qPCR

Nome	Sequência
<i>PIK3CA_F</i>	CCACGACCATCATCAGGTGAA
<i>PIK3CA_R</i>	CCTCACGGAGGCATTCTAAAGT
<i>mTOR_F</i>	GCAGATTTGCCAACTATCTTCGG
<i>mTOR_R</i>	CAGCGGTAAAAGTGTCCCCTG
<i>AKT1_F</i>	TCCTCCTCAAGAATGATGGCA
<i>AKT1_R</i>	GTGCGTTCGATGACAGTGGT
<i>PTEN_F</i>	TTTGAAGACCATAACCCACCAC
<i>PTEN_R</i>	ATTACACCAGTTCGTCCCTTTC
<i>β-ACTIN_F</i>	TCACCCACACTGTGCCCATCTACG
<i>β-ACTIN_R</i>	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG
<i>IL-1β_F</i>	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA
<i>IL-1β_R</i>	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
<i>IL-6_F</i>	CCTGAACCTTCCAAAGATGGC
<i>IL-6_R</i>	TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA
<i>NF-kappa B_F</i>	AACAGAGAGGATTTTCGTTTCCG
<i>NF-kappa B_R</i>	TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT

3.1.3. Indução do modelo de osteorradiocrose em co-cultura de SaOS-2/FG

3.1.3.1. Co-cultura

A cultura primária de FG foi obtida por meio de um projeto prévio aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília (CAAE nº 78679717.60000.0030). O estabelecimento da cultura primária de fibroblastos gengivais humanos foi realizado através do método de explante (Monteiro et al., 2023). A co-cultura SAOS-2/FG foi estabelecida utilizando membranas Transwell® (poros 0,4 µm, Corning Costar, Corning, NY). SAOS-2 e FG foram cultivados em DMEM com soro fetal bovino (10%), penicilina (50 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL). Durante o período de co-cultura, o meio foi trocado regularmente, e as células incubadas a 37°C e com CO₂ (5%).

3.1.3.2. Estímulos bacterianos e radiação ionizante

Baseado nos resultados da monocultura, a co-cultura SaOS-2 foi estimulada com as doses definidas.

3.1.3.3. Avaliação do modelo de osteorradiocrose em co-cultura SaOS-2/FG

Foram realizadas a avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT, a avaliação da mensuração de NO e a análise da expressão gênica por RT-qPCR. Os experimentos foram realizados conforme descritos anteriormente para a monocultura.

3.1.4. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados com, no mínimo, três réplicas. A análise estatística foi conduzida utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0.2 (GraphPad Software, LA Jolla, CA). A distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados quantitativos, apresentados como média ± desvio padrão (DP), foram analisados por ANOVA com testes post hoc para dados paramétricos, ou, no caso de dados não paramétricos, pela mediana, sendo analisados com o teste de Kruskal-Wallis. Para comparações entre dois grupos, o teste t não pareado foi aplicado para dados paramétricos e o teste Mann-Whitney para dados não paramétricos. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. CAPÍTULO 1: Manuscrito

Artigo submetido e em processo de revisão na revista: Archives of Oral Biology (I.F.: 2.2; Qualis A1 CAPES). <https://www.sciencedirect.com/journal/archives-of-oral-biology>

EFFECTS OF IONIZING RADIATION ON OSTEOBLASTIC CELLS: *IN VITRO* INSIGHTS INTO THE ETIOPATHOGENESIS OF OSTEORADIONECROSIS

ABSTRACT

Objective: This *in vitro* study aimed to analyze the effects of ionizing radiation on immortalized human osteoblast-like cells (SaOS-2) and further assess their cellular response in co-culture with fibroblasts. **Design:** SaOS-2 cells were exposed to ionizing radiation and evaluated for cell viability, nitric oxide (NO) production, cellular morphology, wound healing, and gene expression related to the PI3K-AKT-mTOR pathway. Additionally, SaOS-2 cells were co-cultured with human gingival fibroblasts using transwell membranes and subjected to the same irradiation protocol. Subsequent evaluations included cell viability, NO levels, and gene expression analysis. **Results:** After 24 hours, a 16 Gray dose reduced cell viability by 40% and increased NO production by 14%. Additionally, there was an enlargement of the nuclear area, a delay in wound closure, and a trend toward down-regulation of genes related to the PI3K-AKT-mTOR pathway. Under co-culture conditions, the dose of 16 Gray did not affect cell viability but increased NO production and tended to up-regulate markers of the PI3K-AKT-mTOR pathway. **Conclusions:** The findings of this study demonstrate that an irradiation dose of 16 Gray induces a reduction in cell viability, an increase in NO production, and various other metabolic and morphologic effects on osteoblastic cells, while emphasizing the impact of intercellular interaction in the etiopathogenesis.

Keywords: Ionizing radiation; Osteoblastic cells; *In vitro* study; Etiopathogenesis; Osteoradionecrosis

INTRODUCTION

Radiotherapy is commonly used to treat patients with head and neck cancer and can be applied alone or in combination with surgery or chemotherapy (Rahman et al., 2020; Alterio et al., 2019). Although widely used, ionizing radiation treatment is often associated with adverse effects on the surrounding healthy tissues. For instance, the PI3K-AKT-mTOR is one of the targeted signaling pathways. Radiation activates the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase and related apoptotic proteins, which can interrupt the repair process and trigger apoptosis (Guo et al., 2014). Among the toxicities of radiotherapy, osteoradionecrosis is a serious and limiting complication that negatively affects the patient's quality of life (Frankart et al., 2021; Iqbal et al., 2020). Osteoradionecrosis is characterized by exposed and necrotic bone at an irradiated site that does not heal within three to six months (Frankart et al., 2021). The incidence rates of this condition are impacted by the tumor treatment, with the radiotherapy modality, technique, and dose-volume-related factors being the most influential (Topkan et al., 2023). Thus, the prevalence of this condition varies, affecting approximately 5.5% and 5.3% of patients who had extractions before and after head and neck radiotherapy, respectively (Beaumont et al., 2021).

Several hypotheses have been proposed for the etiopathogenesis of osteoradionecrosis, but the precise mechanism remains complex and poorly understood (Singh et al., 2022). A previous theory suggested that osteoradionecrosis resulted from primary trauma and infection due to radiotherapy. However, Marx's model proposes that the primary cause is radiotherapy, with infection occurring after necrosis (Marx, 1983). More recently, osteoradionecrosis has been linked to reduced vascularization leading to hypoxia and tissue necrosis (Leonetti et al., 2020). This vascular theory is supported by clinical findings showing a higher frequency of this alteration in the mandible, which is less vascularized than the maxilla (Frankart et al., 2021). Furthermore, Xu et al. (2012) carried out an *in vivo* study suggesting that hypervascularization related to decreased local blood flow can disrupt bone remodeling. Histological analysis of jaws affected by osteoradionecrosis showed a significant loss of osteocytes and increased inflammatory cell presence in necrotic areas following radiation exposure (Bras et al., 1990). Another toxicity of radiotherapy is the fibroatrophic process induced by radiation, leading to stress-induced premature senescence, delayed proliferation, and fibroblast death (Delanian and Lefaix, 2004).

There are no currently established ideal management or consensus therapeutic guidelines for osteoradionecrosis. Despite advancements in treatment modalities, managing this condition remains a therapeutic challenge (Singh et al., 2022). Thus, this study aimed to analyze the effects of ionizing radiation in immortalized human osteoblast-like cells (SaOS-2) and further assess their cellular response in co-culture with gingival fibroblasts. Although *in vitro* representations of osteoradionecrosis are lacking in the literature, this experimental study could be used in exploring the etiopathogenesis and investigating new therapeutic drugs.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Immortalized human osteoblast-like cells (SaOS-2) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS; Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA), and 1% antibiotic (penicillin - 50 µg/mL and gentamicin - 50 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cells were maintained under optimal conditions, incubated in a humidified incubator at 37°C accompanied by CO₂ (5%) and the medium was changed regularly.

Cell viability: MTT assay

Cells (2×10^4 cells/well) were plated in 96-well plates (Kasvi, China) and incubated for 24 hours. DMEM medium was replaced, and cells were transported to the Oncology Center of the University Hospital of Brasilia, Brazil to be irradiated. Cells were induced with 0, 4, 6, 8, 10, 12, 16, and 20 Gray using a 6 MV linear photons beam (Siemens Primus linear accelerator – Malvern, Pennsylvania, USA). Cell viability was also evaluated after the application of bacterial stimuli with *E. coli* lipopolysaccharide (10µg/mL - *E. coli* O111:B4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and *Porphyromonas gingivalis* protein extract (5µg/mL) followed by ionizing radiation. *P. gingivalis* protein extracts were prepared as described previously (Albiero et al., 2017). After 24 hours of cell incubation, cell viability was analyzed by MTT assay. For that, 10µL of MTT solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was added and cells were incubated in darkness for 4 h, followed by the addition of acidified isopropanol (25 mL isopropanol + 104 µL 100% HCl). Cell viability was measured by comparing the absorbance values at 570 nm using a Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

Massachusetts, USA). Cells were also assessed 24-, 48-, and 72-hours following exposure to 0, 12, 16, and 20 Gray.

Nitric oxide measurement

Cells (2×10^4 cells/well) were plated in 96-well plates (Kasvi, China) and incubated for 24 hours. DMEM medium was replaced, and cells were irradiated with 0, 16, and 20 Gray. Following 6 and 24 hours of stimulation, nitric oxide (NO) production was determined utilizing the methodology described by Green et al. (1982) with modifications. Briefly, 100 μ L of culture supernatants were placed in 96-well plates followed by the addition of 100 μ L of a mixture containing 1% sulphanilamide (Sigma-Aldrich, USA) in 2.5% phosphoric acid (Vetec, Brazil) and 1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine (Sigma-Aldrich, USA) in 2.5% phosphoric acid (Vetec, Brazil), in the ratio of 1:1. After incubating for 10 minutes at room temperature, absorbance readings were taken at 490 nm using a microplate Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Nitrite concentration was determined by calculating it from the standard curve equation ($1.5625 \mu\text{M} - 200 \mu\text{M}$) and assessing the linear regression coefficient (R^2). The results were expressed as a percentage, the control was set at 100%. This experiment was also repeated with the addition of bacterial stimuli (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *E. coli* lipopolysaccharide and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *Porphyromonas gingivalis* protein extract).

Immunofluorescence

SaOS-2 cells (5×10^5 cells/well) were plated on 12-well dishes (Kasvi, China) with glass coverslips (Fisherbrand, Microscope Cover Glass – Fisher Scientific) and incubated for 24 hours. The ionization radiation was then applied according to the following experimental groups: 0, 16, and 20 Gray. After 24 hours, the analysis was performed for actin staining using Phalloidin, Fluorescein Isothiocyanate Labeled (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Cells were washed with PBS and fixed with 4% formaldehyde and 5% sucrose for 5 minutes. After another PBS wash, cells were permeabilized with 0.5 % Triton (X-100; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 10 minutes, followed by incubation with phalloidin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 40 minutes. Subsequently, cells were washed with PBS and nuclei were labeled with diamidino-phenylindole (1/1000 DAPI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 15 minutes at room temperature. Coverslips were mounted on slides using Fluoromount-G® (SouthernBiotech, USA). Microphotographs were performed using the Axio Observer D1 microscopy (Zeiss, Germany) at 40x magnification and processed using ZEN (Zeiss, Germany) and ImageJ

software (LOCI, Madison, USA). For quantitative analysis, only cells with clearly defined contours were included and measurements were performed using the ImageJ software (LOCI, Madison, USA).

Scratch assay

Before beginning this procedure, 24-well dishes (Kasvi, China) were coated with 2 mL of fibronectin (10 µg/mL) and incubated overnight at 4 °C. After, SaOS-2 cells were seeded (25×10^4 cells/well) into the prepared dishes and incubated for 24 hours. Subsequently, a monolayer was scraped with a p10 pipet tip to create vertical and horizontal scratch lines. Cells were then washed with PBS and exposed to ionizing radiation. Four images were captured in each well at 6, 12, and 24 hours. The initial measurement (0 hours) was set at 100%, serving as the reference area for calculating subsequent percentages of relative area. Each photograph's area was measured and underwent to a statistical analysis based on a relative area comparison. Images were acquired using Axio Observer D1 microscopy (Zeiss, Germany) and processed with ZEN Light software (Zeiss, Germany).

Real-time/quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

The expression of *IL1*, *IL6*, *NFκB1*, *PIK3CA*, *mTOR*, *AKT1*, and *PTEN* mRNA was evaluated using real-time/quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) 24 hours after irradiation. Primers' sequences were presented in Table Appendix 1. SaOS-2 were seeded (12×10^5 cells/well) into 6-well dishes (Kasvi, China) and incubated for 24 h after the radiation stimuli. After 24 h, total RNA extraction was conducted following the established protocol for TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, USA). The concentration and quality of the extracted RNA were assessed using NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, UK) spectrophotometry. Samples (400 ng of total RNA) were treated with DNase I (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) to remove any contamination with genomic DNA that might have been present. The cDNA templates were obtained by reverse transcription in 20 µL reactions containing MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 10X RT Buffer, 25X dNTP mix, 10X RT Random Primers, and RNase-Free Water using the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The expression levels of genes were quantified utilizing PowerUp® SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) and custom-designed primers. The specificity of the primers was confirmed by aligning them against sequences in the nonredundant NCBI database using

the PrimerBLAST software (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Reactions were set up in triplicates in 96-well plates (Kasvi, China), with a final volume of 10 μL per well containing 0.2 μL of each forward and reverse primer, 5 μL of Power Up SYBR Green Master Mix (2X), 0.1 μL of RNase-Free water, and 4.5 μL of cDNA. The qPCR data was analyzed using StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems), with normalization against the housekeeping gene, beta-actin ($\beta\text{-ACTIN}$). The relative quantification was determined using the comparative CT method, and the statistical analysis was performed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ equation, where $\Delta\Delta\text{Ct}$ represents the difference between ΔCt of irradiated group and ΔCt of calibrator/control group (Schmittgen & Livak, 2008).

Co-culture

SaOS-2 cells were cultured with primary human gingival fibroblasts using Transwell® membranes (0.4 μm pores, Corning Costar, Corning, NY). The latter was obtained in a previously approved study through the explant method for the establishment of a human gingival fibroblast cell culture (Monteiro et al., 2023). Ethics registration and approval had been obtained from the Human Research Ethics Committee of the Health Sciences College of the University of Brasília (CAAE N° 52278221.6.0000.0030) and all donors signed the understanding and written consent.

