

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**

MARIA DA CONCEIÇÃO MACHADO GOMES

**PERFIL CLÍNICO, MICROBIOLÓGICO E RESPOSTA
IMUNE DA PERIODONTITE E SEU IMPACTO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

VITÓRIA

2021

MARIA DA CONCEIÇÃO MACHADO GOMES

**PERFIL CLÍNICO, MICROBIOLÓGICO E RESPOSTA
IMUNE DA PERIODONTITE E SEU IMPACTO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Defesa de Tese ao atendimento das normas exigidas do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
/RENORBIO

Orientação: Professora Dr^a. Leticia Batista Azevedo
Rangel

VITÓRIA

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M149p Machado Gomes, Maria da Conceição, 1968-
PERFIL CLÍNICO, MICROBIOLÓGICO E RESPOSTA
IMUNE DA PERIODONTITE E SEU IMPACTO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA : Resposta imune da
periodontite em pacientes com câncer de mama / Maria da
Conceição Machado Gomes. - 2021.
120 f. : il.

Orientadora: Leticia Batista Azevedo Rangel.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Periodontite. 2. Câncer de mama. I. Azevedo Rangel,
Leticia Batista. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

MARIA DA CONCEIÇÃO MACHADO GOMES

**PERFIL CLÍNICO, MICROBIOLÓGICO E RESPOSTA IMUNE DA
PERIODONTITE E SEU IMPACTO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Defesa de Tese ao atendimento das normas exigidas
do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
/RENORBIO.

Aprovada em 20/12/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Leticia Batista Azevedo Rangel

UFES-Renorbio (Orientadora)

Prof. Dr. Marcos Cesar Cunegundes Guimarães

UFES-Renorbio (Titular)

Prof. Dr^a. Adriana Madeira A. da Silva

UFES-Renorbio (Titular)

Prof. Dr^a. Priscila Ladeira Casado

UFF- (Titular)

Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha

UENF- (Titular)

Prof. Dr. José Geraldo Mill

UFES- (Suplente)

Profª. Drª. Nídia Cristina Castro

UNG-SP (Suplente)

TIPO DE SESSÃO: On line

DIA: 20/12/2021

HORÁRIO: 14h

AGRADECIMENTOS

A nosso Deus e Pai seja a glória para todo o sempre. Filipenses 4:20.

Aos meus pais Gabriel e Hilda, que me acompanham nesta trajetória de vida para que eu acredite sempre e que podemos sim, ir mais longe um pouco.

Ao meu marido e amigo Raphael, esse amor que me ilumina.

Agradeço a UFES e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) e à minha orientadora Prof^a Dr^a Leticia Batista Azevedo Rangel, que confiou, alertou e me mostrou que ciência é muito mais que eu imaginava.

Ao Prof^o de Periodontia/UFES Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa, que esteve sempre presente!

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano (LBCMCH), pelo carinho e atenção.

Ao Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES), especialmente ao Ambulatório de Periodontia e de Radiologia no suporte clínico odontológico das pacientes.

Ao Ambulatório de Ginecologia do HUCAM, todas as enfermeiras e corpo médico do serviço de atenção à mulher no suporte de dados ambulatoriais.

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI)-CCS-UFES

Ao Ambulatório 7 e Serviço de Anatomia Patológica do Hucam.

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade de Guarulhos (SP) da Profa Dra Magda Feres.

A todas as pacientes que participaram, espero ter colaborado com o tratamento e ter trazido um certo conforto para suas dores.

À FAPES, pelo fomento.

Fazer pesquisa!! Sim, temos que fazer!! Devemos isso à vida, à humanidade para que mostremos o que viemos fazer neste mundo. Agradeço a todos pelo suporte científico e todas as iniciativas diretas ou não.

RESUMO

O objetivo principal desse estudo foi avaliar o perfil microbiano subgengival e níveis de marcadores inflamatórios da periodontite associada ao câncer de mama (CAM) e o impacto da terapia periodontal nesses achados. Avaliou-se em 2 fases (antes e durante a quimioterapia) o perfil sociodemográfico da população estudada, a caracterização por contagem bacteriana da microbiota subgengival, a correlação entre essa microbiota subgengival com a perda dentária, nível de inserção clínico (NIC \geq 4mm) e a idade, a resposta imune da periodontite pela secreção de citocinas inflamatórias, os parâmetros clínicos periodontais e sua relação com o subtipo molecular para o CAM e do grau tumoral com a perda dentária e o NIC \geq 4mm nos grupos. A terapia periodontal básica ocorreu duas vezes em cada fase em um intervalo de 14 dias após uma coleta de fluido gengival e do biofilme durante o atendimento clínico. Cem pacientes foram conduzidas por meio de um estudo caso-controle longitudinal onde 50 delas com CAM (grupo 1) e 50 sem CAM (grupo 2) e subdivididas quanto à presença da periodontite com profundidade de sondagem PS e nível de inserção clínica (NIC) \geq 4mm (A); ou ausência de periodontite com PS \leq 3mm e NIC $<$ 4 mm. Foi realizada a contagem bacteriana pelo método Hibridização Checkerboard DNA-DNA, da secreção das citocinas IL8, TNF α , IL6 e IL1 β pelo método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), dos PCP como: perda dentária, profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínico (NIC), índice de placa visível (IPV), sangramento à sondagem (SS) e índice de sangramento gengival (ISG) dos sítios periodontais dos elementos dentários de todas as pacientes, porém foi escolhido um (1) sítio periodontal com PS \geq 4mm para as pacientes com periodontite e PS \leq 3mm nas pacientes sem periodontite para as coletas de fluido gengival e biofilme. 60% das pacientes tinham idade maior 51 anos, 16% eram tabagistas e 34% etilistas no grupo 1. Nas comparações entre os grupos: a contagem bacteriana apresentou proporções $>10^5$ e significância em quase todas as avaliações nos grupos 1A e 1B em relação aos grupos 2A e 2B na fase 2. Na fase 1, quando se avaliou o grupo 1B, houve associação significativa do NIC \geq 4mm com as espécies *Capnocytophaga ochracea* ($r=0,514$), *Eikenella corrodens* ($r=0,516$) e *Leptotrichia buccalis* ($r=0,481$). Para o grupo 1A houve associação significativa entre o NIC com *A. actinomycetencomytans* ($r=0,468$), *Eikenella corrodens* ($r=0,437$) e *Streptococcus anginosus* ($r=0,411$). Na fase 2, para o grupo 1A houve correlação significativa do NIC \geq 4mm com *Streptococcus mitis* ($r=0,455$) e *Actinomyces naeslundii I* ($r=0,506$). Na fase 1, a idade apresentou correlação significativa com *Streptococcus*

anginosus ($r=0,463$) e *Propionibacterium acnes* ($r=0,496$) no grupo 1B e *Fusobacterium periodonticum* ($r=0,539$) no grupo 1A. Na fase 2 com *Actinomyces naeslundii I* ($r= 0,528$) no grupo 1A, *Porphyromonas gingivalis* ($r=0,438$), *Actinomyces naeslundii I* ($r=0,433$), *Veillonella parvula* ($r=0,439$) e *Actinomyces israelii* ($r=0,405$) no grupo 1B. A perda dentária na fase 1 apresentou associação com as bactérias *Actinomyces gerencseriae* ($r=0,564$), *Actinomyces odontolyticus* ($r=0,550$), *Capnocytophaga gingivalis* ($r=0,549$) e a *Neisseria mucosa* ($r=0,515$), onde estas foram moderada positiva e forte positiva para as espécies *Treponema socranskii* ($r=0,664$), *Streptococcus anginosus* ($r=0,668$) e *Prevotella melaninogenica* ($r=0,731$) no grupo 1B. A perda dentária foi significativa com *Veillonella parvula* ($r=0,441$), *Eubacterium saburreum* ($r=0,496$) e *Prevotella melaninogenica* ($r=0,526$) no grupo 1A e na fase 2, apresentou correlação significativa com *Streptococcus intermedius* ($r=0,432$), *Actinomyces israelii* ($r=0,419$) e *Capnocytophaga ochracea* ($r=0,497$) grupo 1B. As citocinas IL-8 ($p=0.007$) e TNF α ($p=0.004$) foram obtiveram níveis maiores no grupo 1B comparado ao grupo 2B. Os grupos 1A and 1B maiores níveis para IL-1 β ($p<0.001$), TNF α no grupo 1A ($p<0.001$) e 1B ($p=0.004$), IL6 no grupo 1A ($p=0,002$) e 1B ($p<0.001$) comparada com grupo 2A e 2B. IPV, ISG, SS, PS \geq 4mm and NIC $>$ 4mm ($p<0,001$) foram maiores no grupo 1B e 1A comparada aos grupos 2A e 2B. As proporções de perda dentária, PS=4mm e NIC $>$ 4mm ($p<0.001$) foram significativas para o subtipo molecular triplo negativo comparado ao luminal B. Em relação ao grau tumoral, a perda dentária teve relação significante com o grau tumoral II ($p=0,003$) e III ($p=0,006$) no grupo 1B em relação ao grupo 1A e o NIC \geq 4mm com o grau tumoral II ($p=0,005$) e III ($p=0,000$) no grupo 1B em relação ao grupo 1A. Pode-se concluir que a terapia periodontal básica melhorou significativamente os índices bacterianos, inflamatórios e periodontais nas pacientes sem câncer, o que não ocorreu no grupo com câncer que obteve níveis aumentados.

Palavras-chave: Periodontite, câncer de mama, fluido crevicular gengival, citocinas.

ABSTRACT

The main objective this study was to evaluate the subgingival microbial profile and levels of inflammatory markers of periodontitis associated with breast cancer (BC) and the impact of periodontal therapy on these findings. This study evaluated in 2 phases (before and during chemotherapy), the sociodemographic profile of the studied population, the characterization by bacterial count of subgingival microbiota, the correlation between the subgingival microbiota with the tooth loss, clinical attachment level (CAL \geq 4mm) and age, the PD immune response by the secretion of inflammatory cytokines, CPP and their relationship with molecular subtype for the BC and the tumor grade with tooth loss and CAL \geq 4mm in the groups. Basic periodontal therapy occurred twice in each phase within 14 days after a crevicular gingival fluid and biofilm collection during clinical care. One hundred patients were managed through a longitudinal case control study where 50 of them with BC (Group 1) and 50 without BC (group 2) and subdivided according to the presence of periodontitis with probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) \geq 4mm (A); or without periodontitis with PD \leq 3mm and CAL \leq 4mm. Bacterial counting was performed by the checkerboard DNA-DNA Hybridization method, the secretion of cytokines IL8, TNF α , IL6 and IL1 β by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) method, the CPP such as: tooth loss, visible plaque (VP), gingival bleeding (GB), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL), but one periodontal site with PD \geq 4mm for patients with periodontitis and PD \leq 3mm for patients without periodontitis by gingival crevicular fluid and biofilm collections. 60% of the patients were 51 years old or older, 16% were smokers and 34% were alcoholics in group 1. In comparisons between groups: bacterial count presented proportions $>10^5$ in almost all assessment in group 1A and 1B compared to groups 2A and 2B in phase 2 mainly for the species complexes that had more aggressive. In phase 1, when group 1B was evaluated, there was a significant association of CAL \geq 4mm with the species *Capnocytophaga ochracea* ($r=0.514$), *Eikenella corrodens* ($r=0.516$) e *Leptotrichia buccalis* ($r=0.481$). For group 1A, it was observed that there was a significant association between CAL \geq 4mm and *A. actinomycetencomytans* ($r=0.468$), *Eikenella corrodens* ($r=0.437$) e *Streptococcus anginosus* ($r=0.411$). In phase 2, for group 1A there was a significant correlation of CAL \geq 4mm with *Streptococcus mitis* ($r=0.455$) e *Actinomyces naeslundii I* ($r=0.506$). In phase 1, age was significantly correlated with *Streptococcus anginosus* ($r=0.463$) and *Propionibacterium acnes* ($r=0.496$) in group 1B and *Fusobacterium periodonticum* ($r=0.539$) in group 1A. In

phase 2 with *Actinomyces naeslundii I* ($r= 0.528$) in group 1A, *Porphyromonas gingivalis* ($r=0.438$), *Actinomyces naeslundii I* ($r=0.433$), *Veillonella parvula* ($r=0,439$) and *Actinomyces israelii* ($r=0.405$) in group 1B. The tooth loss in phase 1 presented association with species *Actinomyces gerencseriae* ($r=0.564$), *Actinomyces odontolyticus* ($r=0.550$), *Capnocytophaga gingivalis* ($r=0.549$) and *Neisseria mucosa* ($r=0,515$), where these were moderate and strong correlations for species *Treponema socranskii* ($r=0.664$), *Streptococcus anginosus* ($r=0.668$) and *Prevotella melaninogenica* ($r=0.731$) in group 1B. The tooth loss was significant to *Veillonella parvula* ($r=0.441$), *Eubacterium saburreum* ($r=0.496$) and *Prevotella melaninogenica* ($r=0.526$) in group 1A and phase 2, presented correlation significant with *Streptococcus intermedius* ($r=0.432$), *Actinomyces israelii* ($r=0.419$) and *Capnocytophaga ochracea* ($r=0.497$) in group 1B. In P2 compared with P1, the cytokines IL-8 ($p=0.007$) and TNF α ($p=0.004$) were higher in group 1B compared with group 2B. The groups 1A and 1B presented higher significance for IL-1 β ($p<0.001$), TNF α in group 1A ($p<0.001$) and 1B ($p=0.004$) and IL6 in group 1A ($p=0,002$) and 1B ($p<0.001$) compared with group 2A and 2B. VP, GB, BOP, PD ≥ 4 mm and CAL >4 mm ($p<0,001$) were highest in groups 1B and 1A compared with groups 2A and 2B. The levels of proportion were highest for tooth loss, PD=4mm and CAL >4 mm ($p<0.001$) to TNBC subtype compared to luminal B. Regarding tumor grade, tooth loss had a significant relationship with tumor grade II ($p=0.003$) and III ($p= 0.006$) in group 1B compared to group 1A and CAL ≥ 4 mm with tumor grade II ($p= 0.005$) and III ($p= 0.000$) in group 1B compared to group 1A. It can be concluded that basic periodontal therapy significantly improved bacterial, inflammatory and periodontal indices in patients without cancer, which did not occur in the cancer group that had increased levels.

Keywords: Periodontitis, breast cancer, gingival crevicular fluid, cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Patogênese da periodontite	24
Figura 2 – Células do sistema imunológico no periodonto inflamado.....	26
Figura 3 – Demonstração das hibridizações das sondas de DNA homólogas e heterólogas entre 40 sondas de DNA genômicas inteiras (vertical) e 80 DNA de espécies alvos (horizontal).....	28
Figura 4 – Fluxograma demonstrando a seleção das pacientes do estudo.....	39
Figura 5 – Medida de PS=4mm e NIC=4mm.....	42
Figura 6 – Representação esquemática do Minislot 30: Resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas contidas nas amostras de biofilme (técnica de Checkboard DNA-DNA hibridização).....	50
Figura 7. Representação esquemática do Miniblotter 45: Resumo da preparação da colocação das amostras de biofilme subgingival na membrana de nylon (técnica de Checkboard DNA-DNA hibridização).....	51
Figura 8 – Resultado da Contagem Bacteriana no Grupo 1 nas Fases.....	56
Figura 9 – Resultado da Contagem Bacteriana no Grupo 2 nas Fases.....	57
Figura 10 – Secreção de Citocinas nos Grupos e Fases.....	65
Figura 11 – Caracterização de Perda dentária, IPV, ISG e SS na Fase 1.....	66
Figura 12 -Caracterização da PS e NIC na Fase 1.....	67
Figura 13 – Caracterização de Perda dentária, IPV, ISG e SS na Fase 2.....	67
Figura 14 - Caracterização da PS e NIC na Fase 2.....	68
Figura 15 - Caracterização da Perda dentária, IPV, ISG e SS entre os subtipos na Fase 1.....	69
Figura 16 – Caracterização da PS entre os subtipos moleculares na Fase 1.....	69
Figura 17 - Caracterização do NIC entre os subtipos moleculares na Fase 1.....	70
Figura 18 – Caracterização da Perda dentária, IPV, ISG e SS entre os subtipos moleculares na Fase 2.....	71
Figura 19 – Caracterização da PS entre os subtipos moleculares na Fase 2.....	71
Figura 20 – Caracterização do NIC entre os subtipos moleculares na Fase 2.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação o imuno-histoquímica dos tumores de mama.....	34
Tabela 2 – Relação das cepas bacterianas empregadas na confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas pelos complexos bacterianos de Socransky.....	45
Tabela 3 – Índice utilizado para contagem dos microorganismos nas amostras de biofilme.....	52
Tabela 4 – Dados do Perfil Sociodemográfico nos Grupos.....	54-55
Tabela 5 – Resultado da Contagem Bacteriana no Grupo 2 nas Fases.....	59
Tabela 6 – Resultado da Contagem Bacteriana no Grupo 1 nas Fases.....	60
Tabela 7 – Correlação do NIC, Idade e a perda dentária com a Microbiota na Fase 1.....	62
Tabela 8 – Correlação do NIC, Idade e a perda dentária com a Microbiota na Fase 2.....	63
Tabela 9 – Associação da Perda Dentária e o NIC com o Grau Tumoral.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Interpretação da estatística Kappa.....	43
-----------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1M H₃PO₄: 1 molar de ácido fosfórico

bFGF- Fator de crescimento de fibroblastos básico

CAM: Câncer de mama

CEPE: Comitê de ética e pesquisa

COVID 19 – Doença do coronavírus 19

DP: Doença Periodontal

dp: Disto palatino

dv: Disto vestibular

dl: Disto lingual

EBV: Epstein Barr Virus

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FGF- Fator de crescimento dos fibroblastos

Fn: Fusubacterium nucleatum

GEP- Padrão de expressão gênica

H pylori: Helicobacter pylori

HER2 - Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HGF- Fator de crescimento de hepatócitos

HPV: Human Papiloma Virus

IL - Interleucina

IL1-Interleucina 1

IL1 β - Interleucina 1 β

IL6- Interleucina 6

IL8- Interleucina 8

IOUFES: Instituto de Odontologia da UFES

IPV- Índice de placa visível

ISG - Índice de sangramento gengival

L - Lingual

MCP 1- Proteínas quimiotáticas de monócitos

ML- Mésio lingual

MP- Mésio palatino

MV- mésio-vestibular

NFkB - Fator Nuclear Kappa B

NIC- Nível de inserção clínico

P - Palatino

PB- Plataforma Brasil

PBS - Tampão salino- fosfato

PCP- Parâmetros clínicos periodontais

PD - Perda dentária

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaqueta

Pg-*Porphyromonas gingivalis*

Pg/ml- Picograma por mililitro

PGE- Prostaglandinas E

PMN- Polimorfo nuclear neutrófilo

PS: Profundidade de sondagem

RANK- Ativador receptor NFK β

RANKL- Ativador receptor NFK β ligante

RANTES- Regulação na ativação da célula T normal expressa e secretada

RE – Receptor de estrogênio

ROS- Reactive species of oxigen

RP – Receptor de progesterona

SS- Sangramento à sondagem

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- α , TGF- β - Fator de crescimento de transformação α e β .

TNF α - Fator necrose tumoral α

TREG- células T reguladoras

V- Vestibular

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

% - Por cento

n - Tamanho da amostra

p - Probabilidade de significância

r - Coeficiente de correlação

Espécies bacterianas do Complexo de Socransky

A.actinomycetemcomitans- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

A. naeslundii - *Actinomyces naeslundii*

B. forsythus - *Tannerella forsythia*

C. rectus - *Campylobacter rectus*

C.gingivalis - *Capnocytophaga gingivalis*

C.ochracea - *Capnocytophaga ochracea*

E.corrodens - *Eikenella corrodens*

E.nodatum - *Eubacterium nodatum*

Fusobacterium spp.- *Fusobacterium species*

N. mucosa - *Neisseria mucosa*

P. intermedia - *Prevotella intermedia*

P. nigrescens - *Prevotella nigrescens*

P.micra - Parvimonas micra

S. mitis - Streptococcus mitis

S. sanguis - Streptococcus sanguis

S.gordonii - gordonii

S.intermedius - Streptococcus intermedius

S. oralis- Streptococcus oralis

S. sanguinis - Streptococcus sanguinis

T. denticola - Treponema denticola

T. forsythia -Tannerella forsythia

V. parvula - Veillonella parvula

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. Periodontite.....	21
2.1.1 Microbiota Subgingival como Etiologia da Periodontite.....	25
2.2. Inflamação e câncer	29
2.3. Periodontite e doenças sistêmicas	31
2.4. Câncer de mama.....	32
2.5. Plausibilidade entre periodontite e câncer	34
3. OBJETIVO GERAL.....	37
3.1. Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Seleção de pacientes	38
4.2. Avaliação clínica odontológica e médica	40
4.2.1. Avaliação radiográfica dentária.....	40
4.2.2. Medidas dos Parâmetros Clínicos Periodontais	41
4.2.3. Concordância entre examinadores.....	42
4.2.4 Coleta de fluido gengival e de biofilme subgingival	43
4.3. Avaliação do diagnóstico para o câncer de mama	45
4. 4. Terapia peridontal básica	46
4.5. Estudo da secreção de citocinas pelo método ELISA	47
4.6. Avaliação microbiológica	48
4.6.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	48
4.6.2. Isolamento do DNA e preparo das sondas	48
4.6.3. Checkboard DNA-DNA Hybridização.....	49

4.6.4. Detecção das espécies.....	51
4.7. Análise estatística	52
5. RESULTADOS	54
5.1. Análise do perfil sócio-demográfico.....	54
5.2. Achados Microbiológicos.....	55
5.2.1 Contagem bacteriana pelo método checkboard DNA-DNA hybridização.....	55
5.2.2 Correlação da microbiota subgengival com o nível de inserção clínico (NIC), idade e perda dentária.....	61
5.4 Resultados dos parâmetros clínicos periodontais	65
5.5. Relação entre os parâmetros clínicos periodontais e subtipos moleculares	68
5.6. Correlação da microbiota subgengival com o grau histológico dos tumores das pacientes	72
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO	80
8. PERSPECTIVAS	82
9. REFERÊNCIAS	83
10. APÊNDICES.....	94
ANEXOS	101

INTRODUÇÃO

As doenças periodontais como a periodontite é uma patologia infecciosa e inflamatória caracterizada por danos progressíveis e irreversíveis às estruturas de suporte dos dentes (CAVALLA et al., 2018) com expressão de vários mediadores inflamatórios que orquestram um papel essencial em seu início e progressão, tendo como fator etiológico primário, o biofilme subgengival que, por efeito local, desencadeia o processo de degradação tecidual do periodonto (ARAL et al., 2019). Outros indicadores podem contribuir no impacto da saúde desses indivíduos como o consumo de bebida alcoólica e tabagismo associados tanto aos problemas de origem bucal quanto na etiologia do câncer (SANTOS et al., 2010). Atualmente a periodontite tem sido associada a diversas condições sistêmicas que podem agir sobre o fator etiológico primário, tornando o seu processo mais grave mediante as causas microbianas já existentes (SCHENKEIN et al., 2020). Foi relacionada com várias formas de câncer, destacando como causa mais provável a frequência prolongada aos níveis inflamatórios moleculares (COUSSENS; ZENA, 2002).

O câncer de mama (CAM) é uma grave condição patológica que pode exercer influência sobre o avanço e severidade do processo inflamatório periodontal, além de que, muitos indivíduos com CAM apresentam características que podem contribuir para o desenvolvimento da periodontite como: o efeito sistêmico dos antineoplásicos nos tecidos orais, a idade (exposição ao longo da vida a fatores endógenos e exógenos) e a osteoporose que têm como uma das características o baixo nível de circulação de estrogênio. Esses baixos níveis de estrogênio são fortes indicadores para a perda da crista óssea alveolar do ligamento periodontal e assim o progresso da periodontite (TAICHMANN et al., 2015) associado com a perda da densidade mineral óssea esquelética. Revisando a literatura, verificou-se uma grande associação entre as duas patologias, encontrando maior incidência CAM nos pacientes que tinham periodontite e algum dente molar perdido na mandíbula (SÖDER et al., 2011). Outra abordagem relevante foi sobre os patógenos específicos da microbiota subgengival como a espécie bacteriana *Porphyromonas gingivalis* que foi encontrada em superfície de tumores como carcinoma oral de células escamosas (ARJUNAN et al., 2018). Outro estudo consistente foi a colonização do patógeno oral *Fusobacterium nucleatum* associado ao acúmulo de células T que se infiltram no interior de tumores de mama humano promovendo o seu crescimento e progressão metastática (PARHI et al., 2020).

Baseando-se nestas evidências, a presente pesquisa objetivou avaliar a microbiota e o processo inflamatório subgengival, os parâmetros clínicos periodontais e suas associações com os subtipos moleculares e grau tumoral do CAM. Esta pesquisa engloba duas vertentes: uma que visa estabelecer a prevalência das doenças periodontais sob critérios clínicos em pacientes com CAM e outra que investiga se a periodontite repercute em reflexos negativos no prognóstico do tumor. A realização da presente pesquisa é justificada na relação consistente da periodontite em portadores do câncer de mama em um acompanhamento clínico antes e durante a terapia antineoplásica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Periodontite

A periodontite é uma patologia de natureza crônica inflamatória multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental (STEFFENS & MARCANTONIO, 2018). Clinicamente, caracteriza-se por: perda de inserção detectada em dois ou mais sítios interproximais não adjacentes; perda de inserção de 3mm ou mais na vestibular ou lingual/palatina em pelo menos dois dentes, sem que seja por causa de: 1) recessão gengival de origem traumática; 2) cárie dental estendendo até a área cervical do dente; 3) presença da perda de inserção na face distal de um segundo molar e associado ao mau posicionamento ou à extração de terceiro molar; 4) lesão endoperiodontal drenando por meio do periodonto marginal; ou 5) ocorrência de fratura radicular vertical. A Periodontite é classificada de acordo com seu ESTÁGIO e GRAU. O estágio está relacionado ao grau de severidade da doença, sendo a perda de inserção a característica determinante, que em sua ausência utiliza-se a perda óssea radiográfica. Para todos os estágios é classificada como localizada, que acomete até 30% dos dentes envolvidos e generalizada que atinge mais de 30% dos dentes afetados ou mais. Outra classificação é a periodontite como manifestação por doenças sistêmicas como desordens genéticas, da imunodeficiência adquirida, inflamatórias e outras desordens sistêmicas (diabetes mellitus, uso de medicações, osteoporose, obesidade, tabagismo, depressão), que devem ser descritoras da periodontite, mas quanto à classificação e o grau e a estágio deve ser mantida. Por fim, temos outras condições como as neoplasias e outras desordens como hiperparatireoidismo (CATON et al., 2018). Estima-se que as doenças periodontais afetam de 20% a 50% da população mundial (NAZIR et al., 2020) e especificamente como na periodontite, são responsáveis pela perda óssea alveolar e consequentemente a perda dentária (TARIQ et al., 2012). Adicionalmente, fatores como a idade (WU et al., 2016) socioeconômicos, psicoemocionais e instrução escolar, também podem estar associados à periodontite (HEIKKILÄ et al., 2018).

O diagnóstico clínico da periodontite baseia-se nas seguintes características: prevalência maior em adultos, podendo ocorrer em crianças e adolescentes; taxas de progressão baixas a moderadas; quantidade de depósitos microbianos consistentes, severidade da destruição periodontal e presença frequente de biofilme subgengival (ARMITAGE, 2004) que

caracteriza a microbiota em toda sua complexidade. O biofilme consiste em uma comunidade microbiana organizada e complexa, constituída por produtos extracelulares microbianos, compostos salivares e bactérias envolvidas em polímeros orgânicos ligados a uma superfície, os quais se ligam à membrana externa das bactérias Gram-negativas e ao peptidoglicano das bactérias Gram-positivas (KOLENBRANDER et al., 2006). Nos estudos epidemiológicos contemporâneos avalia-se também o grau de severidade da periodontite através das mensurações das profundidades de sondagem (PS) e do nível de inserção clínico (NIC). A PS é definida como a distância que vai da gengiva marginal livre até o ponto em que a extremidade da sonda periodontal encontra resistência no momento da sondagem. O mesmo ocorre para o NIC que é definido como a distância que vai da junção cimento-esmalte (JCE) até a posição em que o extremo da sonda periodontal encontra a resistência óssea anatômica (LINDHE & LANG, 2020). O limiar de perda de inserção (NIC) é detectada em dois ou mais sítios interproximais não adjacentes ou perda de inserção de 3 mm ou mais na vestibular ou lingual/palatina em pelo menos 2 dentes, sem que seja por causa de: 1) recessão gengival de origem traumática; 2) cárie dental estendendo até a área cervical do dente; 3) presença da perda de inserção na face distal de um segundo molar e associado ao mau posicionamento ou à extração de terceiro molar; 4) lesão endoperiodontal drenando por meio do periodonto marginal; ou 5) ocorrência de fratura radicular vertical (STEFFENS & MARCANTONIO, 2018).