SaOS-2 cells (2×10^6 cells/well) were seeded in a 12-well plate (Kasvi, China), while gingival fibroblasts cells (5×10^3 cells/well) were plated on a Transwell® membrane. Following a 24-hour incubation period, cells were subjected to ionizing radiation at doses of 16 and 20 Gray. The MTT assay was then performed after a further 24 hours. For the evaluation of absorbance, groups were distributed in a 96-well plates (Kasvi, China) and cell viability was assessed by comparing absorbance values at 570 nm using a Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). NO production was also assessed in cellular supernatant. MTT analysis and NO production were also performed after the inclusion of bacterial stimuli (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *E. coli* lipopolysaccharide and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *Porphyromonas gingivalis* protein extract).

To understand the gene expression of each cell in co-culture, first SaOS-2 cells (1.2×10^5 cells/well) was seeded in a 6-well plate (Kasvi, China), while gingival fibroblasts cells (1×10^5 cells/well) were plated on a Transwell® membrane. Each biological sample was plated in two

wells. Therefore, 500 μ L of Trizol® (Invitrogen) was used in each well, forming a final solution of 1 mL for each sample.

Statistical analysis

All experiments were performed with at least three technical replicates. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 9.0.2 (GraphPad Software, LA Jolla, CA). Quantitative data were checked for normal distribution (Shapiro-Wilk normality test). Data is presented as mean \pm standard deviation (SD) and was analyzed using ANOVA with post hoc tests when applicable for parametric data, or presented as median and interquartile range (IQR) and analyzed using the Kruskal-Wallis test for non-parametric data. For comparisons of only two groups, unpaired t test was used for parametric data and Mann-Whitney test for non-parametric data. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Ionizing radiation reduced cell viability and increased NO production in osteoblastic cells

After 24 hours, low doses of ionizing radiation were not sufficient to significantly reduce cell viability, and the doses of 6 and 8 Gray increased cell viability by 36,8% ($p < 0.0001$) and 25,7% ($p < 0.01$) respectively. Conversely, doses of 12, 16, and 20 Gray reduced cell viability by 28.5% ($p < 0.01$), 40.1% ($p < 0.0001$), and 30.0% ($p < 0.01$) respectively. Therefore, experiments were continued using 16 and 20 Gray of ionizing radiation (Figure 1A). To monitor the post-irradiation cell behavior, the test was repeated after 48 and 72 hours. There was an increase in viability after 48 hours and a return to a decrease after 72 hours for 16 Gray, while 20 Gray returned to normal viability in 48h and maintained it at 72 h (Figure Appendix 1). These results guided the selection of experimental groups for the other analysis.

After 6 hours, NO production was not detected. However, after 24 hours, the NO concentration increased by 13.6% ($p < 0.01$) and 9.6% ($p < 0.05$) respectively after 16 and 20 Gray stimulation (Figure 1B). When bacterial stimuli were added, there was no difference in cell viability (Figure 1C). However, there was an increase in NO production at 16 and 20 Gray of 14.3% ($p < 0.001$) and 9.7% ($p < 0.05$) respectively (Figure 1D).

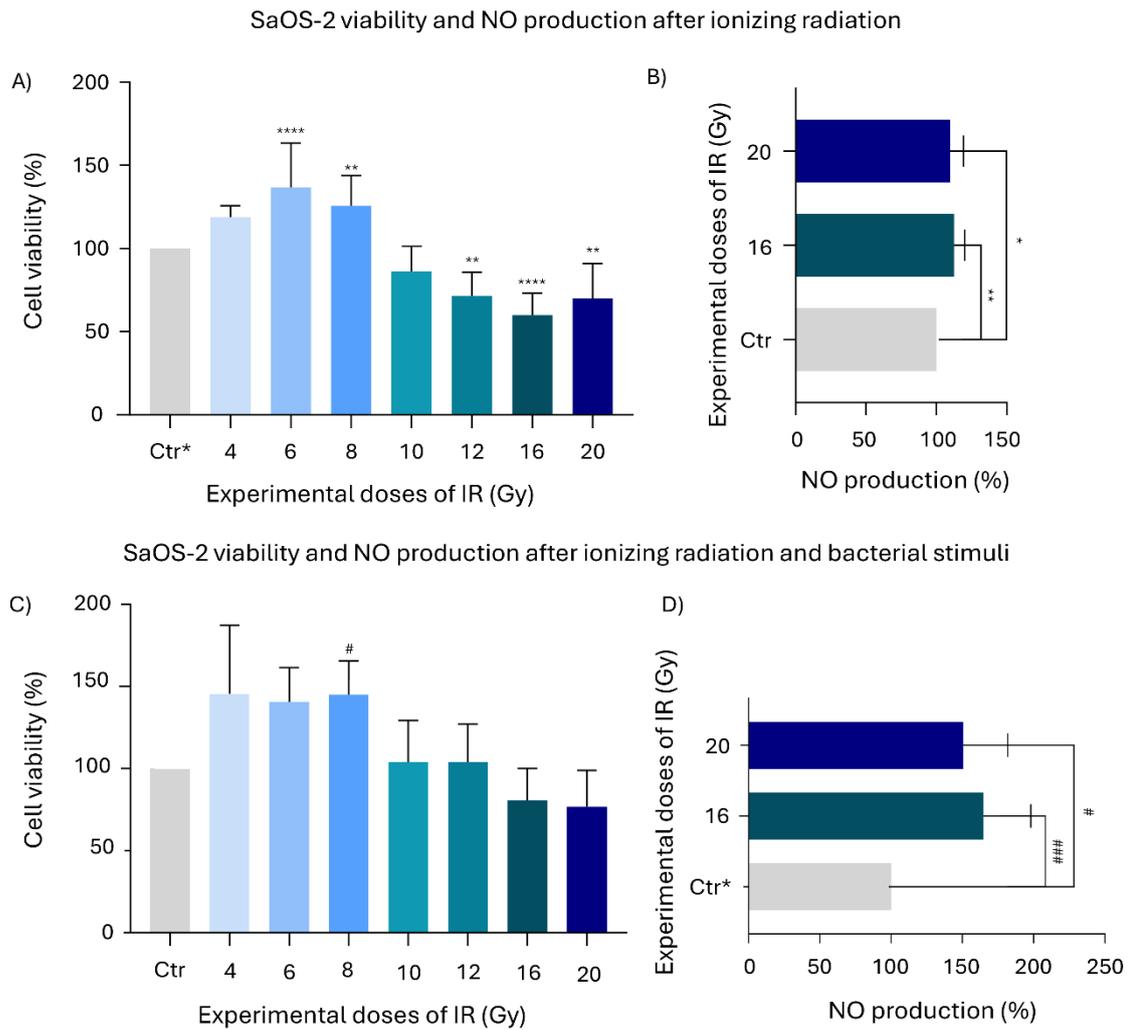


Figure 1: SaOS-2 viability (A) and NO production (B) after ionizing radiation. SaOS-2 viability (C) and NO production (D) after ionizing radiation and bacterial stimuli (10 μ g/mL of lipopolysaccharide and 5 μ g/mL of *Porphyromonas gingivalis*). **Samples:** N=9 for all conditions. **Statistical analysis:** (A) *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; (B) *p<0.05, **p<0.01, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; (C) #p<0.05, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test; (D) #p<0.05, ### p<0.001, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test.

Ionizing radiation affected cell morphology and delayed wound closure in osteoblastic cells

The cytoskeleton staining showed morphological change after ionizing radiation. Although SaOS-2 cells exhibited their regular circular morphology in all groups, an overlapping of nuclei and cytoplasm was observed after radiation (Figure 2). To confirm this qualitative assessment, the nuclear and cytoplasmic areas were measured. In the control group, the area of the nucleus was significantly lower than the cytoplasm ($p < 0.0001$). For instance, a quantitative increase in the nucleus area was found for both irradiated groups (Figure 2B). This increase in the marking of the DAPI compared to the control was 18.4% ($p < 0.01$) and 29.5% ($p < 0.0001$) for 16 and 20 Gray, respectively (Figure 2C). The proportion of the nucleus-to-cytoplasm ratio showed that the nucleus occupies almost 33% of the cytoplasmic area in non-stimulated cells. However, post-radiation, the nucleus and cytoplasm areas exhibited a ratio closer to 100%.

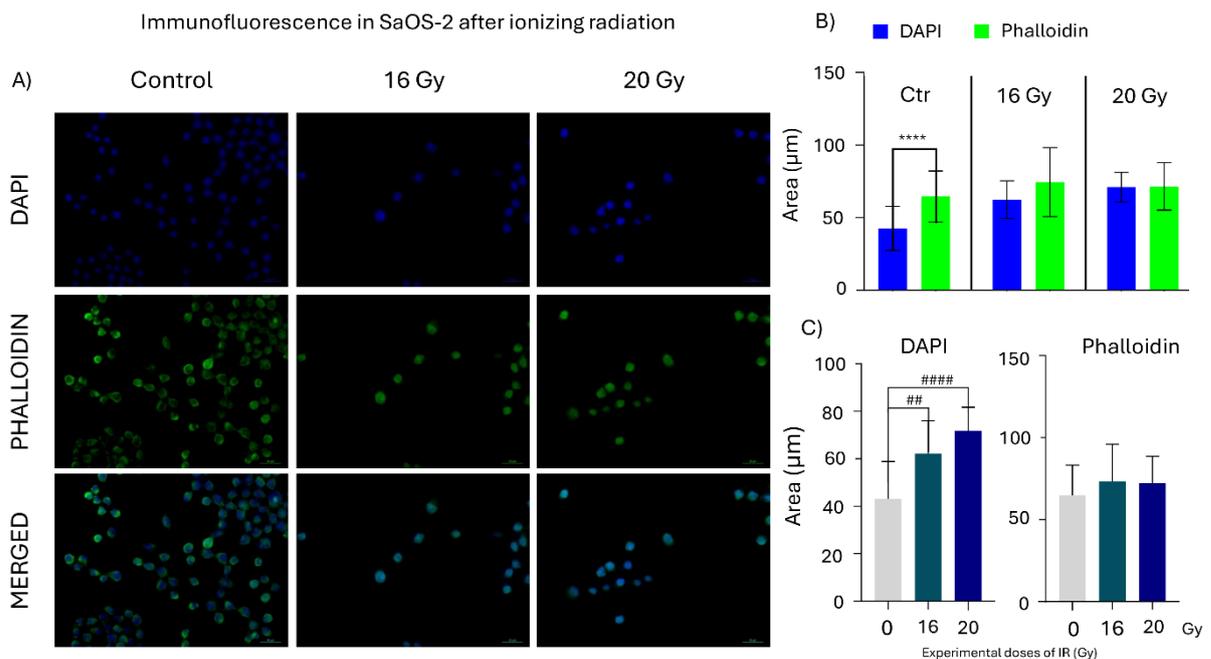


Figure 2: Immunofluorescence in SaOS-2. A) Qualitative effects of ionizing radiation (40x). Scale: 20 μm . B and C) Area of the nucleus and cytoplasm for the expression of DAPI and Phalloidin. **Samples:** N control=25, n 16 Gy=23 and n 20 Gy=20. **Statistical analysis:** B) **** $p < 0.0001$, comparing DAPI and Phalloidin - Mann Whitney test; C) ## $p < 0.01$, ##### $p < 0.0001$, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test.

Following the manual scratch, the nonexperimental condition presented faster closure within 24 hours of follow-up (Figure 3A). After six hours of irradiation, the groups

demonstrated no significant difference in the rate of wound closure. After 12 hours, the control group presented a closure of around 4.4%, while the irradiated groups exhibited 1.1% and 1.7% (Figure 3B). After 24 hours, the control group presented a closure of around 12.3%, and the irradiated groups of 16 and 20 Gray exhibited a lower closure of around 5.6% and 7.2%. In comparison to the control group, the dose of 16 Gray demonstrated a wound closure delay of 6.6% ($p < 0.0001$), while the 20 Gray group exhibited a delay of 5.0% ($p < 0.001$) (Figure 3C). When compared, there was no difference between the results found in the 16 and 20 Gray irradiated groups.

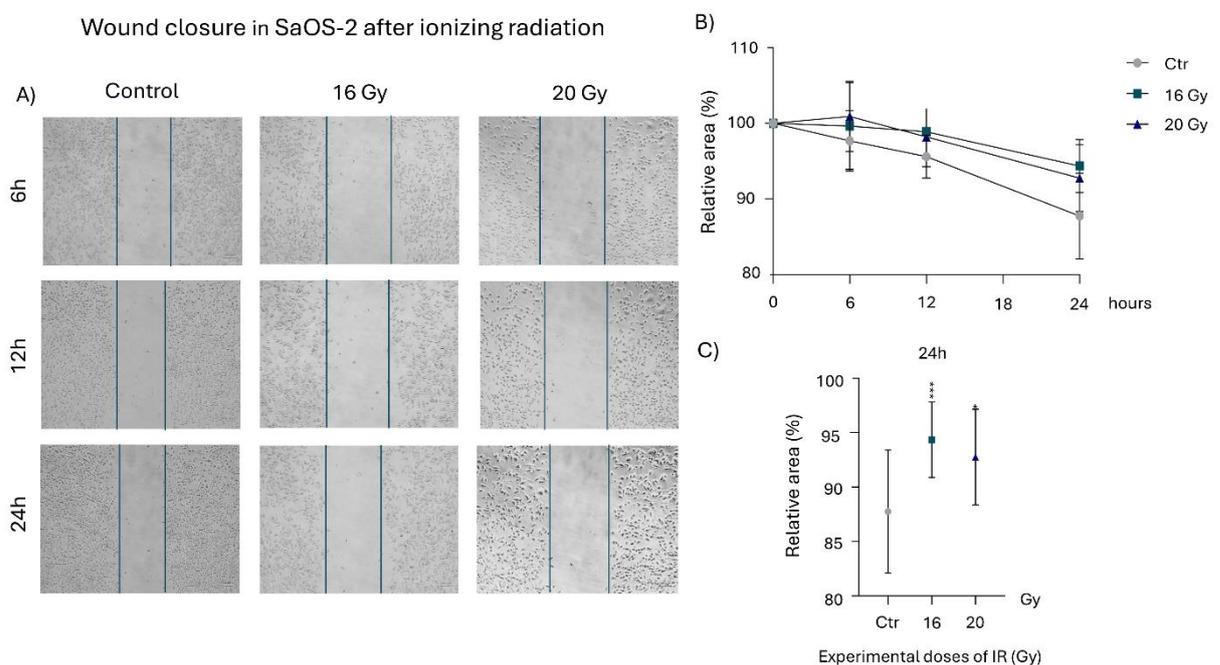


Figure 3: Wound closure in SaOS-2 after ionizing radiation. A) Microphotograph images 40x. Scale: 100 μ m. B) Relative area after 6, 12 and 24h. C) Relative area after 24h. **Samples:** N=15, for all conditions. **Statistical analysis:** C) * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA.

Ionizing radiation down-regulates PI3K-related gene expression in osteoblastic cells

The expression of the PI3K pathway was evaluated 24 hours after ionizing irradiation with 16 Gray. After this interval, the analysis revealed a down-regulation tendency in the *PIK3CA*, *AKT1*, and *PTEN* gene expression while exposed to 16 Gray (Figure 4; Table Appendix 2). The levels of inflammatory cytokines (*IL-1 β* , *IL-6*, and *NF- κ B1*) were below the test sensitivity in both the control and irradiated groups at 24 hours post-irradiation.

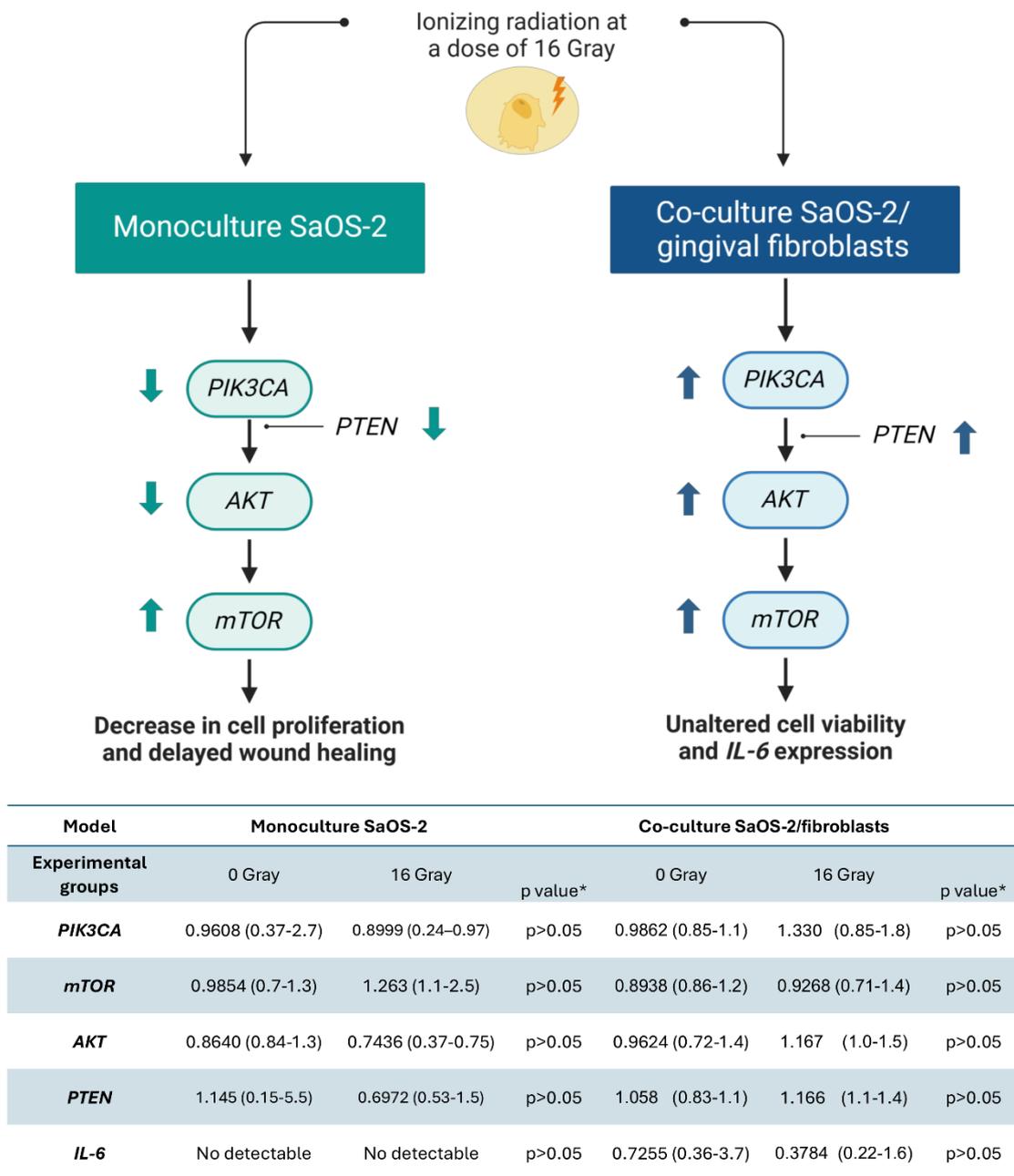


Figure 4: SaOS-2 responses to the PI3K pathway modulation after ionizing radiation with 16 Gray in monoculture and co-culture conditions. **Samples:** N=3 for all conditions. **Statistical analysis:** *p>0.05, experimental dose compared to control - Mann-Whitney test. Created with BioRender.com and PowerPoint.

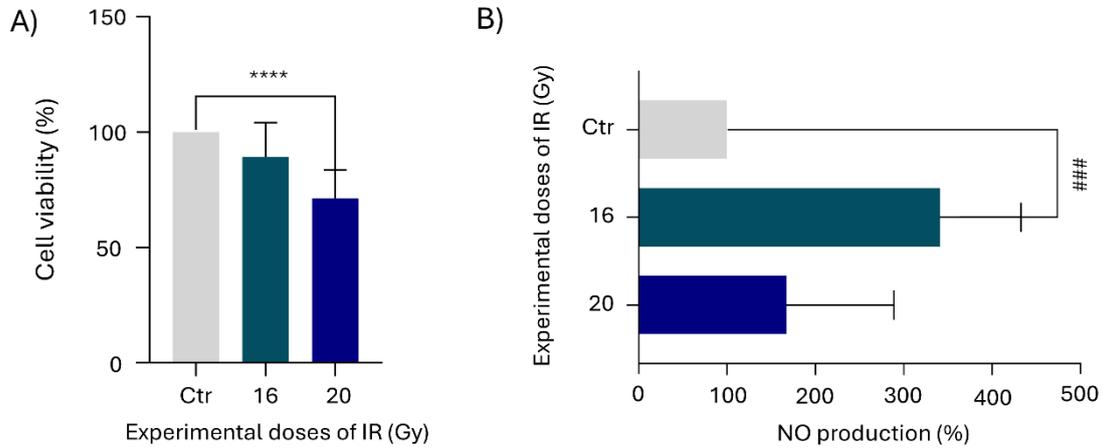
Ionizing radiation affected cells differently in co-culture

The most recent theory of osteoradionecrosis posits an important role in the interaction between fibroblasts and bone cells. To investigate this further, SaOS-2 cells were co-cultured

with gingival fibroblasts using a transwell co-culture system. A distinct impact on cell viability was observed when cells were cultivated in a SaOS-2/gingival fibroblasts co-culture environment. In this setting, the only group that demonstrated a reduction in cell viability without the application of bacterial stimulation was the 20 Gray group (28.7%) (Figure 5A). Nevertheless, regarding NO production, only the 16 Gray group exhibited a significant increase in production (14%) (Figure 5B). After the inclusion of bacterial stimuli, cell viability was reduced by 32.3% ($p < 0.001$) and NO production increased by 0.4% ($p < 0.01$) in the 16 Gray group (Figure 5C and 5D).

In a co-culture setting, SaOS-2 expressed the inflammatory cytokine gene *IL-6*. The irradiated groups tended to down-regulate *IL-6* in comparison to the control group. However, the levels of *IL-1 β* and *NF- κ B* remained below the detection limit in both the control and irradiated groups. Despite the observed reduction in *IL-6*, the irradiated groups demonstrated a tendency to exhibit an increase in all genes of the PI3K-AKT-mTOR pathway (Figure 4; Table Appendix 2). A comparison of the expression of pathway markers in mono- and co-culture was also analyzed, however, no significant difference was found (Figure Appendix 2).

SaOS-2 viability and NO production after ionizing radiation in co-culture with GF



SaOS-2 viability and NO production after ionizing radiation and bacterial stimuli in co-culture with GF

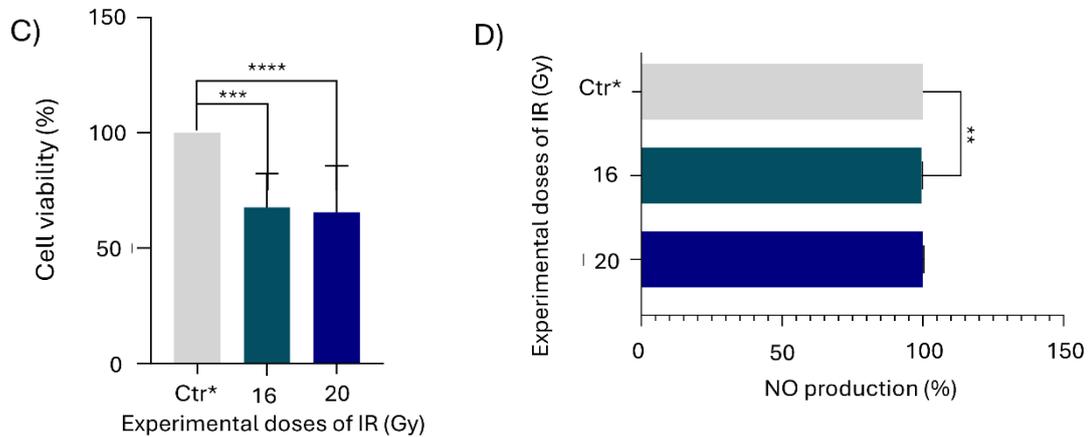


Figure 5: SaOS-2 viability (A) and NO production (B) after ionizing radiation in co-culture with gingival fibroblast. SaOS-2 viability (C) and NO production (D) after ionizing radiation and bacterial stimuli (10 μ g/mL of LPS and 5 μ g/mL of Pg) in co-culture with fibroblasts. **Samples:** N=9 for all conditions. **Statistical analysis:** (A) ****p<0.0001, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; (B) ### p<0.001, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test; (C) ***p<0.001, ****p<0.0001, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; (D) **p<0.01, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA.

DISCUSSION

Osteoradionecrosis is a debilitating condition that affects the quality of life by causing chronic pain, trismus, foul odor, reduced tissue healing capacity, and, in more severe cases, orocutaneous fistulae and pathological fractures (Iqbal and Kyzas, 2020). *In vitro* and *in vivo* research methodologies facilitate the assessment of new treatments by enabling molecular, cellular, and tissue-level analyses before clinical implementation. Furthermore, these methodologies can be used to elucidate the etiology of the disease. However, due to the

complexity and multifactorial nature of osteoradionecrosis, replicating this clinical condition in laboratory models continues to pose significant challenges. Literature indicates that pharmacological strategies are typically examined using *in vivo* mouse models (de Oliveira et al., 2022; Tamplen et al., 2011). Based on theoretical models of osteoradionecrosis, this study explores two possible laboratory *in vitro* approaches for studying the effects of ionizing radiation in osteoblastic cells (Figure 6).

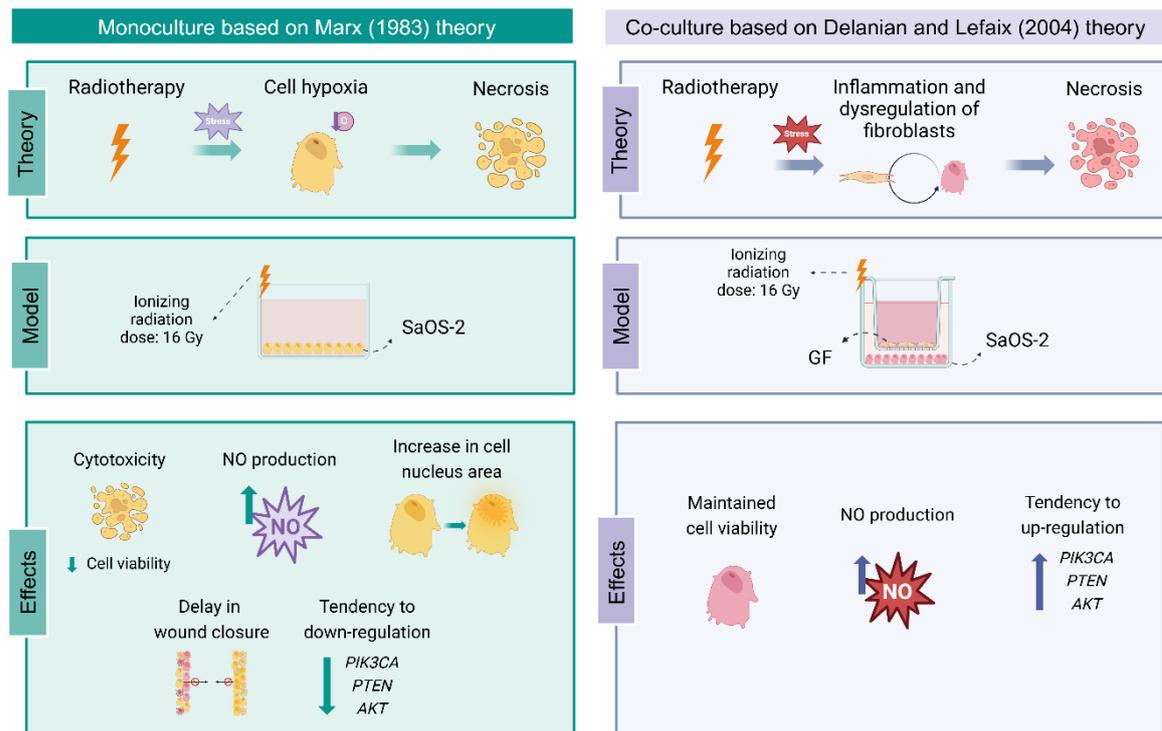


Figure 6: Theoretical models of osteoradionecrosis and laboratory models proposed by this study with the effects of ionizing radiation. Created with BioRender.com.

Few studies have investigated the effects of radiotherapy on osteoblastic cells. MC3T3-E1, derived from the calvaria of mice, were irradiated at 0.4, 4, 6, and 8 Gray, resulting in a dose-dependent decrease in cell proliferation (Dudziak et al., 2000, Gal et al., 2000, He et al., 2011). Similarly, primary human alveolar osteoblast cells irradiated at 2, 6, and 10 Gray, exhibited a dose-dependent reduction in cell proliferation and morphological changes (Amler et al., 2021). This is the first study to evaluate the effect of ionizing radiation on SaOS-2 cells, finding that low doses of radiation (4, 6, 8, and 10 Gray) did not significantly reduce cell proliferation. Therefore, SaOS-2 cells demonstrated resistance to ionizing radiation, with the

change in viability observed only at higher doses such as 12, 16, and 20 Gray. In co-culture, cells showed more resistance, with a reduction observed only in 20 Gray group.

In beam radiotherapy, high-energy photons (6–25 MV) are employed, depositing energy at a depth within the tissue while simultaneously shielding the skin from ionizing radiation exposure. Radiotherapy doses range from 8 to 30 Gray and can be administered in fractions or applied over a brief period (Allen, Her and Jaffray, 2017). The most conventional method is fractionated mode, in which the patient receives 2 Gray per fraction for five days per week for over five to seven weeks. Nevertheless, advancements in radiobiology have enabled the delivery of radiation to tumours with greater precision, accompanied by an increase in the utilization of higher doses per fraction administered over a shorter period (McBride and Schae, 2020). In this way, a dose of 16 Gray was considered feasible for mimicking osteoradionecrosis in the cells.