O índice de placa visível (IPV) avalia a condição de higiene bucal. O índice de sangramento gengival (ISG) avalia o sangramento espontâneo ao toque superficial da margem gengival com a sonda Nabers 2N (Colors Millennium-Golgran) e o sangramento à sondagem (SS) quando a sondagem causa sangramento na presença ou ausência de periodontite. O índice ISG permite uma avaliação percentual dos sítios que sangram e os que não sangram à leve sondagem, mostrando a presença de inflamação (NEWMAN & CARRANZA, 2020). Os valores foram obtidos da seguinte forma: após a sondagem em seis pontos diferentes por dente (mesial, mediana e distal das vestibulares e mesial, mediana e distal das palatinas), o número de superfícies com sangramento (diagnosticadas até 30 a 60 segundos após a sondagem).

É limitado definir o diagnóstico da periodontite baseado na perda óssea das tomadas radiográficas marginal, pois não são específicas e não detectam a periodontite leve a moderada, assim como a medição da PS e NIC (TONETTI, GREENWELL e KORNMAN, 2018). Porém, as tomadas radiográficas auxiliam nos diagnósticos da periodontite na rotina

clínica odontológica e são mais econômicas, além das tomadas de imagem mais avançadas como tomografia computadorizada em 3D.

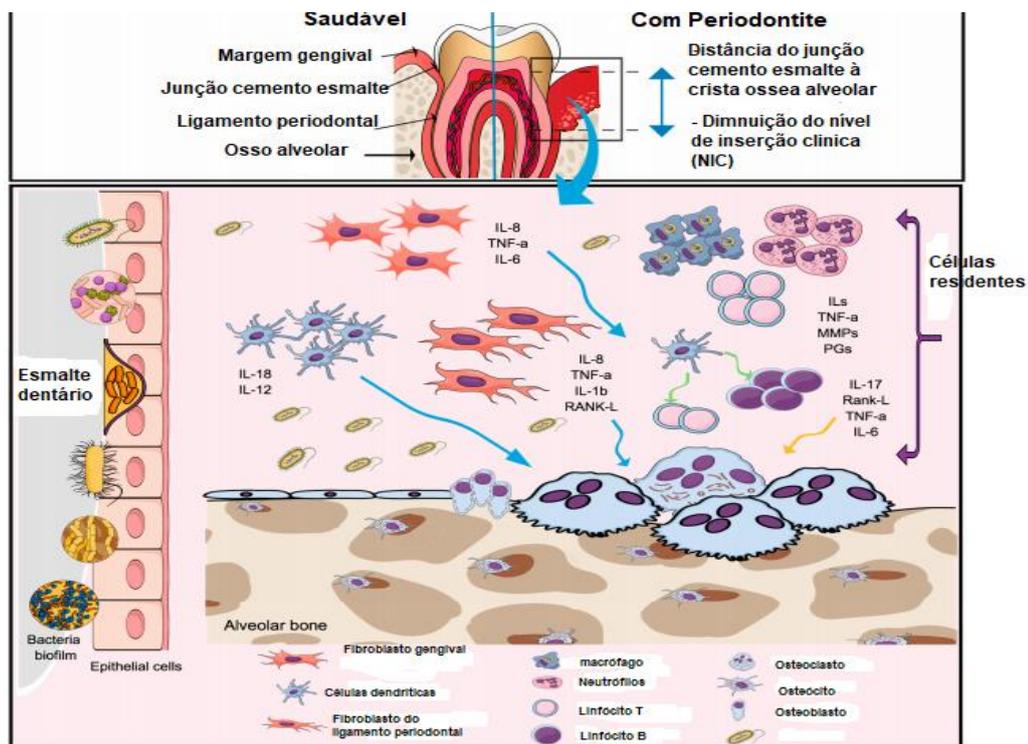
A constante modificação específica do biofilme em toda sua complexidade seleciona grupos específicos de patógenos que induzem mudanças nas comunidades bacterianas subgengivais e levam a uma comunidade disbiótica capaz de induzir uma resposta inflamatória do hospedeiro desregulada e eventualmente a inflamação crônica (HOARE et al., 2019).

Na resposta imune alguns mediadores inflamatórios como quimiocinas e citocinas estão envolvidos na progressão da periodontite. As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular produzidas por uma variedade de células que transmitem sinais para outras células e desempenham um papel crucial no início e manutenção da resposta inflamatória, estimulando a produção de mediadores secundários. Podem ser classificadas como pró-inflamatórias (incluindo IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23 e TNF- α) ou anti-inflamatórias (incluindo IL-4, IL-10, IL-13) que evocam uma cascata de eventos que amplificam a resposta inflamatória, induzem a produção de enzimas responsáveis pela degradação de tecido conjuntivo e reabsorção óssea osteoclástica (LINDHE & LANG, 2020). A ativação dos osteoclastos é regulada por expressão do receptor RANK, células dendríticas, fibroblastos e linfócitos T (GIBERTONI et al., 2017), fundamentais na perda óssea (afetando os tecidos de suporte periodontais). Entretanto, um desequilíbrio entre as citocinas derivadas de subpopulações de linfócitos T1, T2, T17 e Treg são responsáveis pela degradação periodontal (ARJUNAN et al., 2018).

As quimiocinas são responsáveis pela migração e ativação de subpopulações de leucócitos em tecidos periodontais inflamados. É uma das subfamílias de quimiocinas que inclui proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP-1) e podem atrair células T, monócitos e eosinófilos, conhecidos como RANTES, bem como a proteína induzida por interferon γ (IP-10), (PALOMINO; MARTI, 2015). Outra quimiocina importante nesse estudo em relação ao processo inflamatório periodontal, é a IL8, que é uma potente citocina quimioatraente e ativadora de neutrófilos liberados em células endoteliais, fibroblastos gengivais, neutrófilos, monócitos no sulco gengival (FINOTI et al., 2017). Especificamente, a microbiota existente no meio subgengival em condições favoráveis (má higiene, imunossupressão, agentes irritativos e fatores de risco associados) inicia a resposta imune por estímulos de células locais (ligamento periodontal) via receptores toll-like. Células do tecido de conexão e osso alveolar produzem citocinas e quimiocinas, incluindo (fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas IL-1 β , IL6, IL-8, IL-12, IL-17 e receptor ativador do fator nuclear Kappa B

ligante (RANK-L). Microorganismos localizados no biofilme podem alcançar o tecido de conexão em direção ao osso alveolar, com expressão de RANK-L por osteoblastos, que estão fortemente associados à reabsorção óssea. Persistindo a infecção, a liberação de mediadores inflamatórios continuam e a ativação das células B e T. Neste estágio, a infiltração é predominantemente de linfócitos B (RANK-L) no tecido conjuntivo.

Figura 1 – Patogênese da periodontite



Fonte: MOLON *et al.* (2019).

As células T produzem TNF α e IL17 aumentando a osteoclastogênese e reabsorção óssea que caracterizam os sinais clínicos e de diagnóstico como o aumento da perda do nível clínico de inserção (NIC), (MOLON *et al.*, 2019), conforme a descreve a figura 1.

O tratamento destinado para controlar a infecção por biofilme periodontal resulta em uma resolução positiva dos sinais clínicos e histológicos da inflamação e estudos têm mostrado que em sítios que seguem a terapia periodontal básica e não cirúrgica, o perfil da expressão inflamatória foi reduzido em comparação com controles saudáveis e a terapia periodontal básica resulta em uma forte redução da microbiota, consequentemente a diminuição do estímulo da inflamação e resposta imune (BEIKLER *et al.*, 2008). Embora essas diferenças são

notórias antes e depois a terapia periodontal básica, é importante avaliar quanto a medicação antineoplásica interfere e associações a condições sistêmicas como no câncer influenciam fortemente o tratamento periodontal. Outra limitação potencial é a possibilidade de confusão nas estimativas de risco.

2.1.1 Microbiota Subgingival como Etiologia da Periodontite

O microbioma bucal é definido como o conjunto de genoma dos microorganismos que habitam a cavidade oral comum para todos os indivíduos, porém o microbioma variável é exclusivo aos indivíduos dependendo de outros fatores associados como estilo de vida e diferenças fisiológicas. Depois do intestino, a cavidade oral é a segunda maior comunidade microbiana dos humanos. Possui dois tipos de superfície colonizadas pelas espécies bacterianas como: os tecidos moles (mucosa oral) e duros (superfície dentária) e o conjunto dessas espécies bacterianas constituem o biofilme oral que compõe a microbiota oral.

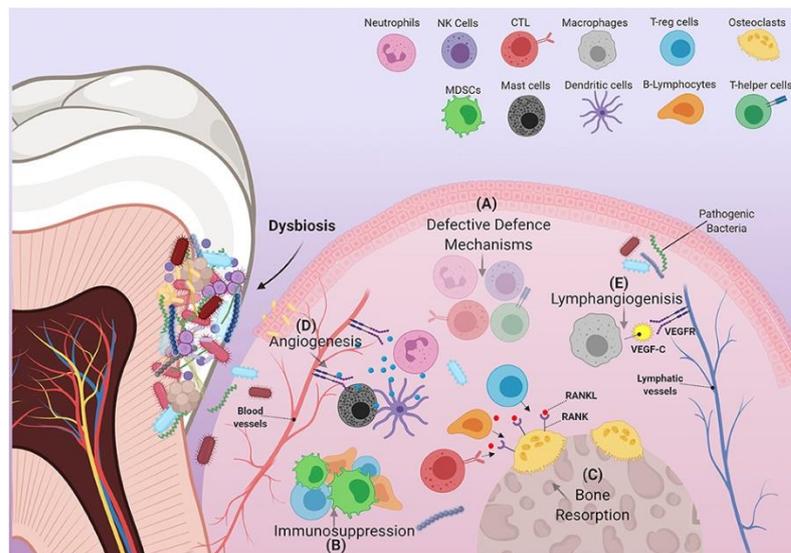
A microbiota oral permite interações entre suas espécies constituintes. Possui cerca de 800 espécies bacterianas distintas (750 milhões de microorganismos/ml saliva e 200 bilhões/g de biofilme). A cavidade oral possui temperatura em média de 37°C estável normalmente e pH 6.5, que fornece ambiente propício à colonização e sobrevivência bacteriana que se inicia já na vida intrauterina. O estabelecimento de micro-organismos se dá através de suas capacidades de aderência às superfícies do meio bucal ou que se refugiam em sulcos, fissuras ou espaços interproximais dos elementos dentários. Os determinantes ecológicos que dão condições onde os micro-organismos da microbiota oral irão se estabelecer como o fator de aderência às superfícies dos tecidos (DEO; DESHMUKH, 2019).

A microbiota subgingival é uma comunidade complexa e diversa de microorganismos que vivem dentro de um determinado nicho anatômico (HAJISHENGALLIS, 2015). A etiologia da periodontite está relacionada fundamentalmente aos patógenos presentes no biofilme subgingival que constituem a sua microbiota. O biofilme subgingival se forma a partir da migração apical do biofilme supragingival em decorrência do aumento de volume gengival, ocasionado pelo processo inflamatório presente na gengiva, e um aumento na quantidade e

diversidade de espécies bacterianas nesse nicho (LAMONT, KOO & HAJISHENGALLIS, 2018).

Alguns patógenos podem proliferar e apresentar características novas e agredir os tecidos de suporte do periodonto. Podemos afirmar que um desequilíbrio entre o hospedeiro e microorganismos patogênicos possa levar o desenvolvimento da periodontite por colonizar estes biofilmes (SOCRANSK; HAFFAJEE, 2002). Os níveis dessas espécies bacterianas nos sítios periodontais colonizados e a resposta imune de combater esses patógenos agressores são condições fundamentais para os sinais clínicos da periodontite.

Figura 2 – Células do sistema imunológico no periodonto inflamado: (A) células imunológicas e suas funções defensivas; (B) Células imunes supressoras: MDSCs, T-regs, B-regs recrutadas/vigilância imune; (C) Aumento da expressão de RANKL por T-regs, Linfócitos citotóxicos T e B e perda dos tecidos de suporte; (D) Expansão da resposta imune em nível vascular; (E) Macrófagos facilitam expansão aos vasos linfáticos pela produção de VEGF-C



Fonte: ELEBYARY *et al.* (2021).

As investigações pioneiras da inflamação gengival evidenciaram que o acúmulo de biofilme em superfícies dentárias mesmo higienizadas leva ao avanço inflamatório e envolve os tecidos periodontais, mas sem uma definição acerca do que realmente causava a destruição de todo o conjunto dos componentes do periodonto no que refere à qualidade ou a quantidade das