NO production induces bone formation and remodeling (Fox and Chow, 1998; Riancho et al., 1995). Mechanical stress, such as ultrasound, induces the synthesis of NO in bone cells, which promotes healing in osteoradionecrosis (Yang et al., 2010; Reher et al, 2002). However, NO is also a cytotoxic reactive radical present in inflammatory processes (Korhonen et al., 2005). In this study, 24 hours after 16 Gray irradiation, presenting cytotoxicity, reduced cell viability by almost 50%, and increased levels of NO expression, indicating that the irradiation caused cell stress. In co-culture, both stimulated groups showed an increased NO production. However, this effect was significant only in the group stimulated with the dose of 16 Gray. These findings highlight the dual role of NO in bone healing and inflammation, emphasizing the involvement in cytotoxicity and cell stress under irradiation conditions.

In physiological conditions, the SaOS-2 nucleus is smaller than the cytoplasm. Following irradiation, both irradiated groups demonstrated an overlap of the nucleus in relation to the cytoplasm. Consequently, a quantitative analysis was conducted to evaluate the measurement of the structures. This analysis allowed us to conclude that there was an increase in nucleus size that may be indicative of increased transcription. The enlarged nucleus may be indicative of increased transcription. Furthermore, a qualitative analysis revealed a lower number of cells per area in the irradiated groups, which is consistent with previous findings of cell viability. To our knowledge, this is the first study to analyze cell morphology using immunofluorescence in immortalized osteoblasts-like cells.

Cell migration is a crucial process in bone healing. Bone regeneration following injury commences with inflammatory signals and involves the infiltration of sensory nerve fibers. In mice lacking nerve growth factor, migration of osteogenic precursors to the injury site is reduced, resulting in a delay in bone healing (Xu et al., 2022). In this study, cell migration was evaluated using the scratch assay. Following a 12- and 24-hour incubation period, ionizing radiation was observed to inhibit cell migration. The group most affected by this phenomenon was the 16 Gray-irradiated group.

In monoculture, ionizing radiation showed a tendency to up-regulate the expression of *PIK3CA*, *AKT1*, and *PTEN* mRNA levels. Conversely, *mTOR* (mammalian target of rapamycin) did not present this tendency. However, this gene can be regulated by other intracellular signaling pathways. These pathways interact in a complex manner to regulate *mTOR* activity, influencing many physiological processes, including those related to cell growth, proliferation, and apoptosis suppression (Meng et al., 2020; Panwar et al., 2023). Therefore, our hypothesis suggests that the tendency to up-regulation of the PI3K pathway is related to the cytotoxicity. The study of PI3K pathway markers is employed to assess the efficacy of repair with therapies such as laser therapy (Monteiro et al., 2024; Pelliccioli et al., 2014) and curcumin (Borges et al., 2020). These same therapies can be used to manage osteoradionecrosis, therefore future studies should evaluate the influence of these interventions on the PI3K-AKT-mTOR pathway.

Also, there was no detectable gene expression of inflammatory cytokines post-exposure. Koyama et al. (2007) supplemented the culture medium with 5.0 ng/mL IL-1ra to evaluate the cytokines and receptors expression in SaOS-2 cells. In another study, when SaOS-2 was only cultured with the culture medium (DMEM and FBS), cytokines gene analysis was not detectable (Novello et al., 2022). Therefore, SaOS-2 cells might express genes encoding cytokines in specific settings. However, the stimulation of ionizing radiation was not sufficient to make possible the analysis of the gene expression profile. Conversely, co-culturing SaOS-2 with gingival fibroblasts, resulted in detectable *IL-6* gene expression. This finding supports the theory of the interaction between fibroblasts and osteoblasts that characterizes the pathogenesis of the osteoradionecrosis (Delanian and Lefaix, 2004). Thus, in co-culture, it is suggested that fibroblasts may attenuate the adverse effects of ionizing radiation. It is speculated that some mediator is released and interacts with SaOS-2 cells, providing a protective effect. However, the regulatory mechanisms of this pathway require further elucidation, and additional studies to investigate these processes are needed.

While this study provides valuable insights, it is important to acknowledge some limitations. The *in vitro* approach cannot fully replicate the physiological dynamics of the human organism, as laboratory conditions are controlled and do not reproduce the real complexity of the natural interactions, including long-term effects and interactions with microbial stimuli or inflammatory responses. These factors could potentially influence the observed cellular response. To address this, cells were also analyzed in co-culture to assess the impact of interactions between different cell types. In this way, the experiments were performed in biological triplicates, and all steps were performed by two researchers to minimize technical errors.

Building on this, while traditional *in vitro* models provide valuable insights, advances in biomedicine offer the possibility of establishing three-dimensional (3D) *in vitro* models. These 3D models more accurately represent complex tissue structure and are therefore more suitable for studying the physiology of the lesion and for evaluating pharmacological effects (Xie et al., 2023). Therefore, future studies should consider using 3D models to evaluate the effects of ionizing radiation for a more comprehensive understanding.

CONCLUSION

Osteoradionecrosis is a complex disease that is challenging to replicate in an *in vitro* model. This study analyzed the effects of ionizing radiation on osteoblastic cells and compared cellular mechanisms when cultured with human fibroblast. In monoculture, an irradiation dose of 16 Gray resulted in the reduction of cell viability, an increase in the production of NO, enlargement of the nucleus, delay of the wound closure, and a tendency for down-regulation of the PI3K-AKT-mTOR pathway genes in immortalized osteoblastic cells. However, in co-culture with gingival fibroblasts, the results were the opposite, with cellular protection that did not result in a significant drop in cell viability and a reduction in *IL-6* expression. This research represents the inaugural study to irradiate SaOS-2 cells, and further studies are required to substantiate these findings. Considering these findings by evaluating the cellular metabolism, this study suggests a potential dose for experimental studies of osteoradionecrosis and highlights the impact of intercellular interaction in etiopathogenesis.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Data Sharing and Data Accessibility

All data used for the study has been included in the manuscript.

Ethics approval

This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Human Research Ethics Committee of the Health Sciences College of the University of Brasilia (CAAE N° 52278221.6.0000.0030).

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work, DeepL Write Linguee (available on <https://www.linguee.com.br/>) was used to correct the grammar and vocabulary for linguistic review of grammar and vocabulary, in addition, to improving scientific writing with greater clarity and precision. Following the utilization of this website, the authors conducted a comprehensive review and editing of the material and assumed complete responsibility for the published article. It should be noted that no ideas or results were generated by AI, the tool was only used to improve scientific writing.

Funding sources

Supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES - Finance Code 001) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - Processo: 406557/2021-7, chamada CNPq/MCTI/FNDCT No 18/2021 - Faixa B - Grupos Consolidados).

REFERENCES

- Albiero, M. L., Stipp, R. N., Saito, M. T., Casati, M. Z., Sallum, E. A., Nociti, F. H., & Silvério, K. G. (2017). Viability and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Progenitor Cells Are Maintained After Incubation With *Porphyromonas gingivalis* Protein Extract. *Journal of Periodontology*, 88(11), e188–e199. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170116>
- Allen, C., Her, S., & Jaffray, D. A. (2017). Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.004>
- Alterio, D., Marvaso, G., Ferrari, A., Volpe, S., Orecchia, R., & Jereczek-Fossa, B. A. (2019). Modern radiotherapy for head and neck cancer. *Seminars in Oncology*, 46(3), 233–245. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.07.002>
- Amler, A. K., Schlauch, D., Tüzüner, S., Thomas, A., Neckel, N., Tinhofer, I., ... Nahles, S. (2021). Pilot investigation on the dose-dependent impact of irradiation on primary human alveolar osteoblasts in vitro. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99323-8>
- Beaumont, S., Bhatia, N., McDowell, L., Fua, T., McCullough, M., Celentano, A., & Yap, T. (2021). Timing of dental extractions in patients undergoing radiotherapy and the incidence of osteoradionecrosis: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 59(5), 511–523. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2020.10.006>
- Borges, G. A., Elias, S. T., Amorim, B., de Lima, C. L., Coletta, R. Della, Castilho, R. M., ... Guerra, E. N. S. (2020). Curcumin downregulates the PI3K–AKT–mTOR pathway and inhibits growth and progression in head and neck cancer cells. *Phytotherapy Research*, 34(12), 3311–3324. <https://doi.org/10.1002/ptr.6780>
- Bras, J., de Jonge, H. K. T., & van Merkesteyn, J. P. R. (1990). Osteoradionecrosis of the mandible: Pathogenesis. *American Journal of Otolaryngology--Head and Neck Medicine and Surgery*, 11(4), 244–250. [https://doi.org/10.1016/0196-0709\(90\)90084-9](https://doi.org/10.1016/0196-0709(90)90084-9)
- de Oliveira, S. V., dos Reis, T., Amorim, J., Rocha, F. S., Marques, M. M., Guerra, E. S., ... Gallo, C. B. (2022). Efficacy of photobiomodulation therapy on healing of ionizing irradiated bone: a systematic review of in vivo animal studies. *Lasers in Medical Science*, 37(9), 3379–3392. <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03649-2>

- Delanian, S., & Lefaix, J.-L. (2004). The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiotherapy and Oncology*, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.randonc.2004.08.021>
- Dudziak, M. E., Saadeh, P. B., Mehrara, B. J., Steinbrech, D. S., Greenwald, J. A., Gittes, G. K., & Longaker, M. T. (2000). The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 106(5), 1049–1061. <https://doi.org/10.1097/00006534-200010000-00015>
- Fox, S. W., & Chow, J. W. M. (1998). Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone*, 23(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(98\)00070-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(98)00070-2)
- Frankart, A. J., Frankart, M. J., Cervenka, B., Tang, A. L., Krishnan, D. G., & Takiar, V. (2021). Osteoradionecrosis: Exposing the Evidence Not the Bone. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 109(5), 1206–1218. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.12.043>
- Gal, T. J., Munoz-Antonia, T., Muro-Cacho, C. A., & Klotch, D. W. (2000). Radiation effects on osteoblasts in vitro: A potential role in osteoradionecrosis. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 126(9), 1124–1128. <https://doi.org/10.1001/archotol.126.9.1124>
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Guo, Z., Shu, Y., Zhou, H., Zhang, W., & Wang, H. (2014). Radiogenomics hePg to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment. *Carcinogenesis*, 36(3), 307–317. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv007>
- He, J., Qiu, W., Zhang, Z., Wang, Z., Zhang, X., & He, Y. (2011). Effects of irradiation on growth and differentiation-related gene expression in osteoblasts. *Journal of Craniofacial Surgery*, 22(5), 1635–1640. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e31822e5f66>
- Iqbal, Z., & Kyzas, P. (2020). Analysis of the critical dose of radiation therapy in the incidence of Osteoradionecrosis in head and neck cancer patients: a case series. *BDJ Open*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41405-020-00044-3>
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., & Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, 4(4), 471–

479. <https://doi.org/10.2174/1568010054526359>

- Koyama, Y., Mitsui, N., Suzuki, N., Yanagisawa, M., Sanuki, R., Isokawa, K., ... Maeno, M. (2008). Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Archives of Oral Biology*, 53(5), 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.12.004>
- Leonetti, J. P., Weishaar, J. R., Gannon, D., Harmon, G. A., Block, A., & Anderson, D. E. (2020). Osteoradionecrosis of the skull base. *Journal of Neuro-Oncology*, 150(3), 477–482. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03462-3>
- Marx, R. E. (1983). A New Concept of Its Pathophysiology. *Growth (Lakeland)*, 41(5), 283–288. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6572704>
- McBride, W. H., & Schaeue, D. (2020). Radiation-induced tissue damage and response. *Journal of Pathology*, 250(5), 647–655. <https://doi.org/10.1002/path.5389>
- Meng, C., Xia, Q., Wu, H., Huang, H., Liu, H., Li, Y., ... Song, W. (2020). Photobiomodulation with 630-nm LED radiation inhibits the proliferation of human synoviocyte MH7A cells possibly via TRPV4/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Lasers in Medical Science*, 35(9), 1927–1936. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-02977-5>
- Monteiro, M. M., Amorim dos Santos, J., Paiva Barbosa, V., Rezende, T. M. B., & Guerra, E. N. S. (2024). Photobiomodulation effects on fibroblasts and keratinocytes after ionizing radiation and bacterial stimulus. *Archives of Oral Biology*, 159(October 2023), 105874. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105874>
- Novello, S., Tricot-Doleux, S., Novella, A., Pellen-Mussi, P., & Jeanne, S. (2022). Influence of Periodontal Ligament Stem Cell-Derived Conditioned Medium on Osteoblasts. *Pharmaceutics*, 14(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040729>
- Panwar, V., Singh, A., Bhatt, M., Tonk, R. K., Azizov, S., Raza, A. S., ... Garg, M. (2023). Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01608-z>
- Pelliccioli, A. C. A., Martins, M. D., Dillenburg, C. S., Marques, M. M., Squarize, C. H., & Castilho, R. M. (2014). Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Journal*

- of Biomedical Optics*, 19(2), 028002. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.2.028002>
- Rahman, Q. B., Iocca, O., Kufta, K., & Shanti, R. M. (2020). Global Burden of Head and Neck Cancer. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 32(3), 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2020.04.002>
- Riancho, José A.; Salas, Eduardo; Zarrabeitia, María T.; Olmos, José M.; Amado, José A.; Fernández-Luna, José L.; Macías-Gonzalez, J. (1995). Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(3), 179–185. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(98\)00173-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(98)00173-2)
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Singh, A., Huryn, J. M., Kronstadt, K. L., Yom, S. H. K., Randazzo, J. R., & Estilo, C. L. (2022). Osteoradionecrosis of the jaw: A mini review. *Frontiers in Oral Health*, 3(April). <https://doi.org/10.3389/froh.2022.980786>
- Tamplen, M., Trapp, K., Nishimura, I., Armin, B., Steinberg, M., Beumer, J., ... Nabili, V. (2011). Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 145(3), 404–410. <https://doi.org/10.1177/0194599811400576>
- Topkan, E., Kucuk, A., Somay, E., Yilmaz, B., Pehlivan, B., & Selek, U. (2023). Review of Osteoradionecrosis of the Jaw: Radiotherapy Modality, Technique, and Dose as Risk Factors. *Journal of Clinical Medicine*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/jcm12083025>
- Xie, R., Pal, V., Yu, Y., Lu, X., Gao, M., Liang, S., Huang, M., Peng, W., & Ozbolat, I. T. (2024). A comprehensive review on 3D tissue models: Biofabrication technologies and preclinical applications. *Biomaterials*, 304, 122408. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122408>
- Xu, J., Zheng, Z., Fang, D., Gao, R., Liu, Y., Fan, Z. P., ... Wang, S. L. (2012). Early-stage pathogenic sequence of Jaw osteoradionecrosis in vivo. *Journal of Dental Research*, 91(7), 702–708. <https://doi.org/10.1177/0022034512448661>
- Xu, Jiajia, Li, Z., Tower, R. J., Negri, S., Wang, Y., Meyers, C. A., ... James, A. W. (2022). NGF-p75 signaling coordinates skeletal cell migration during bone repair. *Science Advances*, 8(11). <https://doi.org/10.1126/sciadv.ab15716>