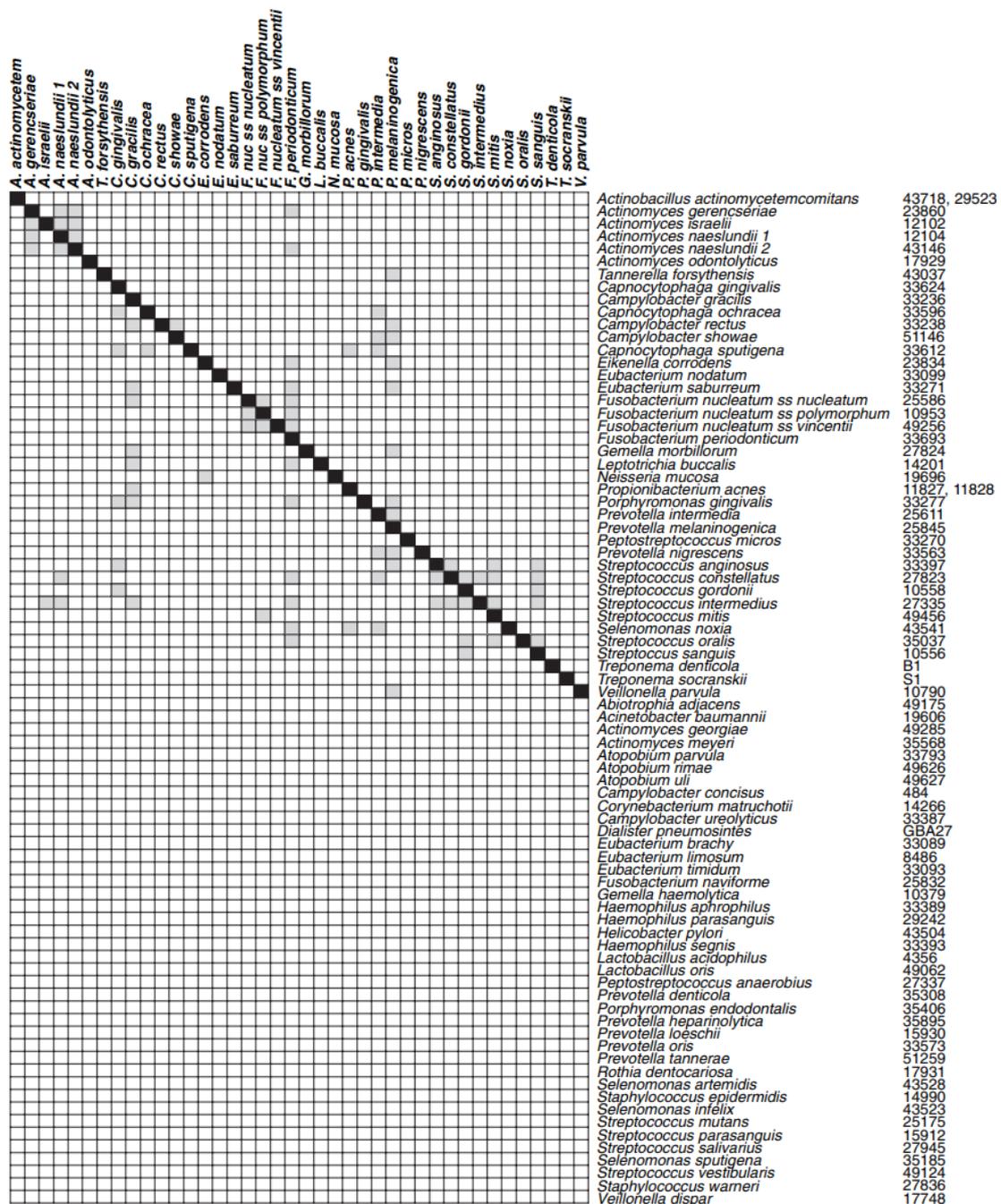
espécies bacterianas que colonizam o meio subgengival. O que ficou conhecida como a “hipótese da placa específica e não específica” (LINDHE & LANG, 2020). Com os avanços das técnicas de biologia molecular e imunologia, foi possível detectar os microorganismos que compõem a microbiota oral e assim fazer uma caracterização mais precisa das espécies bacterianas que integram o meio subgengival e são pertinentes a vários tipos de periodontite (LAMONT, KOO, HAJISHENGALLIS, 2018). Então, Killian e colaboradores (2016) afirmaram que a patologia do periodonto é resultado de um desequilíbrio na microbiota total devido ao estresse ecológico, com aumento de alguns patógenos orais ou micro-organismos relacionados à doença e instituiu a “hipótese da placa ecológica”. Depois de reconhecer que os colonizadores primários da placa dental são predominantemente micro-organismos gram-positivos, e, posteriormente, gram-negativos, definiram as bactérias dentro da microbiota subgengival, colocando-as em cinco complexos, culminando assim com a Hipótese dos Complexos Microbianos (FANA et al 2021.; MOHANTY et al, 2019). SOCRANSK e colaboradores (1994) apresentaram a técnica de diagnóstico microbiológico do Checkerboard DNA-DNA hybridization. A hibridização utiliza até 45 amostras de DNA contra 30 sondas de DNA (1350 hibridizações) em uma única membrana de suporte. Existem dois tipos de hibridização checkerboard: uma que utiliza sondas inteiras de DNA genômico, sendo hibridizadas em uma amostra de DNA sobre a membrana; e outra que utiliza amplicons de rRNA 16S, sendo hibridizadas às sondas de rRNA 16S sobre a membrana. Este último método tem sido referido como captura reversa de hibridização checkerboard de oligonucleotídeo, baseado no RNA 16S.

Em ambos os métodos, sinais de hibridização são detectados por meio de quimiofluorescência. Os sinais quimiofluorescentes resultantes das reações de hibridização foram quantificadas usando Fluorimager e usadas para avaliar a sensibilidade e especificidade das sondas. A sensibilidade das sondas foram ajustadas para detectar 10^4 células.

A utilização do método de hibridização checkerboard como uma ferramenta de diagnóstico tem sido usado mais rotineiramente para fins de investigação e enumeração de várias espécies bacterianas em sistemas microbiológicos complexos, apesar da dificuldade de enumerar espécies difíceis e especificar certos táxons como oferecem as novas técnicas de sequenciamento de nova geração. Muitas publicações utilizaram a técnica do DNA genômico das 40 espécies do complexo de Socransky ao invés de uma espécie somente e assim analisar o papel real dessas espécies e responder as questões biológicas e pesquisas ecológicas, além

da utilização em quantificação de múltiplos mediadores inflamatórios no processo de saúde e doença do periodonto humano.

Figura 3 - Demonstração das hibridizações das sondas de DNA homólogas e heterólogas entre 40 sondas de DNA genômicas inteiras (vertical) e 80 DNA de espécies alvos (horizontal). A linha preenchida em preto representa o sinal (100%) da sonda alvo homóloga das 40 espécies dos complexos de Socransky. Os quadrados sombreados representação as reações heterólogas de 10 a 20% dos sinais homólogos. Os números de 4 a 5 dígitos representam o número de cepas ATCC (American Type Culture Collection) e as outras denominações pertencem ao Instituto Forsyth.



Fonte: SOCRANSKY *et al.* (2004).

Essa determinação microbiológica detecta 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgingival em indivíduos com e sem periodontite (PASTER & DEWHIRST, 2009) que se inserem em 5 complexos bacterianos principais no meio subgingival no que refere às diferentes espécies. Esses complexos são: vermelho, muito relacionado à profundidade de sondagem (PS) e ao sangramento à sondagem (SS), composto por (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*), laranja dividido em 2 grupos, o central (*Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum* e *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*) e outro periférico (*Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Streptococcus constellatus*). Os outros 3 complexos, o amarelo, o verde e o roxo demonstraram grande associação entre si e menor associação com os 2 primeiros. O complexo verde compõe (*Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*); o complexo amarelo por um grupo de streptococos (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*) e o complexo roxo que inclui (*Actinomyces odontolyticus* e *Veilonella parvula*). As espécies de *Selenomonas noxia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo b não se correlacionam com outras espécies. Algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* sorotipos I e II) foram agrupados no complexo azul (SOCRANSK & HAFFAJEE, 2005).

2.2. Inflamação e câncer

Recentemente, a associação entre inflamação e câncer tem sido explorada, pois o sistema imune tem a habilidade não apenas de prevenir a progressão do tumor como também promovê-lo. Os principais tipos de inflamação na tumorigênese incluem: inflamação crônica que precede o desenvolvimento do tumor, a inflamação associada ao tumor e a inflamação induzida por terapia (JIANG; SHAPIRO, 2014). Um estudo longitudinal de 10 anos encontrou uma significativa associação entre mortalidade por câncer pancreático em indivíduos com periodontite e contribuiu consideravelmente para a diferença de mortalidade geral por câncer (HEIKKILÄ., et al 2018).

Células como quimiocinas e citocinas estão presentes no microambiente tumoral, além de espécies reativas de oxigênio (ROS), ciclooxigenase-2 (COX-2) e o fator nuclear Kappa (NF- κ B) podem conduzir a condições celulares favoráveis para a promoção do tumor. Os papéis das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, CCL5 e CXCL12 em câncer de mama estão estabelecidos (GOLDBERG & SCHWERTFEGER 2010, BAUMGARTEN & FRASOR 2012) bem como na patogênese da periodontite (MOLON et al., 2019).

A relação entre inflamação e câncer pode ser explicada por duas vias consistentes: a primeira, no qual um estado inflamatório constante contribui para o aumento do risco de câncer, e a segunda que alterações genéticas adquiridas levam ao desenvolvimento da neoplasia maligna (PENDYALA et al., 2013), sinais estes que os quais ainda busca uma relação causal consistente entre inflamação e tumores de mama, pois é certo que as células inflamatórias e mediadores estão presentes na maioria dos tumores, independentemente do gatilho para o desenvolvimento. Assim, as duas vias no processo de desenvolvimento do câncer dependem das suas interações específicas com fatores genéticos, epigenéticos e fatores ambientais (SLATTERY et al., 2009; DEL PRETE et al., 2011; PENDYALA et al., 2013), além de que a exposição prolongada aos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias é considerada pró-tumorigênica (COUSSENS; ZENA, 2002). No que refere as quimiocinas, é provável que tenham um papel na indução e pelo acúmulo local de células inflamatórias e desempenham o mesmo papel na formação de infiltrados peri e intra-tumorais. Em parte, isso pode ser uma consequência de sua capacidade de atrair células mononucleares para o tumor, onde elas promovem o seu crescimento ou de fatores angiogênicos que estimulam seu desenvolvimento (ROSSI; ZLOTNIK, 2000; BARRETT, 2006). Com a inflamação, além da liberação de mediadores inflamatórios, ocorre o aumento da proliferação celular, da mutagênese, promoção da angiogênese e inibição da apoptose (MICHAUD et al., 2007), a progressão e sobrevivência das células malignas, angiogênese, metástases e resposta às drogas antineoplásicas (MANTOVANI et al., 2008).

Como consequência da resposta inflamatória, as mudanças ecológicas na região subgingival estão associadas não somente à periodontite, mas também à inflamação crônica, ativando vias intracelulares específicas. A natureza polimicrobiana da periodontite e as interações entre espécies bacterianas contribuem para o melhor entendimento dos modelos atuais dessa doença assim como o estímulo da resposta imune (HOARE et al., 2019).

2.3. Periodontite e doenças sistêmicas

Recentemente começaram surgir evidências de uma grande ligação entre periodontite com diversas patologias sistêmicas. Como um processo inflamatório crônico, é uma fonte em potencial constante de infecção, mas antes considerada como fator de risco separado para doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, arterial periférica, respiratórias e baixo peso ao nascer (OHYAMA et al., 2009). Foi descrita com vasta capacidade de aumentar a morbidade e mortalidade por diabetes, artrite reumatóide, obesidade, osteoporose e complicações na gravidez (FOWLER; BREAUULT; CUENIN, 2001). A cavidade oral contém milhões de bactérias que causam as duas principais doenças bucais como a periodontite e a cárie. Na maioria das vezes, a disseminação bacteriana é transitória, mas em outros casos, principalmente em indivíduos com o sistema imune comprometido, os patógenos orais podem contribuir na progressão de muitas patologias sistêmicas. Produtos bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS) e endotoxina são liberados na circulação sistêmica provocando a resposta inflamatória em órgãos-alvo como ocorre também no periodonto doente rico em mediadores inflamatórios (KUMAR, 2013).

Estudos posteriores confirmaram a ligação positiva da periodontite com várias formas de câncer, entre eles: esofágico, gástrico, pulmão, próstata, mama, hematológicos, entre outros, (FITZPATRIC; KATZ, 2010) de pâncreas (ARORA et al., 2010; MICHAUD et al., 2007; TANWIR; SADIA; SHAUKAT., 2012), trato digestivo, colorretal, cabeça e pescoço em indivíduos que não eram tabagistas e nem alcoolistas (MANTOVANI et al., 2008); doenças cardiovasculares e diabetes (RECH., et al 2007). Mecanismos específicos e vias patológicas foram identificados ligando diretamente a periodontite a essas comorbidades, como a circulação dos patógenos para a corrente sanguínea, inflamação sistêmica e dano autoimune induzido (SCHENKEIN et al., 2020).

A grande justificativa para associar a periodontite e às doenças sistêmicas está relacionada ao longo prazo da inflamação periodontal e a presença contínua da microbiota no ambiente subgingival. O papel dos patógenos como o vírus papiloma humano (HPV) e Epstein-Barr (EBV) foram detectados em bolsas periodontais como agentes suspeitos de câncer oral por meio da ativação de oncogenes específicos (como E6 e E7 para HPV), favorecendo assim o início do câncer. Esses patógenos podem ser encontrados em carcinomas da gengiva e associados a tumores distantes (CORBELLA et al., 2018). Interessantemente, frente ao cenário da recente pandemia da COVID 19, outro estudo apresentou fortes associações

observadas entre a periodontite e a gravidade da COVID-19, no qual a aspiração de bactérias da microbiota subgengival pode agravar essa síndrome respiratória aguda induzindo a expressão da enzima conversora de angiotensina 2, um receptor para SARS-CoV-2, e citocinas inflamatórias no trato respiratório inferior (CAMPISI; BIZZOCA; LO MUZIO, 2021).

O papel do microbiota oral, como a espécie bacteriana *P. gingivalis* induz o aumento dos linfócitos B e a expressão de IL1 β , da IL6 e IL8 pela IL17 que afetam a atividade osteoclástica e coloniza lesões pré-malignas como do esôfago e do carcinoma oral de células escamosas (LINDHE & LANG, 2020). Possui também um efeito carcinogênico importante pela inibição apoptótica nas células epiteliais, criado por meio do prolongamento da sobrevivência e proliferação celular, um mecanismo de proteção intrínseco de células cancerosas com capacidade para invadir, proliferar e sobreviver no interior do citoplasma das células infectadas, assim, propagar para células contíguas (ARJUNAN et al., 2018). Estudos demonstram como os patógenos orais presentes constantemente no biofilme subgengival e engançados na progressão da periodontite podem aumentar a carga tumoral no cólon, mama e cavidade oral (ELEBYARY et al., 2021)

Precisa estabelecer de forma consistente se os patógenos periodontais estimulam o desenvolvimento de doenças sistêmicas ou se as doenças sistêmicas provocam a abundância de patógenos periodontais e sua diversidade. Se os patógenos causam as doenças orais, eles representam alvos certos da intervenção terapêutica e podem ser marcadores preditivos quanto à suscetibilidade das doenças sistêmicas (BUI et al., 2019).

2.4. Câncer de mama

Dados epidemiológicos indicam o câncer de mama (CAM) como a malignidade mais frequente em mulheres em todo o mundo (JEMAL et al., 2011; SIEGEL et al., 2011). Com prevalência estimada ao longo da vida de 12% para mulheres que se encontram sob risco usual, representa 23% do total de diagnósticos de câncer em mulheres e 14% das mortes por câncer em mulheres nos EUA (JEMAL et al., 2011). A situação no Brasil assemelha-se bastante ao cenário internacional. Dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) demonstram que essa neoplasia, excluindo-se tumores de pele não-melanoma,

representa o câncer mais frequente em mulheres. Em 2020 ocorreu a estimativa de 66280 mil casos novos da doença em todo Brasil. No Espírito Santo foram esperados 790 novos casos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2020). Além da grande taxa de incidência e mortalidade, o CAM traz para as mulheres efeitos psicológicos que influenciam grandemente a sua qualidade de vida (CULBERTSON et al., 2020). Em virtude do acima exposto, esta condição destaca-se como importante problema de saúde pública, representando a principal causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento e a segunda principal causa nas regiões desenvolvidas, superada somente por câncer de pulmão (INCA, 2020).

É uma doença com características histopatológicas, biológicas e diferentes aspectos clínicos, o que resulta respostas diversas às terapias sistêmicas, portanto, não pode ser visto como uma patologia unicamente clínico-patológica (VIALE, 2012). A graduação histológica representa uma medida da diferenciação celular. O grau do tumor está associado ao intervalo livre e à sobrevida livre de doença e à sobrevida específica pelo câncer de mama. O grau histológico é um fator de prognóstico independente, de validade extensamente comprovada. Na graduação histológica de Nottingham Combine Histológico Grade (NCHC) (VAN DOOIJEWERT; VAN DIESRT; ELLIS, 2021); é tradicionalmente expressa em três categorias de diferenciação: I) bem diferenciado (somatório final de 3 a 5) baixo grau; II) moderadamente diferenciado (somatório final de 6 a 7) grau intermediário; III) pouco diferenciado (somatório final de 8 a 9) alto grau. Essa classificação baseia-se na soma da pontuação para determinados critérios como formação tubular, polimorfismo nuclear e contagem mitótica. A sobrevida em 20 anos, entre pacientes com neoplasias graus I, II e III (SBR), é estimada em, respectivamente, 41, 29 e 21%. Foi necessário a sua classificação de acordo com sua natureza molecular e os planos de tratamento agora estão determinados de acordo com o subtipo (FRAGOMENI; SCIALIS; JERUSS, 2018). Dentre os diversos subtipos moleculares do CAM, cabe destacar que cerca de 15% a 25% desses casos são classificados como HER2-positivos (Human Epidermal Growth fator Receptor 2), ou seja, as células tumorais apresentam mutação no gene HER2 ou superexpressão dessa proteína em suas membranas plasmáticas (SON et al., 2020). Tumores que apresentam esta alteração molecular demonstram fenótipo clínico mais agressivo e têm pior prognóstico quando comparados com cânceres de mama luminais HER2 positivo.

Atualmente, o CAM é classificado de acordo com suas características histológicas (invasivos ou localizados (in situ)), imuno-histoquímicas e moleculares. Em sua classificação imuno-histoquímica se baseia na expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona

(RP), superexpressão do receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) pelas células tumorais, bem como pelo índice de proliferação celular por meio da investigação da expressão da proteína Ki67 pelas mesmas (DOWSETT et al., 2011) como demonstra a tabela 1 da figura abaixo.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO O IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS TUMORES DE MAMA.

Subtipo Imuno-histoquímico	Padrão de imunomarcacão
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2*- e Ki-67 <14%**
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2*- e Ki-67 ≥14%**
	RE+ e/ou RP+, HER2*+
HER2	RE-, RP- e HER2*+
TNBC	RE-, RP-, HER2*-

Fonte: CHEANG *et al.* (2009).

Nota: São considerados casos positivos aqueles com score >3; Score = 2 , devem ser submetidos a análise por FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) ou CISH (Chromogenic In Situ Hybridization) para confirmação.** (KIYOSE et al., 2012).A imunomarcacão da proteína Ki67 ≥14% correlaciona com alta taxa de proliferação celular

Em sua classificação, os subtipos moleculares, conforme descrito na Tabela 1, (luminal A, luminal B, basalóide, HER2 “enriched” e normal-símile), os estudos demonstraram que o fenótipo diverso do CAM é acompanhado de uma heterogeneidade no padrão de expressão gênica (GEP) e ele pode ser classificado em subtipos distintos a partir das diferenças no GEP (SON et al., 2020).

2.5. Plausibilidade entre periodontite e câncer

É possível que a inflamação crônica induzida por patógenos periodontais sirva como uma potencial causa do descontrole de crescimento celular normal iniciando a carcinogênese (MEYER et al., 2008). Esses patógenos obtêm acesso a corrente sanguínea e se disseminam

localmente nos tecidos adjacentes, liberando citocinas e outros mediadores inflamatórios que podem, assim, estar envolvidos na carcinogênese (RAJEEV et al., 2012; MEURMAN, 2010). Estudos de Bui e colaboradores (2019), mostraram também que a disseminação sanguínea de vários patógenos bacterianos periodontais pode ocorrer em consequência de procedimentos cirúrgicos, acúmulo de biofilme por má higiene e fatores externos que possam induzir a resposta inflamatória incluindo as espécies *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Treponema denticola*.

Outra abordagem significativa são as alterações causadas pelo tratamento do câncer na microbiota oral, levando o surgimento de patógenos, problemas de saúde sistêmicos e desencadeando mecanismos tumorigênicos em nível celular (MEURMAN, 2010). Além disso, a periodontite pode contribuir para o estabelecimento de uma condição inflamatória sistêmica em indivíduos geneticamente susceptíveis, conhecidos como "fenotipo hiper-inflamatório", envolvendo o aumento da produção de marcadores inflamatórios relacionados ao sistema imunológico (VAN KEMPEN; DE VISSER; COUSSENS, 2006; PENDYALA et al., 2013).

Mecanismos específicos e vias patológicas foram identificados ligando diretamente a periodontite a essas comorbidades, como a circulação dos patógenos para a corrente sanguínea, inflamação sistêmica e dano autoimune induzido (SCHENKEIN et al., 2020).

As espécies bacterianas prevalentes na microbiota subgingival como *Fusobacterium nucleatum*, tem sido associada ao câncer colorretal (ABED et al., 2020) e a *Porphyromonas gingivallis* pode desempenhar um papel na carcinogênese do pâncreas, afetando a resposta imune do hospedeiro e causando respostas inflamatórias, promovendo a carcinogênese (MICHAUD, 2013).

Em um estudo recente, a espécie *F. Nucleatum* pode colonizar o tecido colorretal usando sua lectina Fap2, que se liga ao Gal-GalNAc (N-acetil-D-galactosamina) mostrado em tumores e os níveis de Gal-GalNAc aumentam conforme o câncer de mama humano progride. A ocorrência de gDNA de *F. Nucleatum* em amostras de tumores de mama se correlaciona com altos níveis de Gal-GaINAc (PARHI et al., 2020).

Fitzpatrick e Katz (2010) realizaram uma revisão da literatura e verificaram a relação entre a periodontite ou perda dentária em humanos com aumento do risco de vários tipos de câncer. Estudos avaliaram a grande associação entre periodontite e perda de dentes na progressão de vários tipos de câncer, independente dos fatores de risco conhecidos, como álcool e tabaco

(TANWIR; SADIA; SHAUKAT., 2012).

A periodontite pode ser um indicador útil de um sistema imune susceptível, afetando diretamente o risco de câncer com um perfil inflamatório e ter implicações até na progressão do crescimento da neoplasia maligna (MICHAUD et al., 2008; MEYER et al., 2008; SOORY, 2010). Vale ressaltar que o CAM é uma doença heterogênea e esses resultados podem ser limitados para uma doença, tempo de estudo e grupo específico (GOLDVASER et al., 2017).

Diante dessa fundamentação teórica, este estudo avaliará um grupo de mulheres com câncer e sem câncer de mama, com e sem periodontite em um acompanhamento clínico de 2 fases.

3. OBJETIVO GERAL

Diante a relevância do impacto das condições de saúde oral sobre populações com câncer, o presente estudo tem como objetivo principal investigar o efeito da progressão da periodontite em pacientes com câncer de mama, considerando os fatores de riscos já estabelecidos e a terapia periodontal básica.

3.1. Objetivos específicos

- Caracterizar a condição sociodemográfica dos grupos;

Nos grupos e fases:

- Caracterizar a microbiota subgingival pelo método Hibridização Checkerboard DNA-DNA na detecção de 40 espécies bacterianas dos biofilmes coletados;
- Caracterizar a microbiota subgingival com o $NIC \geq 4mm$, a idade e a perda dentária;
- Avaliar os níveis de citocinas IL8, $TNF\alpha$, IL6 e IL1 β dos fluidos gengivais coletados;
- Avaliar os parâmetros clínicos periodontais: perda dentária, IPV, ISG, PS, NIC e SS;
- Comparar parâmetros clínicos periodontais: perda dentária, IPV, ISG, PS, NIC e SS com os subtipos moleculares;
- Correlacionar a perda dentária e $NIC \geq 4mm$ com o grau histológico (Nottingham) dos tumores das pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção de pacientes

A presente investigação é um estudo observacional composto por mulheres com diagnóstico confirmado de câncer de mama (grupo caso) e sem diagnóstico positivo para câncer de mama (controle), expostas ou não à periodontite com acompanhamento longitudinal, mediante a aprovação do comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (CEPE-CCS-UFES) CAAE nº: 88131918.6.000.5060 (APÊNDICE B) e inscrição no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) nº 11346. A população foi avaliada em duas (2) fases durante 14 meses nos anos de 2018 e 2019 de acordo com os protocolos de tratamento do câncer e periodontal durante os atendimentos ambulatoriais.

Esta investigação foi realizada na Clínica de Periodontia e do Serviço de Radiologia Odontológica do Instituto de Odontologia (IOUFES), no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia, no Serviço Anátomo-patológico, no laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano, do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória-ES, Brasil.

Para o tamanho da amostra foi realizado o cálculo amostral no programa Epi-info versão 7.0. Os parâmetros utilizados no cálculo foram: a prevalência de periodontite entre os casos de 79.2%, com razão de chances de 3.0, número de controles por caso de 1:1, poder de 80%, nível de confiança de 90%, portanto, chegou ao tamanho de amostra de 50 mulheres em cada grupo, o que resultou em um tamanho de amostra de 100 mulheres (ANEXO 3, cenário 1).

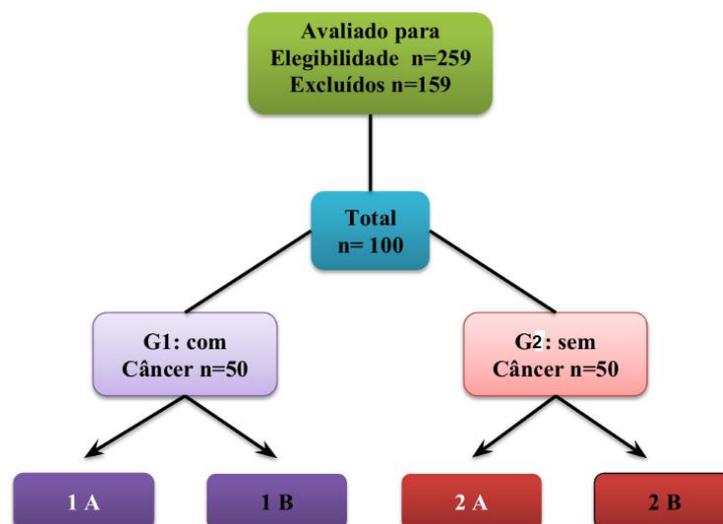
Os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa de acordo com sua acessibilidade e disponibilidade, examinados de acordo com os critérios de inclusão que compreendem: para o grupo com câncer de mama e que ainda não tenham iniciado o tratamento antineoplásico (grupo caso), ter idade acima de 30 anos, possuírem no mínimo de 10 a 15 elementos dentários, com grau periodontal saudável e com periodontite, não serem portadoras de outras doenças sistêmicas, não terem feito terapia periodontal nos últimos 6 meses e não estarem fazendo uso antibioticoterapia e anti-inflamatórios. Para o grupo sem câncer de mama ter idade acima de 30 anos, possuírem no mínimo de 10 a 15 elementos dentários, com grau

periodontal saudável e com periodontite, não serem portadoras de outras doenças sistêmicas, não terem feito terapia periodontal nos últimos 6 meses e não estarem fazendo uso antibioticoterapia e anti-inflamatórios.

As pacientes que atendiam aos critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo foram inseridas aos grupos de estudo ao longo do tempo da coleta de dados até o tamanho da amostra de 100 participantes (50 casos e 50 controles). É válido destacar que os critérios de exclusão adotados na metodologia desta pesquisa, procuraram minimizar erros de diagnósticos principalmente relacionados à presença da doença periodontal.

Os objetivos e protocolo do estudo foram claramente explicados a todas as participantes, assim como disponibilizamos o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) no ANEXO 1. Cada integrante foi submetida a um mapeamento do periodonto completo, em pacientes com bolsas periodontais $\geq 4\text{mm}$ foram utilizadas radiografias odontológicas periapicais para avaliar de forma complementar a progressão da periodontite. As participantes foram classificadas em 2 grupos, com e sem câncer de mama, de acordo com o estado de saúde periodontal: grupo 1: 50 pacientes com câncer de mama (1A: 24 expostas à periodontite 1B: 26 não expostas à periodontite; e grupo 2: pacientes sem câncer de mama (2A: 30 expostas à periodontite e 2B: 20 não expostas à periodontite), em 2 fases com intervalo de 3 a 4 meses.

Figura 4 - Fluxograma demonstrando a seleção das pacientes do estudo



Fonte: ambulatório de periodontia/IOUFES/UFES.

4.2. Avaliação clínica odontológica e médica

Todas as pacientes foram avaliadas inicialmente através de questionário semiestruturado, com informações sócio-demográficas, histórico médico/odontológico e hábitos de vida (ANEXO 2). Para o exame clínico intra-bucal foram necessários: espelho bucal, pinça de algodão, sonda periodontal de Williams (Hu-Friedy, Mfg. Co. Inc., Chicago, IL, USA) com afastador e sugador bucal utilizando um odontograma (APÊNDICE E) para inserir os dados. Todos os procedimentos foram realizados respeitando-se as normas de biossegurança (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MS/2020). Para as pacientes do grupo com câncer, foram avaliados os dados clínicos e o planejamento prévio da terapia antineoplásica e seu acompanhamento na Fase 2 com diagnóstico confirmado de CAM até 1 mês para inclusão no estudo e tratamento no intervalo de 12 a 14 meses. Esses dados foram obtidos através dos prontuários das pacientes no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia e no Serviço Anátomo-patológico.