Yang, Jong Hoon, M.-H., Lim, K.-T., Choung, P.-H., & Cho, C.-S. (2010). Application of Ultrasound Stimulation in Bone Tissue Engineering. *International Journal of Stem Cells*, 3(2), 74–79.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table Appendix 1 - The Primers' sequences used in RT-qPCR

Name	Sequence	Scale	Purification
<i>PIK3CA_F</i>	CCACGACCATCATCAGGTGAA	100 nm	STD
<i>PIK3CA_R</i>	CCTCACGGAGGCATTCTAAAGT	100 nm	STD
<i>mTOR_F</i>	GCAGATTTGCCAACTATCTTCGG	100 nm	STD
<i>mTOR_R</i>	CAGCGGTAAAAGTGTCCCCTG	100 nm	STD
<i>AKT1_F</i>	TCCTCCTCAAGAATGATGGCA	100 nm	STD
<i>AKT1_R</i>	GTGCGTTCGATGACAGTGGT	100 nm	STD
<i>PTEN_F</i>	TTTGAAGACCATAACCCACCAC	100 nm	STD
<i>PTEN_R</i>	ATTACACCAGTTCGTCCCTTTC	100 nm	STD
<i>β-ACTIN_F</i>	TCACCCACACTGTGCCCATCTACG	100 nm	STD
<i>β-ACTIN_R</i>	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG	100 nm	STD
<i>IL-1β_F</i>	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	100 nm	STD
<i>IL-1β_R</i>	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA	100 nm	STD
<i>IL-6_F</i>	CCTGAACCTTCCAAAGATGGC	100 nm	STD
<i>IL-6_R</i>	TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA	100 nm	STD
<i>NF-kappa B_F</i>	AACAGAGAGGATTCGTTTCCG	100 nm	STD
<i>NF-kappa B_R</i>	TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT	100 nm	STD

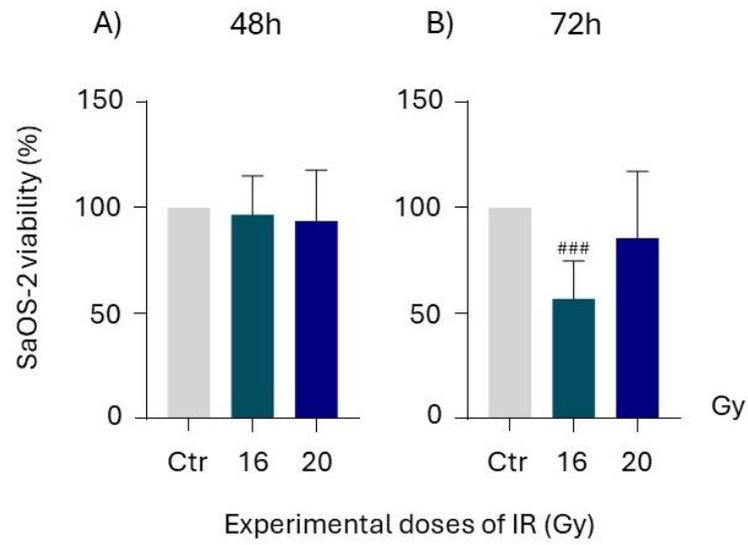


Figure Appendix 1: SaOS-2 viability by the MTT assay after induction with 16 and 20 Gray of ionizing radiation after 48 (A) and 72 (B) hours. Samples: N=9 for all conditions. Statistical analysis: A) $p > 0.05$, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA; B) ### $p < 0.001$, experimental doses compared to control - Kruskal Wallis test.

Table Appendix 2 - Descriptive analyses of RT-qPCR

Model	Monoculture SaOS-2			Co-culture SaOS-2 /gingival fibroblast		
	0 Gray	16 Gray	p value*	0 Gray	16 Gray	p value*
PIK3CA	0.9608 (0.37-2.7)	0.8999 (0.24-0.97)	p>0.05	0.9862 (0.85-1.1)	1.330 (0.85-1.8)	p>0.05
mTOR	0.9854 (0.7-1.3)	1.263 (1.1-2.5)	p>0.05	0.8938 (0.86-1.2)	0.9268 (0.71-1.4)	p>0.05
AKT	0.8640 (0.84-1.3)	0.7436 (0.37-0.75)	p>0.05	0.9624 (0.72-1.4)	1.167 (1.0-1.5)	p>0.05
PTEN	1.145 (0.15-5.5)	0.6972 (0.53-1.5)	p>0.05	1.058 (0.83-1.1)	1.166 (1.1-1.4)	p>0.05
IL-6	No detectable	No detectable	p>0.05	0.7255 (0.36-3.7)	0.3784 (0.22-1.6)	p>0.05

Samples: N=3, for all conditions. Statistical analysis: *p>0.05, comparing 16 Gray to control - Mann-Whitney test.

Genes expression in SaOS-2 after ionizing radiation

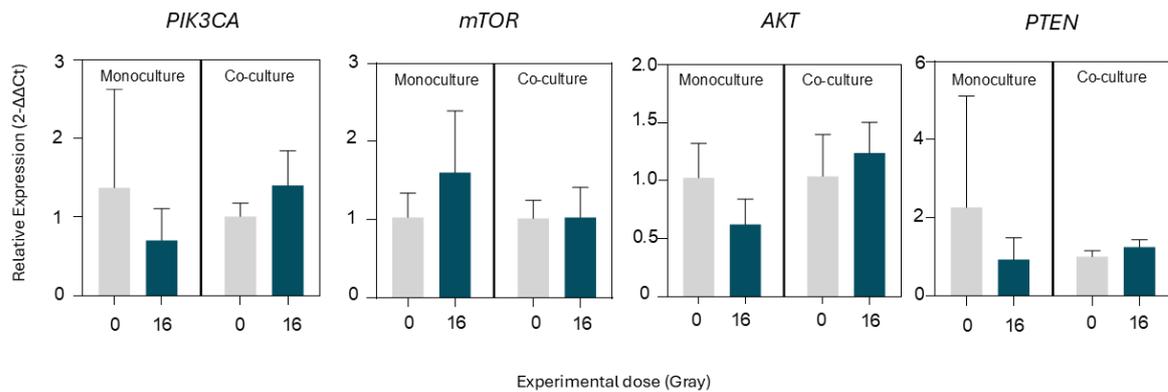


Figure Appendix 2: Relative expression of PI3K-AKT-mTOR pathway by RT-qPCR in SaOS-2 cells following 24 hours of exposure to ionizing radiation in mono or co-culture with gingival fibroblasts submitted to 16 Gray. **Samples:** N=3, for all conditions. **Statistical analysis:** p>0.05, experimental doses compared to control - Ordinary one-way ANOVA.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A radioterapia é um tratamento essencial e amplamente utilizado para o câncer de cabeça e pescoço. Dependendo do estágio da doença, pode ser empregada isoladamente ou em combinação com cirurgia e/ou quimioterapia. No entanto, a radiação ionizante não se restringe apenas ao tecido tumoral, podendo também afetar tecidos saudáveis, resultando em toxicidades. Entre as toxicidades tardias, a osteorradionecrose (ORN) destaca-se como uma complicação grave que impacta significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Clinicamente, a condição caracteriza-se por áreas de osso necrosado e exposto que não cicatrizam após vários meses, localizadas em regiões previamente irradiadas. Além disso, os pacientes podem apresentar outros sinais e sintomas, como dor persistente, odor desagradável e infecções recorrentes, tornando a ORN uma condição debilitante. No que diz respeito ao tratamento, ainda não há consenso sobre a melhor abordagem terapêutica. Dependendo do estágio da lesão, podem ser adotadas terapias conservadoras com tratamentos não invasivos ou intervenções cirúrgicas, como o desbridamento de tecido necrótico e a reconstrução óssea.

Portanto, são necessários novos estudos tanto de terapias inovadoras quanto de abordagens já empregadas clinicamente, permitindo uma análise detalhada em nível celular e molecular. No entanto, devido à complexidade da ORN, a replicação dessa condição em modelos laboratoriais permanece um desafio. Assim, este trabalho fundamenta-se nas duas principais teorias da patogênese da ORN. Foram desenvolvidos dois modelos *in vitro* que exploram a etiopatogenia da doença e que podem ser utilizados em pesquisas futuras para avaliar a modulação do processo de reparo ósseo em modelos pré-clínicos com células.

O modelo de monocultura de células SaOS-2 é baseado na teoria de Marx (1983), que postula que a causa primária da necrose é a radiação, resultando em hipóxia e morte celular. Nossos resultados preliminares com o ensaio de MTT mostraram que baixas doses de radiação ionizante não causaram citotoxicidade significativa. Entretanto, a dose de 16 Gray foi citotóxica, reduzindo consideravelmente a viabilidade celular. Além disso, observou-se um aumento na produção de óxido nítrico, um marcador inflamatório, confirmando o estado inflamatório induzido pela radiação. Essa mesma dose também provocou alterações morfológicas nas células, com aumento do núcleo em relação ao citoplasma, sugerindo uma possível elevação na atividade transcricional. No ensaio de arranhão, verificou-se um atraso no fechamento da ferida nos grupos irradiados em

comparação com o grupo controle, que apresentou uma cicatrização mais rápida. Por fim, houve uma regulação negativa na expressão dos genes da via PI3K-AKT-mTOR, o que está de acordo com a redução da capacidade de proliferação celular após a irradiação. Portanto, este é um modelo *in vitro* simples, de baixo custo, que pode ser utilizado para avaliar a modulação do processo de reparo ósseo.

Por outro lado, o modelo de co-cultura foi estabelecido com células SaOS-2 e fibroblastos gengivais humanos primários, utilizando membranas Transwell, que permitem a troca de sinalizadores entre os diferentes tipos celulares. Este modelo baseia-se na teoria de Delanian e Lefaix (2004), que sugere que a osteorradionecrose resulta de estresse oxidativo e inflamação precoce, levando à desregulação dos fibroblastos, fibrose, e comprometendo a remodelação óssea adequada. Em co-cultura, observamos uma proteção celular: a dose de 16 Gray não reduziu a viabilidade celular de forma tão acentuada quanto no modelo de monocultura. No entanto, houve um aumento na produção de óxido nítrico, indicando um processo inflamatório nas células. Além disso, verificou-se uma regulação positiva na expressão dos marcadores gênicos da via PI3K-AKT-mTOR, consistente com os resultados do ensaio de MTT, que sugerem que não houve redução na proliferação celular. Esse modelo de co-cultura, embora mais complexo, oferece uma abordagem mais realista para avaliar tratamentos na presença de dois tipos celulares, tornando-o mais próximo da realidade clínica.

Dessa forma, este trabalho é pioneiro na proposição de dois modelos *in vitro* de osteorradionecrose, que podem ser utilizados em pesquisas futuras para avaliar a modulação do processo de reparo ósseo e aprofundar o estudo da etiopatogenia dessa condição. No entanto, é importante destacar que esses modelos apresentam limitações, já que não é possível reproduzir em laboratório toda a complexidade da osteorradionecrose. Ainda assim, apesar das restrições inerentes aos modelos celulares, essa abordagem se mostra uma alternativa rápida, de baixo custo, e que reduz a necessidade do uso de modelos animais.

Como mencionado anteriormente, este projeto está em continuidade. A avaliação da modulação do processo de reparo nos modelos estabelecidos nesta dissertação será realizada durante o doutorado. Os dois modelos *in vitro* serão tratados com curcumina, bpV(pic) e fotobiomodulação (PBMT), com o objetivo de avaliar o reparo celular induzido por essas terapias. A curcumina é um fitoterápico com destacadas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, capaz de modular o processo de cicatrização e reduzir a perda óssea. Dada essas características, surge como uma alternativa promissora para a prevenção e tratamento

da osteorradiocrose. Entretanto, até o momento, não existem registros na literatura científica de estudos que explorem o uso da curcumina com esse propósito específico. Da mesma forma, compostos de bisperoxovanádio, conhecidos por serem inibidores de PTEN, atuam como antagonistas da via PI3K-AKT-mTOR, promovendo a proliferação celular por meio da ativação dessa via. Apesar de seu potencial biológico, esses compostos ainda não foram investigados no contexto do reparo ósseo. Além disso, a terapia de fotobiomodulação (PBMT) é amplamente utilizada na prática clínica como um tratamento conservador, capaz de modular a resposta inflamatória, estimular a proliferação e migração celular, e promover a cicatrização de feridas crônicas. Atualmente, relatos de casos publicados na literatura indicam desfechos bem-sucedidos com o uso da PBMT. No entanto, é importante ressaltar que essa terapia tem sido empregada principalmente como uma abordagem coadjuvante, o que limita conclusões definitivas sobre seu benefício isolado no manejo da osteorradiocrose.

Dessa forma, nosso próximo objetivo será investigar os efeitos da curcumina, do bpV(pic) e da fotobiomodulação nos modelos *in vitro* de osteorradiocrose propostos por este trabalho, buscando avaliar a viabilidade celular, a resposta inflamatória e o potencial de reparo tecidual. Inicialmente, será realizado o ensaio MTT para analisar a viabilidade celular, no qual diferentes concentrações de cada tratamento serão aplicadas. Esse ensaio servirá como um passo fundamental para determinar as doses mais eficazes, ou seja, aquelas que conseguem proteger as células do efeito citotóxico causado pela radiação ionizante, minimizando a morte celular. Uma vez estabelecidas as doses ideais, avançaremos para a análise da mensuração de NO como indicador da modulação do processo inflamatório pós-tratamento. A inflamação é uma característica central da osteorradiocrose, e a mensuração do NO nos permitirá avaliar como cada tratamento interfere na resposta inflamatória, especialmente considerando que tanto a curcumina quanto a PBMT possuem propriedades anti-inflamatórias bem conhecidas. Além disso, a morfologia celular será avaliada por meio de imunofluorescência, com o objetivo de verificar alterações estruturais nas células após os tratamentos. Essa técnica fornecerá informações visuais detalhadas sobre a integridade celular e possíveis modificações induzidas pelas terapias. Paralelamente, será realizado o ensaio de migração celular (scratch assay), que permitirá avaliar o impacto dos tratamentos na capacidade de fechamento da ferida. Espera-se que os tratamentos propostos acelerem esse processo, o que seria um indicativo positivo de seu potencial de reparo tecidual. Para complementar essas análises, também avaliaremos a produção de células-tronco

mesenquimais, um fator importante no processo de regeneração óssea. A citometria de fluxo será utilizada para o ensaio de apoptose celular e para a medição da produção de ROS, uma vez que o controle da apoptose e do estresse oxidativo são fatores-chave na sobrevivência celular após a exposição à radiação. Por fim, será realizada uma análise da expressão gênica de biomarcadores relacionados à via PI3K-PTEN-AKT-mTOR. Essa análise é essencial para entender como as terapias propostas interferem nas vias moleculares envolvidas na proliferação celular. Ao avaliar essas vias, pretendemos esclarecer o papel da curcumina, do bpV(pic) e da PBMT no estímulo à proliferação celular e à reparação óssea em modelos de osteorradiocrecrose.

Dessa forma, a investigação das vias de reparo em um modelo de osteorradiocrecrose poderá contribuir para um melhor entendimento da fisiologia do reparo ósseo após a irradiação ionizante. Espera-se que esses estudos possam propor novos tratamentos como alternativas clínicas viáveis, impactando positivamente na qualidade de vida dos pacientes oncológicos e reduzindo os custos associados a tratamentos ineficazes.

6. REFERÊNCIAS (introdução e métodos)

- Aarup-Kristensen S, Hansen CR, Forner L, Brink C, Eriksen JG, J. J. (2019). Osteoradionecrosis of the mandible after radiotherapy for head and neck cancer: risk factors and dose-volume correlations. *Acta Oncol.*, 58(10), 1373–1377. <https://doi.org/doi:10.1080/0284186X.2019.1643037>
- Alfouzan, A. F. (2021). Radiation therapy in head and neck cancer. *Saudi Medical Journal*, 42(3), 247–254. <https://doi.org/10.15537/SMJ.2021.42.3.20210660>
- Allen, C., Her, S., & Jaffray, D. A. (2017). Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.004>
- Alterio, D., Marvaso, G., Ferrari, A., Volpe, S., Orecchia, R., & Jereczek-Fossa, B. A. (2019). Modern radiotherapy for head and neck cancer. *Seminars in Oncology*, 46(3), 233–245. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.07.002>
- ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org. . (2010). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde* (2nd ed.). Rio de Janeiro.
- Amler, A. K., Schlauch, D., Tüzüner, S., Thomas, A., Neckel, N., Tinhofer, I., ... Nahles, S. (2021). Pilot investigation on the dose-dependent impact of irradiation on primary human alveolar osteoblasts in vitro. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99323-8>
- Bensadoun, René Jean. (2018). Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. *Current Opinion in Oncology*, 30(4), 226–232. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000452>
- Bensadoun, Rene Jean, Nair, R. G., & Robijns, J. (2020). Photobiomodulation for Side Effects of Cancer Therapy. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 38(6), 323–325. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4759>
- Borkowska, E. M., Barańska, M., Kowalczyk, M., & Pietruszewska, W. (2021). Detection of pik3ca gene mutation in head and neck squamous cell carcinoma using droplet digital per

- and rt-qpcr. *Biomolecules*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/biom11060818>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Cao, L., Graue-Hernandez, E. O., Tran, V., Reid, B., Pu, J., Mannis, M. J., & Zhao, M. (2011). Downregulation of PTEN at corneal wound sites accelerates wound healing through increased cell migration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *52*(5), 2272–2278. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5972>
- Chauhan, A., Sah, D. K., Kumari, N., Kalra, N., Soni, R., & Bhatt, A. N. (2021). PTEN inhibitor bpV(HOpic) confers protection against ionizing radiation. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80754-8>
- Chronopoulos, A., Zarra, T., Ehrenfeld, M., & Otto, S. (2017). Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. *International Dental Journal*, *68*(1), 22–30. <https://doi.org/10.1111/idj.12318>
- Citrin, D. E., & Mitchell, J. B. (2017). Mechanisms of Normal Tissue Injury From Irradiation. *Seminars in Radiation Oncology*, *27*(4), 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.001>
- De Felice, F., Tombolini, V., Musio, D., & Polimeni, A. (2020). Radiation Therapy and Mandibular Osteoradionecrosis: State of the Art. *Current Oncology Reports*, *22*(9). <https://doi.org/10.1007/s11912-020-00954-3>
- de Oliveira, S. V., dos Reis, T., Amorim, J., Rocha, F. S., Marques, M. M., Guerra, E. S., ... Gallo, C. B. (2022). Efficacy of photobiomodulation therapy on healing of ionizing irradiated bone: a systematic review of in vivo animal studies. *Lasers in Medical Science*, *37*(9), 3379–3392. <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03649-2>
- Delanian, S., & Lefaix, J.-L. (2004). The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiotherapy and Oncology*, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.randonc.2004.08.021>
- Dörr, W., Hamilton, C. S., Boyd, T., Reed, B., & Denham, J. W. (2002). Radiation-induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. *International Journal of*

- Radiation Oncology Biology Physics*, 52(4), 911–917. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(01\)02721-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(01)02721-3)
- Dudziak, M. E., Saadeh, P. B., Mehrara, B. J., Steinbrech, D. S., Greenwald, J. A., Gittes, G. K., & Longaker, M. T. (2000). The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 106(5), 1049–1061. <https://doi.org/10.1097/00006534-200010000-00015>
- Elad, S., Yarom, N., Zadik, Y., Kuten-Shorrer, M., & Sonis, S. T. (2022). The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 57–77. <https://doi.org/10.3322/caac.21704>
- Escudero, J. S. B., Perez, M. G. B., de Oliveira Rosso, M. P., Buchaim, D. V., Pomini, K. T., Campos, L. M. G., ... Buchaim, R. L. (2019). Photobiomodulation therapy (PBMT) in bone repair: A systematic review. *Injury*, 50(11), 1853–1867. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.09.031>
- Ewing J. Radiation osteitis. *Acta Radiol* 1926 6: 399–412
- Frankart, A. J., Frankart, M. J., Cervenka, B., Tang, A. L., Krishnan, D. G., & Takiar, V. (2021). Osteoradionecrosis: Exposing the Evidence Not the Bone. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 109(5), 1206–1218. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.12.043>
- Gal, T. J., Munoz-Antonia, T., Muro-Cacho, C. A., & Klotch, D. W. (2000). Radiation effects on osteoblasts in vitro: A potential role in osteoradionecrosis. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 126(9), 1124–1128. <https://doi.org/10.1001/archotol.126.9.1124>
- Gianfaldoni, S., Gianfaldoni, R., Wollina, U., Lotti, J., Tchernev, G., & Lotti, T. (2017). An overview on radiotherapy: From its history to its current applications in dermatology. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(4 Special Issue GlobalDermatology), 521–525. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.122>
- Girardi, F. M., Wagner, V. P., Martins, M. D., Abentroth, A. L., Hauth, L. A., Neto, L. K., ... Matiello, J. (2022). Risk factors for jaw osteoradionecrosis: a case control study. *Brazilian Oral Research*, 36, 1–10. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2022.vol36.0132>
- Gormley, M., Creaney, G., Schache, A., Ingarfield, K., & Conway, D. I. (2022). Laura, Q.M.;

- Chow, M.D. Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2020, 382, 60–72. *British Dental Journal*, 233(9), 780–786.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Guan, G., Lei, L., Lv, Q., Gong, Y., & Yang, L. (2019). Curcumin attenuates palmitic acid-induced cell apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress in H9C2 cardiomyocytes. *Human and Experimental Toxicology*, 38(6), 655–664. <https://doi.org/10.1177/0960327119836222>
- Guo, Z., Shu, Y., Zhou, H., Zhang, W., & Wang, H. (2014). Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment. *Carcinogenesis*, 36(3), 307–317. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv007>
- Hamblin, M. R. (2017). Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophysics*, 4(3), 337–361. <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.337>
- Hatefi, M., Ahmadi, M. R. H., Rahmani, A., Dastjerdi, M. M., & Asadollahi, K. (2018). Effects of Curcumin on Bone Loss and Biochemical Markers of Bone Turnover in Patients with Spinal Cord Injury. *World Neurosurgery*, 114, e785–e791. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.03.081>
- He, J., Qiu, W., Zhang, Z., Wang, Z., Zhang, X., & He, Y. (2011). Effects of irradiation on growth and differentiation-related gene expression in osteoblasts. *Journal of Craniofacial Surgery*, 22(5), 1635–1640. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e31822e5f66>
- Iqbal, Z., & Kyzas, P. (2020). Analysis of the critical dose of radiation therapy in the incidence of Osteoradionecrosis in head and neck cancer patients: a case series. *BDJ Open*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41405-020-00044-3>
- Kalhari, K. A. M., Vahdatinia, F., Jamalpour, M. R., Vescovi, P., Fornaini, C., Merigo, E., & Fekrazad, R. (2019). Photobiomodulation in Oral Medicine. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 37(12), 837–861. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4706>
- Laura Q.M. Chow. (2020). Head and Neck Cancer. *The New England Journal of Medicine*,

- 382(1), 60–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1715715>
- Leonetti, J. P., Weishaar, J. R., Gannon, D., Harmon, G. A., Block, A., & Anderson, D. E. (2020). Osteoradionecrosis of the skull base. *Journal of Neuro-Oncology*, *150*(3), 477–482. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03462-3>
- Lyons, A., Osher, J., Warner, E., Kumar, R., & Brennan, P. A. (2014). Osteoradionecrosis - A review of current concepts in defining the extent of the disease and a new classification proposal. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *52*(5), 392–395. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2014.02.017>
- Ma, B., Guan, G., Lv, Q., & Yang, L. (2021). Curcumin ameliorates palmitic acid-induced SaOS-2 cell apoptosis via inhibiting oxidative stress and autophagy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2021*. <https://doi.org/10.1155/2021/5563660>
- Marques, M. M., Diniz, I. M. A., De Cara, S. P. H. M., Pedroni, A. C. F., Abe, G. L., D’Almeida-Couto, R. S., ... Moreira, M. S. (2016). Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomedicine and Laser Surgery*, *34*(11), 500–508. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4038>
- Marx, R. E. (1983a). A new concept in the treatment of osteoradionecrosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *41*(6), 351–357. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(83\)80005-6](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(83)80005-6)
- Marx, R. E. (1983b). A New Concept of Its Pathophysiology. *Growth (Lakeland)*, *41*(5), 283–288. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6572704>
- McBride, W. H., & Schaeue, D. (2020). Radiation-induced tissue damage and response. *Journal of Pathology*, *250*(5), 647–655. <https://doi.org/10.1002/path.5389>
- Menon, V. P., & Sudheer, A. R. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *595*(September 2001), 105–125. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_3
- Mosca, R. C., Adrian, Albasha, O., Bass, K., & Arany, P. (2019). Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photoceutical Approach. *Wound Care*, *25*(1), 157–167.
- Nabil, S., & Samman, N. (2011). Incidence and prevention of osteoradionecrosis after dental extraction in irradiated patients: A systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *40*(3), 229–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2010.10.005>

- Naseer A, Goode F, D. T. (2024). Osteoradionecrosis - an old problem with new consequences. *Curr Opin Support Palliat Care.*, 18(1), 39–46. <https://doi.org/doi:10.1097/SPC.0000000000000690>
- Nora Kahenasa, Eric C. Sung, Vishad Nabili, Jim Kelly, Neal Garret, I. N. (2012). Resolution of pain and complete healing of mandibular osteoradionecrosis using pentoxifylline and tocopherol: a case report. *OOOO*, 113(4), e18–e23.
- Normando, A. G. C., de Meneses, A. G., de Toledo, I. P., Borges, G. Á., de Lima, C. L., dos Reis, P. E. D., & Guerra, E. N. S. (2019). Effects of turmeric and curcumin on oral mucositis: A systematic review. *Phytotherapy Research*, 33(5), 1318–1329. <https://doi.org/10.1002/ptr.6326>
- Pelliccioli, A. C. A., Martins, M. D., Dillenburg, C. S., Marques, M. M., Squarize, C. H., & Castilho, R. M. (2014). Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Journal of Biomedical Optics*, 19(2), 028002. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.2.028002>
- Peterson, D. E., Koyfman, S. A., Yarom, N., Lynggaard, C. D., Ismaila, N., Forner, L. E., ... Saunders, D. (2024). Prevention and Management of Osteoradionecrosis in Patients With Head and Neck Cancer Treated With Radiation Therapy: ISOO-MASCC-ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 42(16), 1975–1996. <https://doi.org/10.1200/JCO.23.02750>
- Raggio, B. S., & Winters, R. (2018). Modern management of osteoradionecrosis. *Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, 26(4), 254–259. <https://doi.org/10.1097/MOO.0000000000000459>
- Rahman, Q. B., Iocca, O., Kufta, K., & Shanti, R. M. (2020). Global Burden of Head and Neck Cancer. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 32(3), 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2020.04.002>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660

- Szyfter, K. (2021). Genetics and molecular biology of head and neck cancer. *Biomolecules*, 11(9), 10–11. <https://doi.org/10.3390/biom11091293>
- Tamplen, M., Trapp, K., Nishimura, I., Armin, B., Steinberg, M., Beumer, J., ... Nabili, V. (2011). Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 145(3), 404–410. <https://doi.org/10.1177/0194599811400576>
- Watson EE, Hueniken K, Lee J, Huang SH, El Maghrabi A, Xu W, Moreno AC, Tsai CJ, Hahn E, McPartlin AJ, Yao CMKL, Goldstein DP, De Almeida JR, Waldon JN, Fuller CD, Hope AJ, Ruggiero SL, Glogauer M, H. A. (2024). Development and Standardization of an Osteoradionecrosis Classification System in Head and Neck Cancer: Implementation of a Risk-Based Model. *J Clin Oncol.*, 42(16), 1922–1933. <https://doi.org/doi:10.1200/JCO.23.01951>
- Y. He, Z. Liu, Z. Tian, T. Dai, W. Qiu, Z. Z. (2015). Retrospective analysis of osteoradionecrosis of the mandible: Proposing a novel clinical classification and staging system. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 44, 1547–1557.
- Zadic, Y., Arany, P. R., Fregnari, E. R., Bossei, P., Antunes, H. S., Bensadoun, R.-J., ... Elad, S. (2020). Systematic review of growth factors and cytokines for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Supportive Care in Cancer*, 28(5), 2485–2498. <https://doi.org/10.1007/s00520-019-05170-9>

7. ANEXOS

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO
CEP/FS/UnB



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modelo in vitro de lesão radioinduzida estabelecido com cultura primária de Fibroblastos Gengivais Humanos

Pesquisador: MYLENE MARTINS MONTEIRO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52278221.6.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.212.117

Apresentação do Projeto:

Conforme o documento 'PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809826.pdf' postado em 17/01/2022:

"Desenho:

Para o estudo, será utilizada cultura primária de fibroblastos gengivais humanos. Serão coletados fragmentos de gengiva íntegra de 20 participantes de 18 a 25 anos. Os fragmentos deverão ser íntegros, sem inflamação e serem removidos durante procedimento odontológico a serem realizados indicados por um profissional, não estando vinculado ao projeto. Os procedimentos podem ser extração de dentes terceiros molares, inclusos ou não, extração de pré-molares, indicado pela ortodontia, ou cirurgia para instalação de implantes dentários osseointegrados. Após a coleta do explante, eles serão transportados ao laboratório em isopor contendo gelo, onde será lavado com solução salina de fosfato tamponada, fragmentado em partes de aproximadamente 1mm. Os fragmentos serão dispostos em placas e mantidos em condições ideais, em incubadora úmida, com troca regular do meio de cultura. Ao atingirem a confluência ideal, as células serão desprendidas das placas com solução de tripsina acrescida de EDTA e centrifugadas. As células poderão ser armazenadas em congelador a -80oC, sem identificação do doador, ou serem distribuídas em novas placas para realização dos experimentos ou expansão da cultura. Todas as células serão tratadas com a associação de três estímulos - lipopolissacarídeos (LPS – 10g/ml) de

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), extrato proteico de *Porphyromonas gingivalis* (Pg – 5g/ml), e 8 Gray (Gy) de radiação ionizante (RI) para a obtenção de lesão celular radioinduzida. Como tratamento, as células serão divididas em 4 grupos. O primeiro grupo será o grupo controle. O segundo grupo será tratado com 2,5 M de curcumina (referência 08511), adquirida da empresa Sigma- Aldrich (San Luis, Missouri, EUA), em forma liofilizada e com grau de pureza padrão analítico. O terceiro grupo será tratado com fotobiomodulação, utilizando um laser de baixa potência. O quarto grupo será associada a culmina ao laser de baixa potência."