4.2.1. Avaliação radiográfica dentária

Foram realizadas tomadas radiográficas do elemento dentário que possuía o sítio de escolha para coleta de fluido gengival e biofilme subgengival selecionado previamente nas pacientes dos grupos em ambas as fases, porém somente para aquelas com profundidade de bolsas ≥ 4 mm com como auxílio da avaliação do estágio da periodontite (CATON et al., 2018), (FIGURAS COMPLEMENTARES 3). A tomada radiográfica foi realizada com os posicionadores de película periapical do tipo Hanshin (Dentsply Rinn, Elgin, IL, EUA) para técnica interproximal. As radiografias foram realizadas no aparelho Timex 70E (Gnatus, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), operando a 70kVp e 7mA, com tempo de exposição na região de molares igual a 0,63 seg, e 0,5 seg para região de pré-molares. Serão utilizados filmes radiográficos 1.2 (periapical padrão), sensibilidade E (Ektaspeed, Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA). Os filmes foram processados manualmente segundo o método tempo-temperatura, em tanques de processamento instalados em uma câmara escura segundo os critérios técnicos da legislação em Radiologia. Em ambiente com iluminação reduzida, a tomada das áreas proximais

(mesiais e distais) de cada elemento dentário foi mensurada por dois avaliadores, de forma independente. Para isso, as radiografias foram fixadas em um negatoscópio de luz fria. As mensurações foram efetuadas da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar (COA), utilizando um paquímetro digital e lupa com magnificação de 1.3x. A avaliação radiográfica dos dentes que tinham indicação para extração não foi feita.

4.2.2. Medidas dos Parâmetros Clínicos Periodontais

Os parâmetros clínicos periodontais foram coletados para cada indivíduo, em todos os dentes presentes. Foram realizadas as mensurações na Fase 1 e 2 de: perda dentária, Profundidade de Sondagem (PS), Nível de Inserção Clínica (NIC), Índice de Placa Visível (IPV), Sangramento à sondagem (SS) e Índice de Sangramento Gengival (ISG) dos 6 sítios periodontais por elemento dentário de todas as pacientes, porém foi escolhido um (1) sítio periodontal de qualquer elemento dentário na maxila ou mandíbula com $PS \geq 4\text{mm}$ para as pacientes com periodontite e $PS \leq 3\text{mm}$ nas pacientes sem periodontite.

As mensurações clínicas periodontais serão realizadas sobre a superfície de todos os dentes e sítios: méso-vestibular (MV), vestibular (V), disto-vestibular (DV), méso-lingual (ML), lingual (L), disto-lingual (DL), méso-palatino (MP), palatino(P) e disto-palatino (DP); exceto os terceiros molares.

Utilizando-se sonda periodontal reta milimetrada, modelo Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15, Hufriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), foram coletadas essas medidas clínicas em cada paciente para cada parâmetro clínico periodontal como: (1) profundidade de sondagem (PS/figura 5), aferindo-se a distância, em milímetros, entre a margem gengiva livre e a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal; (2) nível de inserção clínico (NIC), aferindo-se a distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal; (3) índice de placa visível (IPV): presença (escore 1) ou ausência (escore 0); (4) índice de sangramento gengival marginal (ISG): presença (escore 1) ou ausência (escore 0), aferido após percorrer levemente a sonda ao longo do sulco/bolsa gengival, (5) sangramento à sondagem (SS): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento após 20 segundos da sondagem.

Figura 5 - Medida de PS=4mm e NIC=4mm



Fonte: ambulatório de periodontia/IOUFES/UFES.

A presença de periodontite foi definida se $PS \geq 4,0\text{mm}$ em algum sítio dentário e sem periodontite se $PS \leq 3,0\text{mm}$ (CATON et al., 2018). O $NIC \geq 4,0\text{mm}$ para as pacientes com periodontite. As pacientes que tinham elementos dentários indicados para extração foram encaminhadas à clínica de cirurgia bucomaxilofacial I (CBMF I) para realizar o procedimento na fase 1 e estes elementos dentários foram excluídos da avaliação.

4.2.3. Concordância entre examinadores

Com o objetivo de melhorar o nível de concordância, os parâmetros clínicos periodontais de ISG, IPV, SS, PS e NIC foram coletados por um dois examinadores, sendo a mensuração da profundidade de sondagem e do nível de inserção clínico foram repetidos em 5 pacientes aleatoriamente, com intervalo de sete dias, para averiguar a concordância entre-examinadores. O teste estatístico de Kappa (ANEXO 4) foi utilizado para avaliar esta concordância e sua interpretação é apresentada no quadro 1.

Quadro 1 – Interpretação da estatística Kappa

Intervalo	Interpretação
0 a 0,2	Desprezível
0,21 a 0,4	Suave
0,41 a 0,6	Moderada
0,61 a 0,8	Substancial
0,81 a 1,0	Quase perfeita

Fonte: WIDMANN (2020).

4.2.4 Coleta de fluido gengival e de biofilme subgengival

O processo de coleta de amostras do fluido gengival e de biofilme foi realizado pela manhã após sete dias das medidas dos parâmetros clínicos periodontais em cada fase. As amostras foram retiradas de um sítio dentário de cada paciente com $PS \geq 4\text{mm}$ (o sítio com PS mais profunda, mais inflamados, com sinais clínicos de vermelhidão, edema ou sangramento à sondagem) para as que apresentavam periodontite (grupos 1A e 2A) e do sítio com $PS \leq 3\text{mm}$ para aquelas sem periodontite (grupos 1B e 2B), tomadas de cada indivíduo. Certificando que a região do sítio escolhido esteja previamente sem placa visível e seca (com gaze estéril e isolada por aspirador dental e rolos de algodão).

Para a coleta de fluido gengival foram introduzidos dois (2) cones de papéis endodônticos Dentsplay 35x40 em cada sítio durante 30 segundos, transferindo para um tubo de plástico Eppendorf com 200 μl de solução Tampão Fosfato de Sódio (PBS) devidamente identificado segundo a sigla e sítio do paciente, data, fase da coleta e depois seu armazenado a -80°C para processamento laboratorial. Uma cureta estéril Gracey reta 5-6 foi usada para remover a placa supragengival dos locais de amostragem, descartando os cones de papéis com sangue e saliva. Após, as coletas de biofilme subgengival foram retiradas do mesmo sítio dentário escolhido de para coleta de fluido gengival de cada paciente previamente. Certificando também que a região do sítio escolhido esteja previamente sem placa visível e seca com gaze estéril e isolada. As amostras de biofilme foram removidas com curetas Gracey tipo minifive

(Hufriedy) estéreis, posicinadas na porção mais apical e no sentido ápico-coronal dos sítios em um único golpe. As amostras foram transferidas para um tubo plástico Eppendorf com 150µl de solução tampão TE (10mM Tris-HCL/Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1mM de EDTA (Labsynth Produtos, Diadema, SP, Brasil), pH 7,6) e acrescentado 100µl de NaOH (Labsynth) a 0,5 M para manter a viabilidade do DNA bacteriano até o processamento laboratorial. Os respectivos tubos foram identificados com a sigla e sítio do paciente, data da coleta e fase, posteriormente, armazenados a -20°C até sua análise pela técnica de checkerboard DNA-DNA hibridização para 40 cepas bacterianas conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 – Relação das cepas bacterianas empregadas na confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas pelos complexos bacterianos de Socransky

Complexo azul		Complexo laranja (cont.)	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a	<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces naeslundii stp. 1</i>	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Actinomyces naeslundii stp. 2</i>	43146 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii</i>	49256 ^a
Complexo roxo		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>Peptostreptococcus micros</i>	33270 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
Complexo amarelo		<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	Complexo vermelho	
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
Complexo verde		Outras espécies	
<i>Aggregatibacter</i>	43717 ^a	<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>actinomycetemcomitans a e b</i>	43718 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Propionibacterium acnes I e II</i>	11827 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a		11828 ^a
Complexo laranja		<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a	<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

^a ATCC (American Type Collection)

^b Forsyth Institute

Fonte: Laboratório de Microbiologia, UNG (2019), por SOCRANSKY & HAFFAJEE (2002).

4.3. Avaliação do diagnóstico para o câncer de mama

Os dados do perfil tumoral da classificação imunohistoquímica dos tumores de mama foram extraídos dos registros médicos do Serviço Anátomo Patológico (FIGURAS COMPLEMENTARES 3) do Hospital Universitário (HUCAM-UFES) das cinquenta pacientes com diagnóstico positivo para o CAM deste estudo. A avaliação incluiu: número de prontuário, idade, status da menopausa, acompanhamento clínico, grau do tumor etc. Os critérios de diagnóstico para o CAM foram baseados nas diretrizes diagnósticas do Serviço

Anatomo-patológico do HUCAM- UFES de acordo com o consenso de 2010 da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO, 2010) e do Colégio Americano de Patologistas (CAP). O grau histológico do tumor (I, II e III) foi classificado pelo sistema de Nottingham para o CAM (VAN DOOIJEWERT; VAN DIESRT; ELLIS, 2021) e o perfil imunohistoquímico foi baseado na avaliação da expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), superexpressão do receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) pelas células tumorais, bem como pelo índice de proliferação celular por meio da investigação da expressão da proteína Ki67 pelas mesmas (expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0), e permite classificá-los em CAM luminal A, luminal B, HER-2 “enriched” e triplo-negativos (FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

4. 4. Terapia periodontal básica

As pacientes foram submetidas a sessões clínicas de adequação do meio bucal como instruções de higiene, raspagem supragengival e intrassulcular, selamento provisório das lesões cáries e curativos. A terapia periodontal conservadora compreende fundamentalmente: raspagem, alisamento radicular, aplicação tópica de flúor e uso da clorexidina solução oral a 0,12% durante 1 semana. A solução oral de clorexidina têm sido padrão ouro no controle do biofilme oral em pacientes com câncer. Em seguida, foram realizadas sessões de raspagem subgengival e alisamento radicular com curetas Gracey números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy) e aparelho de ultrassom portátil (Cavitron® Select SPS, Dentsplay Sirona, França) sob anestésico local (YAN et al., 2020) por um dos dois operadores (MCMG e ACRF). O procedimento ocorreu em torno de 1 hora e repetido no intervalo de 14 dias em cada fase. Cabe ressaltar que a adequação bucal para as pacientes do grupo caso realizou imprescindivelmente antes do início da terapia antineoplásica. As demandas adicionais e específicas quanto ao tratamento odontológico foram encaminhadas as outras disciplinas do curso de odontologia da UFES de acordo com o protocolo acadêmico do Departamento de Clínica Odontológica do Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES).

4.5. Estudo da secreção de citocinas pelo método ELISA

Foram coletadas 200 amostras distribuídas em 2 fases (100 amostras em cada fase da pesquisa) de fluido gengival dos sítios periodontais das pacientes dos grupos. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias das amostras do fluido gengival dos sítios foram determinados através do método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), por meio do *Human Uncoated ELISA Kit* (Invitrogen- Bio Source International, Camarillo, CA, 2018) para cada citocina (IL6, IL8, IL1 β e TNF α). Este ensaio realizado foi do tipo indireto, no qual o antígeno já se encontra aderido à microplaca. Foi feita a sensibilização inicial da placa acrescentando o anticorpo de captura diluído adicionando 48 μ L de solução AB-CAP para 12 mL de *coating buffer solution*. Em cada placa de ELISA (Greiner, North Carolina, USA) pipetou 50 μ L/poço do anticorpo de captura diluído. A placa foi então selada e incubada por 24 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com 500 μ L/poço com uma solução de lavagem (1x PBS, 0.05% Tween 20) em uma lavadora automática. Para controle negativo, em dois poços da microplaca de 96 poços, ao invés de colocar as amostras de fluido gengival, foram adicionados 100ml/poço de PBS (controle negativo verdadeiro). A média dos resultados de absorbância dos poços duplicados em unidades de Elisa, foi subtraída a média dos valores encontrados nos poços com controle negativo. Este protocolo de lavagem foi utilizado em todas as etapas das placas. Para o bloqueio dos poços, uma solução de 15 mL de *Assay Diluent* foi preparada, e adicionada 200 μ L por poço. Logo após, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora e lavadas, e adicionou 50 μ L das amostras clínicas em cada um dos poços.

Em seguida, os padrões disponíveis no kit foram diluídos de forma seriada para confecção da curva padrão e as placas incubadas por 24 horas. As placas foram lavadas novamente, adicionou 50 μ L de anticorpo de detecção por poço, e as placas incubadas em temperatura ambiente por 1 hora. Passado o período de incubação, as placas foram lavadas novamente e então adicionou 50 μ L/poço de *Avidin-HRP* diluída em *1x assay diluent*. As placas foram seladas e incubadas por mais 30 minutos.

Após esse tempo, as placas foram lavadas e adicionadas 50 μ L de *substrate solution* e novamente incubadas por 15 minutos. Passado o tempo de incubação, foram adicionados 25 μ L/poço da solução de parada (1M H₃PO₄). As placas foram então colocadas em uma leitora de ELISA (ELx 800 - Bio-Tek) e lidas e ajustadas no comprimento de onda de 450 nanômetros (nm). Os resultados obtidos da secreção das citocinas foram expressos em

picograma por mililitros (pg/ml) e as análises em duplicata.

4.6. Avaliação microbiológica

4.6.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista de 40 cepas bacterianas identificadas nesta análise foi descrita conforme a tabela 2. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, USA) foram reidratadas em caldo para crescimento de mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 25% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Algumas espécies foram cultivadas em meio que as suprissem nutricionalmente, como: *T. forsythia* em meio ágar-triptose de soja com 5% de sangue de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) da (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), *P. gingivalis* em suplemento com 5% de sangue de ovelha e 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma), *T. denticola* e *T. socranskii* em caldo de crescimento de Mycoplasma com 1mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

4.6.2. Isolamento do DNA e preparo das sondas

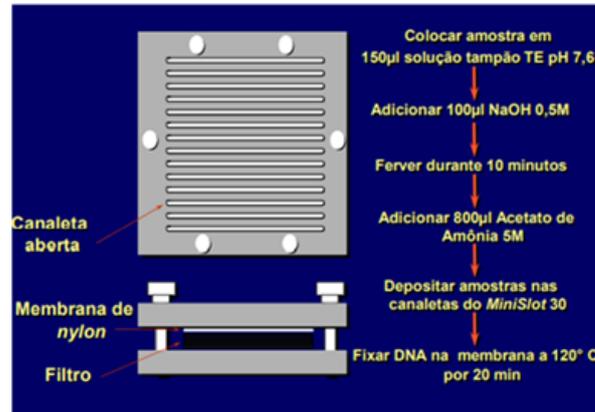
As cepas foram cultivadas anaerobicamente com exceção de 2 espécies de espiroquetas (cultivadas em caldo de 3 a 7 dias). Essas colônias foram colocadas em tubos plásticos para microcentrífuga de 1,5mL com 1mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2

vezes por solução-tampão de TE a 3.500xg por 10 minutos. A seguir, as cepas Gram- foram outra vez suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma), em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de espécies gram + foram lisadas em 150 μ L de mistura enzimática contendo 15mg/mL de lisozima (Sigma), e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado (YUAN et al., 2012). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies para marcação de 1 μ g do DNA bacteriano com digoxigenina, por *random prime digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA). As espécies avaliadas foram selecionadas de acordo com suas associações com a saúde e doença do componente periodontal (CHEN et al., 2018).

4.6.3. Checkboard DNA-DNA Hybridização

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho Maria por 10 minutos e neutralizadas pela adição de 0,8ml de acetato de amônia a 5M. Cada suspensão de biofilme contendo DNA livre foi depositada em uma das canaletas de Minislot 30 (Immunectis, Cambridge, MA, EUA- figura 6) e transferida para a membrana de nylon (15x15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do Minislot foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microorganismos investigados pelas sondas, nas concentrações de 10^5 a 10^6 células, ou seja, 1 η g e 101 η g de DNA de cada espécie (CAVALLA et al., 2018). A membrana foi removida do Minislot 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento a 120°C por 20 min.

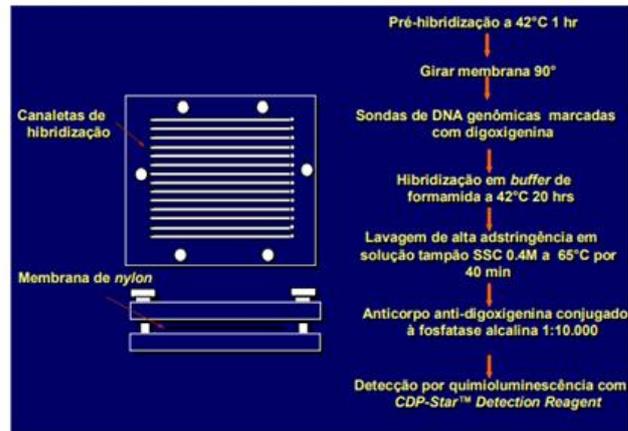
Figura 6 – Representação esquemática do Minislot 30: Resumo das etapas de hybridização e detecção das espécies bacterianas contidas nas amostras de biofilme (técnica de *Checkboard DNA-DNA hybridização*).



Fonte: Laboratório de Microbiologia, UNG, 2019.

A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em solução com 5% de formamida (Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil), 1% de caseína (Vetec), 5x solução salina citratada (SSC) (1x SSC=150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T. Baker, Edo. De Méx., México), pH 7,0), 25mM de fosfato de sódio (Na₂HPO₄, Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Depois, a membrana foi posicionada no *Minibloter 45* (Immunelectis, Cambridge, MA, EUA Fig 7) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Minibloter 45* foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 ng/mL, em 130µl de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5x SSC, 20mM de Na₂HPO₄ (pH 6,5), 0,2mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de 20 horas, a 42°C.

Figura 7 - Representação esquemática do Miniblotter 45: Resumo da preparação da colocação das amostras de biofilme subgingival na membrana de nylon (técnica de *Checkboard DNA-DNA hybridização*).



Fonte: Laboratório de Microbiologia, UNG, 2019.

4.6.4. Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45, lavada por 40min a 65°C em solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na_2HPO_4 para remover sondas que não hibridizaram completamente. A membrana foi imersa em solução de 1% de ácido maleico por 1 hora ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Twenn 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0 e depois por 30 minutos, na mesma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi lavada 2x por 20 min em solução de 0,1M de ácido maléico, 3M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0 e 1 vez por 5 min, em solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl, pH 9,5. Para detecção dos sinais, a membrana foi incubada por 45 min a 37°C em solução detectora contendo substrato de fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection Reagent (Amersham). Depois, a membrana foi colocada em um cassete Chassi Radiográfico 30x40 cm (Konex, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18x24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por 40min e depois revelado manualmente pelo método convencional temperatura-tempo (Figuras complementares 2). As soluções utilizadas fora da Kodac (Kodac Brasileira Com. E Ind.Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas a 20°C. A leitura foi realizada em 2 vezes e dias diferentes para conferir

os resultados. Cada sinal produzido por uma sonda na amostra de biofilme foi comparado ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controle de 10^5 a 10^6 bactérias. O número 0 não houve detecção, 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a 10^5 células, 3 entre 10^5 a 10^6 células, 4 equivaleu a 10^6 células e 5 mais de 10^6 células (tabela 3). Estes dados determinaram os níveis das 40 espécies nas amostras avaliadas. Todas as concentrações das soluções citadas são as finais usadas nas corridas de laboratório.

Tabela 3 - Índice utilizado para contagem dos microorganismos nas amostras de biofilme

ÍNDICE	NÍVEL DO MICROORGANISMO	CONTAGEM
0	Não detectado	0
1	Menos de 10^5 células	10.000
2	Aproximadamente 10^5 células	100.000
3	Entre 10^5 e 10^6 células	500.000
4	Aproximadamente 10^6 células	1.000.000
5	Mais de 10^6 células	10.000.000

Fonte: UNG, Laboratório de Microbiologia, 2019.

4.7. Análise estatística

A caracterização foi apresentada na forma de frequência observada, porcentagem, mediana, média e desvio padrão. O perfil sociodemográfico das participantes foi analisado pelo teste do qui-quadrado de Pearson entre os grupos. O teste de Wilcoxon comparou a quantidade de microbiota $>10^5$ e o teste qui-quadrado de aderência comparou as proporções dessa microbiota. A correlação de Spearman associou o nível de inserção clínico ($\text{NIC} \geq 4\text{mm}$), a idade e a perda dentária com a microbiota entre grupos e fases; com valores de referência evidenciados por Jacques Callegari (2003) a seguir: 0 até 0,3 fraca, $>0,3$ à 0,6 moderada, $>0,6$ à 0,9 forte, $>0,9$ à <1 muito forte e 1 perfeita. O teste de Wilcoxon comparou as concentrações de citocinas entre as fases e o teste de Mann-Whitney para as concentrações de citocinas (IL8, $\text{TNF}\alpha$, IL6 e IL-1 β) entre os grupos. O teste binomial para duas proporções comparou os parâmetros clínicos periodontais (PCP) entre os grupos. O teste qui quadrado comparou as proporções dos PCP entre os subtipos moleculares. A regressão de Poisson simples associou o $\text{NIC} \geq 4\text{mm}$ e a perda dentária com o grau histológico. O nível de

significância utilizado foi de 5%. As análises foram realizadas no *software* o IBM SPSS *Statistics version 24* e o STATA versão 14.0.

5. RESULTADOS

5.1. Análise do perfil sóciodemográfico

Foram tomados os dados sociodemográficos durante a avaliação clínica, médica e odontológica das pacientes dos grupos, mostrados na tabela 4. Na nossa casuística, notou-se que o CAM foi predominante nas mulheres a partir dos 40 anos ($p<0,001$) e com predominância de domicílio na região metropolitana ($p=0,002$).

O tabagismo, o etilismo e a visita ao dentista foram maiores em relação ao grupo com câncer ($p<0,001$) em relação ao grupo sem câncer.

Quanto ao tratamento periodontal, grande parte delas respondeu que desconhecia, porém no grupo com câncer a maioria respondeu que fizeram ou conhecia ($p=0,005$).

Tabela 4 – Dados do Perfil Sóciodemográfico nos Grupos

Faixa etária (caso)	Faixa etária (controle)				
	%		%		
	40 a 50 anos		51 a 69 anos		
40 a 50 anos	20	100,0	9	30,0	< 0,001
51 a 69 anos	0	0,0	21	70,0	
Localização (caso)	Localização (controle)				
	Região metropolitana		Interior do ES		
	Região metropolitana	34	100,0	11	
Interior do ES	0	0,0	5	31,2	
Tabagismo (caso)	Tabagismo (controle)				
	Não		Sim		
	Não	35	83,3	0	
Sim	7	16,7	8	100,0	
Etilismo (caso)	Etilismo (controle)				
	Não		Sim		
	Não	31	93,9	0	
Sim	2	6,1	17	100,0	
Visita ao dentista (caso)	Visita ao dentista (controle)				
	Não		Sim		

Visita ao dentista (caso)		Visita ao dentista (controle)				(continuação)
			%	%		
	Não	12	100,0	2	5,3	< 0,001
	Sim	0	0,0	36	94,7	
Tratamento de gengiva (caso)		Tratamento de gengiva (controle)				
		Não		Sim		
	Não	12	100,0	22	57,9	0,005
	Sim	0	0,0	16	42,1	

Nota: Teste do qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher; significativo se $p < 0,050$.

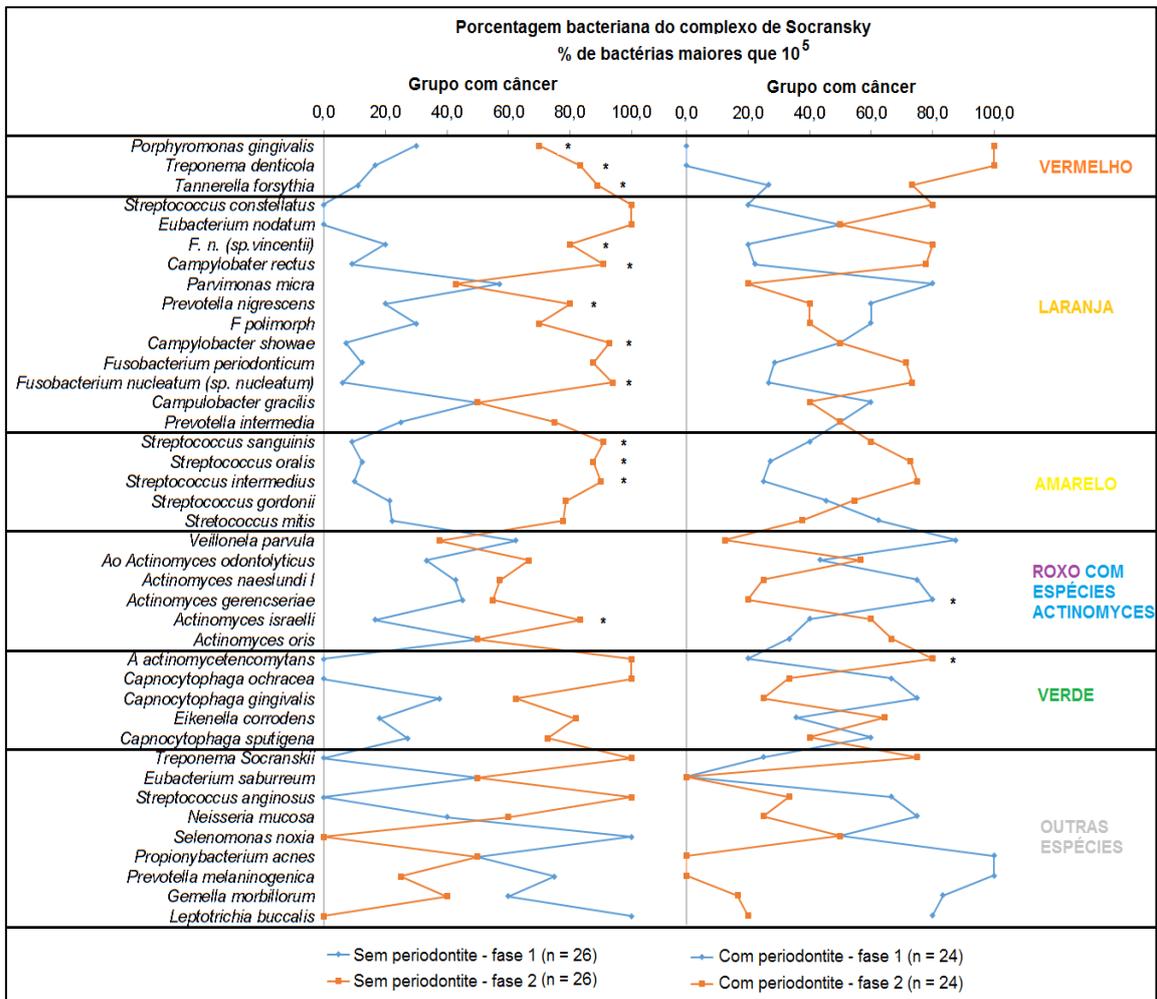
Fonte: Ambulatório de Ginecologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) e Ambulatório 2 do IOUFES (UFES). Grupo1: com câncer/grupo2: sem câncer; n=100.

5.2. Achados Microbiológicos

5.2.1 Contagem bacteriana pelo método checkboard DNA-DNA hybridização

Analisando a Figura 8 dos gráficos, as contagens bacterianas acima de 10^5 foram para os grupos 1A e 1B. Percebe-se que a fase 2, o grupo 1B alcançou proporções maiores em relação a fase 1 em quase todas avaliações com exceção das espécies *Parvimonas micra* (complexo laranja), *Actinomyces naeslundii I* e *Actinomyces israeli* (complexo roxo), *Actinomyces oris*, *Eubacterium saburreum*, *Propionibacterium acnes* e a *Gemella morbillorum* (complexo azul). As espécies *Prevotella melaninogenica* e a *Leptotrichia buccalis* (complexo azul) foram menores na fase 2 em relação a fase 1.