Resumo:

A curcumina e a fotobiomodulação (PBM) são terapias de interesse em estudos, pelas propriedades anti-inflamatórias e de reparação tecidual. Como a sinalização da via PI3K-AKT-mTOR promove proliferação celular, estimulando regeneração, remodelação e reepitelização, a modulação dela pela aplicação de curcumina e PBM podem ser alternativas promissoras para reparo de lesões radioinduzidas. Objetiva-se analisar efeitos da curcumina e da fotobiomodulação nos processos de regeneração e reparo, em modelos *in vitro*, de lesões radioinduzidas. Serão utilizados queratinócitos humanos imortalizados e cultura primária de fibroblastos gengivais humanos. A lesão celular será induzida com três estímulos associados, lipopolissacarídeo de *E.coli*, extrato proteico de *P.gingivalis* e radiação ionizante. Como tratamento modulador, serão aplicados 2,5M de curcumina (definida em estudo anterior - referência 08511, Sigma Aldrich) e PBM (a definir pelo teste de viabilidade celular), de maneira isolada e/ou associada. Para analisar os efeitos, foram propostos os grupos experimentais: Queratinócito: [1] Veículo; [2] Curcumina (2,5M); [3] PBM (dose previamente definida); [3] Curcumina (2,5M) + PBM (dose previamente definida); Fibroblasto: [1] Veículo; [2] Curcumina (2,5M); [3] PBM (dose previamente definida); [3] Curcumina (2,5M) + PBM (dose previamente definida). Serão aplicados testes de viabilidade celular, cicatrização e migração celular, e avaliada expressão gênica de citocinas pró inflamatórias (TNF, IL1, IL6, NFkB) e sinalizadores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR. Espera-se contribuir no desenvolvimento de protocolos de tratamento para lesões radioinduzidas pela modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, incentivando o aperfeiçoamento de fármacos associados com a terapia por PBM, como alternativa clínica viável para o SUS.

Introdução:

A curcumina, polifenol isolado da cúrcuma longa, vem sendo estudada como uma terapia

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

promissora, tendo em vista seus efeitos biológicos com propriedades antitumorais, antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Autores revisaram uma série de ensaios clínicos mostrando os efeitos da curcumina no tratamento de diferentes doenças inflamatórias humanas, com poucos efeitos adversos. No que diz respeito ao reparo tecidual, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a aplicação tópica de preparos à base desse polifenol contribui para a redução da resposta inflamatória e acelera o fechamento de feridas. Com isso, a identificação de vias sinalizadoras que respondem à ação da curcumina é um tema de constante interesse, com o objetivo de desenvolver terapias específicas. Estudos recentes sugerem a ação da curcumina como reguladora da expressão gênica e proteica da via PI3K-AKT-mTOR em células tumorais, quando usada em altas doses. Entretanto, a sinalização dessa via, modulada por doses mais baixas de curcumina, para a obtenção de reparo tecidual, ainda não é muito explorada pela literatura. De forma similar, a fotobiomodulação (PBM) é outra opção terapêutica em recorrente foco de análise, por influenciar de forma positiva o metabolismo celular. Essa terapia consiste na emissão de fóton de luz por meio da irradiação de laser de baixa potência, com resultados promissores em termos de analgesia, imunomodulação, reparo tecidual e regeneração de lesões teciduais. A terapia por PBM a nível celular, promove ação local, regional e sistêmica, de modo que sua resposta intracelular é percebida no aumento da ação da mitocôndria, resultando em uma maior produção de adenosina trifosfato (ATP) e espécies reativas de oxigênio. Em uma revisão crítica com mais de 50 estudos avaliando a PBM na viabilidade celular, proliferação, migração e produção de citocinas e fatores de crescimento em cultura de queratinócitos, observaram que a emissão de luz nos espectros vermelho e infravermelho apresentam melhor efeito estimulatório, sendo os mais favoráveis obtidos com a aplicação de intervalos de densidade de energia entre 0,1 a 5,0 J/cm². Embora os mecanismos de ação dessa terapia ainda não estejam totalmente elucidados, assim como a curcumina, a PBM pode apresentar efeito modulador da via PI3K-AKT-mTOR. O interesse na modulação da via PI3K-AKT-mTOR como alvo para o reparo tecidual pode ser explicado pois sua sinalização promove aumento da proliferação celular, estimulando também a regeneração, remodelação e reepitelização tecidual. Considerando a lesão na molécula de DNA causada por radiação ionizante, e o consequente aumento de fatores de transcrição e de citocinas inflamatórias decorrentes da agressão celular, a modulação da resposta por meio de terapias capazes de interagir com as fases de inflamação e reparação, pode ser promissora para o tratamento de lesões radioinduzidas, como por exemplo, a mucosite oral. Dessa forma, avaliar a interação entre os efeitos da PBM e da curcumina, de maneira isolada e associada, tanto com mediadores inflamatórios, quanto como sinalizadores da via PI3K-AKT-mTOR poderá auxiliar na

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

identificação de novas terapias e na explanação dos mecanismos de ação a elas atribuídos. Portanto, o presente projeto tem como objetivo analisar os efeitos da curcumina e da fotobiomodulação, tanto como terapias isoladas, quanto associadas, para os processos de regeneração e reparo em modelo *in vitro* de lesão radioinduzida.

Hipótese:

Espera-se identificar os efeitos celulares e moleculares da fotobiomodulação e da curcumina para o tratamento de lesões induzidas por radiação ionizante. Considerando os efeitos conhecidos dessas terapias, é esperado que a associação das duas opções terapêuticas apresente resultado superior às aplicações isoladas.

"Metodologia Proposta:

Cultura celular: Serão utilizados queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) e cultura primária de fibroblastos gengivais humanos (FG). Para a cultura primária, serão coletados fragmentos de gengiva íntegra de 20 participantes de 18 a 25 anos. Os fragmentos deverão ser íntegros, sem inflamação e serão removidos durante procedimento odontológico a serem realizados indicados por um profissional, não estando vinculado ao projeto. Após a coleta do explante, eles serão transportados ao laboratório imerso e DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antifúngico, em isopor contendo gelo, onde será lavado com solução salina de fosfato tamponada e fragmentado em partes de aproximadamente 1mm. Os fragmentos serão dispostos em placas e mantidos em condições ideais, em incubadora úmida, com troca regular do meio de cultura. Ao atingirem a confluência ideal, as células serão desprendidas das placas com solução de tripsina acrescida de EDTA e centrifugadas para o estabelecimento da cultura. Um vez estabelecida, as células poderão ser armazenadas em congelador a -80°C, sem identificação do doador, ou serem distribuídas em novas placas para realização dos experimentos ou expansão da cultura.

Modelo de Lesão Radio-induzida: Inicialmente, todas as células serão tratadas com a associação de três estímulos - lipopolissacarídeos (LPS – 10g/ml) de *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), extrato proteico de *Porphyromonas gingivalis* (Pg – 5g/ml), e 8 Gray (Gy) de radiação ionizante (RI) para a obtenção de lesão celular radioinduzida. Esse modelo foi proposto em estudo anterior do Laboratório de Histopatologia Bucal da UnB e será replicada para novas análises.

Curcumina: Como tratamento modulador da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, serão utilizados 2,5 M de curcumina (referência 08511), adquirida da empresa Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA), em forma liofilizada e com grau de pureza padrão analítico. Essa

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

concentração foi definida de acordo com a curva dose-resposta, previamente desenvolvida e publicada por Borges et al. 2020, optando-se pelo valor da tabela IC50, que corresponde à concentração imediatamente anterior ao início da citotoxicidade de cada fármaco. Fotobiomodulação – curva dose -resposta: Para definir a dose ideal da terapia por fotobiomodulação, quatro densidades de energia (2 J/cm², 3 J/cm², 4 J/cm² e 5 J/cm²) serão avaliadas por teste de viabilidade celular. Para isso, após o estímulo de lesão radio-induzida, as células serão irradiadas com laser de baixa potência, em comprimentos de onda nos espectros vermelho (660nm) e infravermelho (808nm), isolados e/ou associados. Após 24h, serão adicionados 10L de solução de MTT (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) na concentração de 0,5 mg/mL em cada poço. Decorridas 4 horas, o meio de cultura será aspirado e 100L de isopropanol acidificado (25mL de isopropanol + 104L de HCl 100%) serão adicionados em cada poço. As placas serão então agitadas em velocidade baixa e, em seguida, a absorbância será aferida em espectrofotômetro Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A dose que apresentar melhor resultado para a viabilidade celular será selecionada para a continuação dos experimentos.

Critério de Inclusão:

Pacientes de ambos os gêneros com idade entre 18 e 25 anos; Fragmento de gengiva íntegra, sem inflamação, removida durante extração de dentes terceiros molares inclusos ou não com indicação de exodontia; Fragmento de gengiva sem inflamação removida durante extração de dentes pré-molares com indicação ortodôntica de exodontia; Fragmento de gengiva sem inflamação removida durante cirurgia para instalação de implantes dentários osseointegrados; Estar de acordo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Critério de Exclusão:

Gengiva com aspecto clínico de inflamação"

"Metodologia de Análise de Dados:

Teste de Viabilidade Celular: Após 24h da aplicação dos tratamentos, serão adicionados 10L de solução de MTT (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) na concentração de 0,5 mg/mL em cada poço. Após 4 horas, o meio de cultura será aspirado e 100L de isopropanol acidificado (25mL de isopropanol + 104L de HCl 100%) serão adicionados em cada poço. As placas serão então agitadas em velocidade baixa e, em seguida, a absorbância será aferida em espectrofotômetro

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).Imunofluorescência (morfologia celular): Após 24h da aplicação dos tratamentos, as células serão fixadas com 2mL de paraformaldeído 3%, lavadas e reagidas com solução de bloqueio. Para avaliar a distribuição de F actina, as lamínulas serão preparadas com coloração por faloídina; para analisar os filamentos intermediários, as células serão reagidas com anticorpos desenvolvidos para Citoqueratina 10 e 14 nos queratinócitos, e Vimentina nos fibroblastos, seguido dos anticorpos secundários. Os núcleos celulares serão corados (Hoechst 33342 - Thermo Fisher Scientific) e as lamínulas serão fixadas com Fluroshield. A análise será realizada em microscópio de imunofluorescência (Nikon Eclipse 80i), as imagens registradas através de uma câmera digital monocromática acoplada (QImaging ExiAqua) e a quantificação realizada com o software ImageJ (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD).Teste de Cicatrização e Migração Celular (Scratch assay)As monocamadas celulares 100% confluentes serão arranhadas manualmente com uma ponta de pipeta (200 L), lavadas com PBS e tratadas de acordo com os grupo experimentais. Um microscópio invertido (Zeiss Primo Vert, Göttingen, Alemanha) equipado com câmera digital (Zeiss ERc 5s, Göttingen, Alemanha) será usado para obter 12 imagens de grupo a cada 12h, a partir do tempo 0h até o fechamento completo da ferida. Expressão gênica (citocinas inflamatórias e PTEN, AKT, mTOR e PI3CA)Após 24h da aplicação dos tratamentos, a expressão gênica de citocinas pró inflamatórias (TNF, IL1, IL6, NFkB) e de sinalizadores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR será avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa (RT-qPCR). A extração do RNA total será feita de acordo com o método estabelecido pelo TRizol® (Invitrogen), seguida da síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), e amplificação por qPCR com o kit PowerUp® SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). Análise estatística: As análises serão realizadas com o GraphPad Prism versão 9.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Para comparações múltiplas, serão utilizados os métodos one-way ou two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. Para análise entre dois grupos, será realizado o teste de normalidade, sendo aplicado o Teste T para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos. O critério de significância será o valor $p < 0,05$.

Desfecho Primário:

A pesquisa básica visa ao primeiro passo para o desenvolvimento de protocolos de tratamento de lesões radioinduzidas por meio da modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR. A associação da terapia à laser com a curcumina, poderá incentivar protocolos duais, não apenas com foco na fase

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

profissional-dependente, mas também com a utilização domiciliar de fármacos de fácil acesso, sendo uma alternativa clínica viável para Sistema Único de Saúde (SUS). A criação de protocolos que podem ser utilizados na prevenção ou tratamento de lesões radioinduzidas poderá refletir em uma melhor qualidade de vida de pacientes oncológicos que devem ser submetidos a tratamentos de radioterapia ou quimioterapia. A promoção do reparo dessas lesões pode contribuir para uma melhor alimentação, comunicação e deglutição, assim como sua negligência pode levar a inviabilização da continuidade do tratamento proposto para o câncer. Além disso, a identificação dos alvos terapêuticos melhora a saúde do paciente, não apenas no âmbito da odontologia, mas também em outras áreas da saúde, uma vez que essas lesões podem levar à necessidade de hospitalizações para controle da infecção, manejo da dor e nutrição parenteral, aumentando os custos do tratamento.

Tamanho da Amostra no Brasil: 20.

Data do Primeiro Recrutamento: 10/02/2022"

"Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Sim

Justificativa:

O Projeto de Pesquisa será realizado com fragmentos gengivais obtidos em cirurgias orais tais como extrações dentárias e instalação de implantes e cedidos pelos pacientes ou pelos responsáveis. Durante a realização dos experimentos e após sua conclusão, as células serão armazenadas em congelador à -80°C, sem identificação do doador. A autorização do participante para o armazenamento das células encontra-se em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Dependendo dos resultados obtidos no presente estudo, o material armazenado poderá ser utilizado em pesquisas futuras. Por isso, há a necessidade de armazenamento dos tecidos coletados, para não precisar de uma nova coleta em outros indivíduos."

Objetivo da Pesquisa:

Conforme o documento 'PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809826.pdf' postado em 17/01/2022:

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos da curcumina e da fotobiomodulação, tanto como terapias isoladas, quanto associadas, nos processos de regeneração e reparo em modelo in vitro de lesão radioinduzida estabelecido com cultura primária de fibroblastos gengivais.

Objetivo Secundário:

a) Avaliar os efeitos isolados e associados das terapias por fotobiomodulação e o uso da curcumina na modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, com foco no reparo tecidual após estímulo radio-induzido; b) Avaliar a morfologia, a viabilidade, a produção de células tronco e o potencial de proliferação e migração celular dos tratamentos com fotobiomodulação e curcumina, isolados e associados, em células previamente estimuladas por radiação ionizante; c) Analisar a expressão gênica e proteica de citocinas pró-inflamatórias, e de sinalizadores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, após aplicar os tratamentos com fotobiomodulação e curcumina, isolados e associados, em células previamente estimuladas por radiação ionizante."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme o documento 'PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809826.pdf' postado em 17/01/2022:

Riscos:

Os fragmentos gengivais utilizados na pesquisa serão aqueles obtidos quando da extração de dentes por razões terapêuticas não estando, portanto, o procedimento cirúrgico vinculado ao projeto. Para os pacientes que aceitarem cederem amostras de gengiva para utilização no projeto, o risco poderia ser vincular a amostra a sua identidade. Nesse sentido, a confidencialidade do participante será garantida por meio da codificação das células com números.

Benefícios:

A pesquisa não oferece benefícios diretos e imediatos aos participantes, mas como benefícios futuros, espera-se que a pesquisa permita uma melhor compreensão da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias de tecidos gengivais tratados com produtos naturais tais como curcumina, resveratrol e EGCG, no intuito de estabelecer novas medidas terapêuticas para o uso baseado em evidências científicas, proporcionando melhora na qualidade de vida dos pacientes

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

oncológicos"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa de mestrado da PPG-ENF que será executado pela mestranda Mylene Martins Monteiro sob a supervisão da Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra.

O cronograma indica que o primeiro contato com os participantes ocorrerá em 2022.

O orçamento, de financiamento próprio, no total de R\$6.452,00 indica gastos com informática, ressarcimento de transporte e alimentação dos participantes e itens de consumo necessários à execução da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos acrescentados ao processo e analisados para emissão deste parecer:

1. Informações Básicas do Projeto: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809826.pdf" postado em 17/01/2022.
2. Projeto Detalhado ATUALIZADO: "8Projeto_Jan_16_22_revisao.pdf e 8Projeto_Jan_16_22_revisao.docx" postado em 17/01/2022.
3. Carta ao CEP-FS: "CARTA_DE_RESPOSTAS_Jan_16_22.docx e CARTA_DE_RESPOSTAS_Jan_16_22.pdf" postada em 17/01/2022.
4. Modelo de TCLE ATUALIZADO: "4TCLE_Jan_16_22.pdf e 4TCLE_Jan_16_22.docx" postado em 17/01/2022.

Recomendações:

Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado No. 5.116.251 e 5.174.226:

1. Uniformizar os objetivos do projeto de pesquisa em todos documentos e no formulário online da Plataforma Brasil.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

RESPOSTA: Os objetivos foram uniformizados e descritos como: "O presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos da curcumina e da fotobiomodulação, tanto como terapias isoladas, quanto associadas, nos processos de regeneração e reparo em modelo in vitro de lesão radioinduzida estabelecido com cultura primária de fibroblastos gengivais." Foram modificados no formulário online (objetivo primário, página 4 "Detalhamento do estudo"), e nos arquivos anexados: 4TCLE_Nov_29_21 (Página 1, parágrafo 5) e no 8Projeto_Nov_29_21 (Página 4, objetivos gerais, parágrafo 1).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. No formulário online da Plataforma Brasil, na seção 'Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisado' consta que o projeto "Apresenta uma equipe de 5 pesquisadores, além da discente, composta por professores pesquisadores e alunos de pós- graduação e graduação.", mas somente 3 currículos foram apresentados. Solicita-se que sejam enviados os 3 currículos dos outros membros da equipe de pesquisa, e que seja explicado o papel de cada um dos membros da equipe de pesquisa.
RESPOSTA: Foi alterado o número de participantes do grupo de pesquisa. São 4 pesquisadores, além da discente, composta por alunos da graduação e pós graduação. Também foi anexado os 2 currículos dos membros que estavam faltando nos documentos "Lattes_ Bruna_Bastos_Silveira_da_Silva" e "Lattes_Victor_Paiva_Barbosa". Todos os integrantes possuem produção científica própria e contribuem com o projeto auxiliando nas pesquisas e experimentos, quando necessário, sob supervisão da pesquisadora principal.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. No formulário online da Plataforma Brasil, na seção 'Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?' as pesquisadoras indicam interesse em armazenar o material biológico colhido por tempo indeterminado e informam que 'Dependendo dos resultados obtidos no presente estudo, o material armazenado poderá ser utilizado em pesquisas futuras. Por isso, há a necessidade de armazenamento dos tecidos coletados, para não precisar de uma nova coleta em outros indivíduos.'.

Esta modalidade de armazenamento de material biológico, que inclui a utilização do material para projetos futuros e ainda não delineados caracteriza a constituição de um BIOBANCO conforme a PORTARIA No 2 . 2 0 1 , D E 1 4 D E S E T E M B R O D E 2 0 1 1 M S / C N S (https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2201_14_09_2011.html). Caso seja de interesse da equipe de

pesquisa a constituição de um BIOBANCO, solicita-se que seja apresentada uma solicitação formal

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

conforme consta na portaria supracitada. Caso contrário, solicita-se que sejam feitas as adequações necessárias em todos documentos, incluindo Projeto Detalhado, TCLE e formulário online da PB, indicando nitidamente que o material coletado será utilizado exclusivamente para os objetivos delineados neste projeto de pesquisa, e que o material biológico coletado será destruído ao término do projeto de pesquisa, ou após 05 anos, o que ocorrer primeiro (CNS/MS 466/2012 XI.2.f).

RESPOSTA: A modalidade que estamos buscando é a de biorrepositório, onde a coleção de material biológico humano, será coletado e armazenado ao longo da execução desse projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pre-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.

Com isso, os documentos para adequação à Resolução CNS 441/2011, Portaria MS 2.201/11 e Norma Operacional CNS 001/2013, em relação ao armazenamento de material biológico foram anexados: "Justificativa_Armazenamento_Nov_29_21" e "Declaracao". Tal informação também foi adicionada ao TCLE (Página 1, parágrafo 3 e Página 1, parágrafo 6). Foi também incluído ao projeto o item sobre armazenamento e uso futuro de material biológico armazenado (Página 6, item 6).

ANÁLISE: De fato, as pesquisadoras têm razão na solicitação, e a proposta é plenamente compatível com o estabelecimento de um biorrepositório. Em adição à documentação enviada, solicita-se que o TCLE seja adequado, e que conste no TCLE do participante que a amostra será armazenada respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do participante da pesquisa, e que a amostra biológica coletada ficará armazenada (Laboratório, faculdade, universidade), e sob a responsabilidade de qual pesquisador(a). Também deve constar que o/a participante da pesquisa pode a qualquer momento retirar o seu consentimento para o armazenamento da amostra biológica, e que será comunicado sobre a perda, alteração ou destruição de suas amostras biológicas ou da decisão de interrupção da pesquisa, como também sobre o fechamento ou transferência do biorrepositório. Qualquer alteração nos objetivos da pesquisa proposta, assim como na eventual utilização do material biológico em pesquisas futuras, o participante de pesquisa será contatado para re consentimento, ou novo consentimento no caso de novo projeto de pesquisa, e que para toda modificação será apreciada pelo CEP antes de ser executada. Diante da necessidade de re consentimento, ou novos consentimentos futuros, sugerimos fortemente que o contato telefônico e/ou e-mail dos participantes seja armazenado pelas pesquisadoras.

PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.

RESPOSTA: O TCLE foi adequado constando as seguintes alterações sugeridas: A amostra será

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

armazenada, respeitando a confidencialidade, no laboratório de Histopatologia Bucal, na faculdade de Ciências da Saúde, na Universidade de Brasília, sobre a responsabilidade da pesquisadora Mylene Martins Monteiro." (página 1, parágrafo 6) e "O(a) senhor(a) ainda será comunicado sobre perda, alteração ou destruição de suas amostras biológicas, da decisão de interromper a pesquisa ou do fechamento ou transferência do biorrepositório." (página 2, parágrafo 7). Ainda foi adicionado um local para que seja possível armazenar o contato dos participantes (página 2).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Solicita-se que o TCLE seja apresentado em linguagem acessível e compreensível ao público leigo. Não é necessário que os participantes conheçam em detalhe toda a metodologia do projeto de pesquisa, mas sim quais são os objetivos da pesquisa e como será feita a coleta de dados e como o material biológico colhido será armazenado e utilizado.

RESPOSTA: No TCLE as alterações referentes ao detalhamento da metodologia foi alterada, assim como a linguagem compreensível ao público leigo. Essas alterações se encontram na página 1, parágrafo 1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Todas as Pendências foram atendidas. Não foram observados óbices éticos.

Protocolo de pesquisa em conformidade com as Resolução CNS 466/2012, 510/2016 e complementares.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme a Resolução CNS 466/2012, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis devem apresentar relatórios parciais semestrais, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa; e um relatório final do projeto de pesquisa, após a conclusão da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809826.pdf	17/01/2022 20:20:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	8Projeto_Jan_16_22_revisao.pdf	17/01/2022 20:19:38	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

Investigador	8Projeto_Jan_16_22_revisao.pdf	17/01/2022 20:19:38	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTAS_Jan_16_22.docx	17/01/2022 20:18:44	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTAS_Jan_16_22.pdf	17/01/2022 20:18:08	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4TCLE_Jan_16_22.pdf	17/01/2022 20:16:58	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4TCLE_Jan_16_22.docx	17/01/2022 20:16:50	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	8Projeto_Jan_16_22_revisao.docx	17/01/2022 18:40:04	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Justificativa_Armazenamento_Nov_29_21.pdf	01/12/2021 11:48:56	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Declaracao.pdf	01/12/2021 11:48:21	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao.docx	30/11/2021 16:23:41	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Justificativa_Armazenamento_Nov_29_21.docx	30/11/2021 16:13:23	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Lattes_Victor_Paiva_Barbosa.pdf	30/11/2021 16:04:44	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Lattes_Bruna_Bastos_Silveira_da_Silva.pdf	30/11/2021 16:03:34	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	2Termo_concordancia_Sept_22_21.docx	28/09/2021 20:27:25	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Declaração de concordância	2Termo_concordancia_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:15:58	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	1Carta_encaminhamento_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:15:02	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	1Carta_encaminhamento_Sept_22_21.docx	22/09/2021 12:13:49	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	3Termo_responsabilidade_Sept_22_21.docx	22/09/2021 12:13:21	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	3Termo_responsabilidade_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:13:03	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

Outros	Lattes_Mylene_Martins_Monteiro.pdf	22/09/2021 12:12:37	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Lattes_Juliana_Amorim_dos_Santos.pdf	22/09/2021 12:12:18	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Lattes_Eliete_Neves_da_Silva_Guerra.pdf	22/09/2021 12:12:05	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Cronograma	6Cronograma_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:03:20	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Orçamento	5planilha_de_orcamento_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:03:00	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Folha de Rosto	7folhaDeRosto_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:00:02	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 26 de Janeiro de 2022

Assinado por:
Fabio Viegas Caixeta
(Coordenador(a))

ANEXO B - TRABALHO PUBLICADO DURANTE PERÍODO DE MESTRADO NA REVISTA JOURNAL OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION (JADA; Qualis A1 CAPES; IF= 3.1).



The Journal of the American Dental Association

Available online 9 September 2024

In Press, Corrected Proof [?](#) [What's this?](#)



Systematic Review

Oral manifestations in pediatric patients with leukemia: A systematic review and meta-analysis

[Bruna Bastos Silveira DDS](#), [Larissa Di Carvalho Melo DDS](#), [Juliana Amorim dos Santos DDS](#), [Elaine Barros Ferreira PhD](#), [Paula Elaine Diniz Reis PhD](#), [Graziela De Luca Canto PhD](#), [Ana Carolina Acevedo PhD](#), [Carla Massignan PhD](#), [Eliete Neves Silva Guerra PhD](#)  

Show more 

 Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.ada.2024.07.014> 

[Get rights and content](#) 

ANEXO C - TRABALHOS COMO COAUTORA EM REVISÃO

Artigo: Current trends and available evidence on low-level laser therapy for osteoradionecrosis: A scoping review, submetido e em fase de revisão na revista Photodiagnosis and Photodynamic Therapy (Qualis A1, IF=3.1)

Title Page

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

Current trends and available evidence on low-level laser therapy for osteoradionecrosis: A scoping review

Larissa Di Carvalho Melo^a, Bruna Bastos Silveira^a, Mylene Martins Monteiro^a, Juliana Amorim dos Santos^a, Elaine Barros Ferreira^b, Paula Elaine Diniz Reis^b, Camila de Barros Gallo^c, Eliete Neves Silva Guerra^{a*}

^a University of Brasilia, Laboratory of Oral Histopathology, School of Health Sciences Faculty, Brasília, Brazil.

^b University of Brasilia, Brasília, Interdisciplinary Laboratory of Research applied to Clinical Practice in Oncology, Nursing Department, School of Health Sciences, Brasília, Brazil.

^c University of São Paulo, Stomatology Department, School of Dentistry, São Paulo, Brazil.

Artigo: Oral manifestations of COVID-19 vaccinated, post-illness and different variants: study of Brazilian population, submetido e em fase de revisão na revista Brazilian Oral Research (Qualis A2; IF=1.5).



Oral manifestations of COVID-19 vaccinated, post-illness and different variants: study of Brazilian population

Journal:	<i>Brazilian Oral Research</i>
Manuscript ID	BOR-2023-0662.R1
Manuscript Type:	Original Research Report
Specialties:	Stomatology, Oral Pathology
Category--Select your categories from the MeSH or DeCS lists.:	Coronavirus disease 2019, Post-Acute COVID-19 Syndrome, SARS-CoV-2 variants, Questionnaire, Oral signs