Figura 8 – Resultado da Contagem Bacteriana no Grupo 1 nas Fases

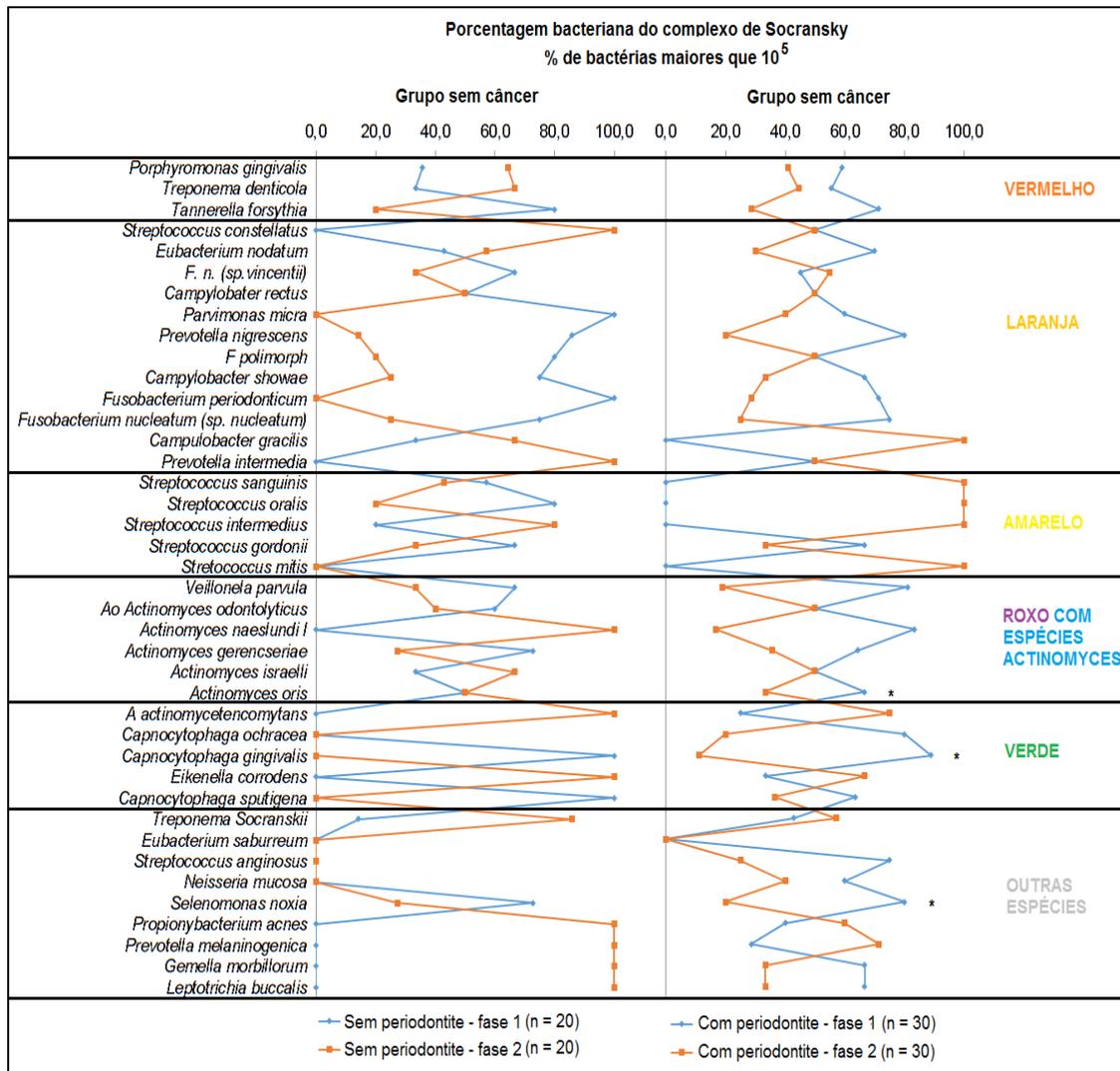


Nota: Teste de Wilcoxon para comparação da contagem bacteriana. n=100; Com ou sem periodontite. (DP)
Referência: $>10^5$

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

A fase 2, o grupo 1A obteve proporções de bactérias mais elevadas em quase todas comparações, com exceção das bactérias *Parvimonas micra* (complexo laranja), *Actinomyces naeslundii I* e *Actinomyces israelii* (complexo roxo) e a *Capnocytophaga gingivalis* (complexo verde) obtiveram proporções semelhantes entre as fases, porém, as bactérias *Selenomonas noxia*, *Prevotella melaninogenica*, *Gemella morbillorum* e a *Leptotrichia buccalis* (complexo azul) alcançaram proporções menores na fase 2 em relação à fase 1.

Figura 9 – Resultado da Contagem Bacteriana no Grupo 2 nas Fases



Nota: Teste de Wilcoxon para comparação da contagem bacteriana. n=100/ Com ou sem periodontite (DP).

Referência: $>10^5$.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

Analisando a figura 9 para os grupos 2A e 2B, os complexos alcançaram proporções mais elevadas ($>10^5$) em quase todas as avaliações, com exceção das espécies bacteriana *Tannerella forsythia* (complexo vermelho), *Fn (sp. vincentii)*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium periodonticum*, *Fusobacterium nucleatum* (complexo laranja), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis* (complexo amarelo), *Actinomyces naeslundii I*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces israelii* (complexos roxo e azul), *Capnocytophaga ochracea* and *Capnocytophaga gingivalis*

(complexo verde), *Capnocytophaga sputigena*, *Eubacterium saburreum*, *Streptococcus anginosus*, *Neisseria mucosa* and *Selenomonas Noxia* (complexo azul) no grupo 2B. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* (complexo vermelho), *Streptococcus Constellatus*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *F polimorphum*, *Fusubacterium periodonticum*, *Fusubacterium nucleatum* e *Prevotella Intermedia* (complexo laranja), *Streptococcus gordonii* (complexo amarelo), *Actinomyces naeslundii I*, *Veillonella Parvula*, *Actinomyces Gerencseriae*, *Actinomyces israeli* (complexo roxo e azul), *Actnomyces Odontolyticus*, *Capnocytophaga ochracea* e *Capnocytophaga gingivalis* (complexo verde), *Actinomyces oris*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eubacterium saburreum*, *Streptococcus anginosus*, *Neisseria mucosa*, *Gemella morbillorum* and *Leptotrichia buccalis* (complexo azul) no grupo 2A atingiram proporções menores na Fase 2 em comparação à Fase 1.

Tabela 5 – Resultado da Contagem Bacteriana no Grupo 2 nas Fases

	Sem periodontite				Valor p^*	Com periodontite				Valor p^*
	Controle Fase 1		Controle Fase 2			Controle Fase 1		Controle Fase 2		
	n	%	n	%		n	%	n	%	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5	35,7	9	64,3	0,424	13	59,1	9	40,9	0,523
<i>Treponema denticola</i>	1	33,3	2	66,7	0,999	5	55,6	4	44,4	0,999
<i>Tannerella forsythia</i>	4	80,0	1	20,0	0,375	5	71,4	2	28,6	0,453
<i>Streptococcus constellatus</i>	0	0,0	1	100,0	-	1	50,0	1	50,0	0,999
<i>Eubacterium nodatum</i>	3	42,9	4	57,1	0,999	7	70,0	3	30,0	0,344
<i>F. n. (sp.vincentii)</i>	8	66,7	4	33,3	0,388	9	45,0	11	55,0	0,824
<i>Campylobater rectus</i>	3	50,0	3	50,0	0,999	1	50,0	1	50,0	0,999
<i>Parvimonas micra</i>	3	100,0	0	0,0	-	3	60,0	2	40,0	0,999
<i>Prevotella nigrescens</i>	6	85,7	1	14,3	0,125	4	80,0	1	20,0	0,375
<i>F. polimorph</i>	4	80,0	1	20,0	0,375	4	50,0	4	50,0	0,999
<i>Campylobacter showae</i>	3	75,0	1	25,0	0,625	2	66,7	1	33,3	0,999
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	3	100,0	0	0,0	-	5	71,4	2	28,6	0,453
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)</i>	6	75,0	2	25,0	0,289	9	75,0	3	25,0	0,146
<i>Campulobacter gracilis</i>	1	33,3	2	66,7	0,999	0	0,0	2	100,0	-
<i>Prevotella intermedia</i>	0	0,0	1	100,0	-	2	50,0	2	50,0	0,999
<i>Streptococcus sanguinis</i>	4	57,1	3	42,9	0,999	0	0,0	3	100,0	-
<i>Streptococcus oralis</i>	4	80,0	1	20,0	0,375	0	0,0	1	100,0	-
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	20,0	4	80,0	0,375	0	0,0	5	100,0	-
<i>Streptococcus gordonii</i>	6	66,7	3	33,3	0,508	2	66,7	1	33,3	0,999
<i>Streptococcus mitis</i>	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	3	100,0	-
<i>Actinomyces oris</i>	6	66,7	3	33,3	0,508	17	81,0	4	19,0	0,007
<i>Actinomyces naeslundii</i>	6	60,0	4	40,0	0,754	12	50,0	12	50,0	0,999
<i>Veillonella parvula</i>	0	0,0	1	100,0	-	5	83,3	1	16,7	0,219
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	8	72,7	3	27,3	0,227	18	64,3	10	35,7	0,185
<i>Actinomyces israelii</i>	1	33,3	2	66,7	0,999	8	50,0	8	50,0	0,999
<i>Ao Actinomyces odontolyticus</i>	4	50,0	4	50,0	0,999	6	66,7	3	33,3	0,508
<i>A actinomycetencomytans</i>	0	0,0	2	100,0	-	1	25,0	3	75,0	0,625
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0	0,0	0	0,0	-	4	80,0	1	20,0	0,375
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	1	100,0	0	0,0	-	8	88,9	1	11,1	0,039
<i>Eikenella corrodens</i>	0	0,0	2	100,0	-	2	33,3	4	66,7	0,688
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	2	100,0	0	0,0	-	7	63,6	4	36,4	0,549
<i>Treponema Socranskii</i>	1	14,3	6	85,7	0,125	6	42,9	8	57,1	0,791
<i>Eubacterium saburreum</i>	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	-
<i>Streptococcus anginosus</i>	0	0,0	0	0,0	-	3	75,0	1	25,0	0,625
<i>Neisseria mucosa</i>	0	0,0	0	0,0	-	3	60,0	2	40,0	0,999
<i>Selenomonas noxia</i>	8	72,7	3	27,3	0,227	20	80,0	5	20,0	0,004

Nota: Teste do qui-quadrado de aderência; (-) estatística não computada porque não houve casos; significativo se $p \leq 0,050$.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

Analisando a tabela 5, as espécies *Actinomyces oris* ($p=0,007$), *Capnocytophaga gingivalis* ($p=0,039$) e *Selenomonas noxia* ($p=0,004$) foram significantes no grupo 2A em relação ao grupo 2B. A abordagem em duas fases mostra a presença de patógenos dos complexos verdes, de *Actinomyces* e outras espécies comuns na microbiota após a terapia periodontal básica,

mostrando que o tratamento foi responsivo pela avaliação clínica do periodonto das pacientes apresentando-se clinicamente saudável.

Tabela 6 – Resultado da Contagem Bacteriana no Grupo 1 nas Fases

	Sem periodontite				Valor p*	Com periodontite				Valor p*
	Caso Fase 1		Caso Fase 2			Caso Fase 1		Caso Fase 2		
	n	%	n	%		n	%	n	%	
<u>Porphyromonas gingivalis</u>	9	30,0	21	70,0	0,043	0	0,0	16	100,0	-
<u>Treponema denticola</u>	2	16,7	10	83,3	0,039	0	0,0	5	100,0	-
<u>Tannerella forsythia</u>	1	11,1	8	88,9	0,039	4	26,7	11	73,3	0,118
Streptococcus constellatus	0	0,0	11	100,0	-	1	20,0	4	80,0	0,375
Eubacterium nodatum	0	0,0	9	100,0	-	3	50,0	3	50,0	0,999
F. n. (sp.vincentii)	3	20,0	12	80,0	0,035	2	20,0	8	80,0	0,109
Campylobater rectus	1	9,1	10	90,9	0,012	2	22,2	7	77,8	0,180
Parvimonas micra	4	57,1	3	42,9	0,999	4	80,0	1	20,0	0,375
Prevotella nigrescens	3	20,0	12	80,0	0,035	6	60,0	4	40,0	0,754
F polimorph	3	30,0	7	70,0	0,344	6	60,0	4	40,0	0,754
Campylobacter showae	1	7,1	13	92,9	0,002	4	50,0	4	50,0	0,999
Fusobacterium periodonticum	1	12,5	7	87,5	0,070	2	28,6	5	71,4	0,453
Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)	1	6,3	15	93,8	0,001	4	26,7	11	73,3	0,118
Campulobacter gracilis	3	50,0	3	50,0	0,999	3	60,0	2	40,0	0,999
Prevotella intermedia	2	25,0	6	75,0	0,289	4	50,0	4	50,0	0,999
Streptococcus sanguinis	1	9,1	10	90,9	0,012	4	40,0	6	60,0	0,754
Streptococcus oralis	2	12,5	14	87,5	0,004	3	27,3	8	72,7	0,227
Streptococcus intermedius	1	10,0	9	90,0	0,021	3	25,0	9	75,0	0,146
Streptococcus gordonii	3	21,4	11	78,6	0,057	5	45,5	6	54,5	0,999
Streptococcus mitis	2	22,2	7	77,8	0,180	5	62,5	3	37,5	0,727
Actinomyces oris	10	62,5	6	37,5	0,454	7	87,5	1	12,5	0,070
Actinomyces naeslundii I	6	33,3	12	66,7	0,238	10	43,5	13	56,5	0,678
Veillonella parvula	3	42,9	4	57,1	0,999	3	75,0	1	25,0	0,625
Actinomyces gerencseriae	9	45,0	11	55,0	0,824	12	80,0	3	20,0	0,035
Actinomyces israelii	3	16,7	15	83,3	0,008	8	40,0	12	60,0	0,503
Ao Actinomyces odontolyticus	5	50,0	5	50,0	0,999	1	33,3	2	66,7	0,999
A actinomycetencomytans	0	0,0	14	100,0	-	3	20,0	12	80,0	0,035
Capnocytophaga ochracea	0	0,0	3	100,0	-	2	66,7	1	33,3	0,999
Capnocytophaga gingivalis	3	37,5	5	62,5	0,727	6	75,0	2	25,0	0,289
Eikenella corrodens	2	18,2	9	81,8	0,065	5	35,7	9	64,3	0,424
Capnocytophaga sputigena	3	27,3	8	72,7	0,227	3	60,0	2	40,0	0,999
Treponema Socranskii	0	0,0	6	100,0	-	2	25,0	6	75,0	0,289
Eubacterium saburreum	1	50,0	1	50,0	0,999	0	0,0	0	0,0	-
Streptococcus anginosus	0	0,0	3	100,0	-	2	66,7	1	33,3	0,999
Neisseria mucosa	2	40,0	3	60,0	0,999	3	75,0	1	25,0	0,625
Selenomonas noxia	1	100,0	0	0,0	-	3	50,0	3	50,0	0,999

Nota: Teste do qui-quadrado de aderência; (-) estatística não computada porque não houve casos; significativo se $p \leq 0,050$.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

A tabela 6 , apresentou significância das espécies *P. Gingivalis* ($p=0,043$), *T. denticola* ($p=0,039$), *T. Forsythia* ($p=0,039$), *F.n -sp vincentii* ($p=0,035$), *C. rectus* ($p=0,012$), *P. nigrescens* ($p=0,035$), *C. Showae* ($p=0,002$), *F. nucleatum* ($p=0,001$), *S. Sanguinis* ($p=0,012$), *S. Oralis* ($p=0,004$), *S. Intermedius* ($p=0,021$) e *A. Israelli* ($p=0,008$) no grupo 1B. No grupo 1A, houve significância para as espécies *A. gerencseriae* ($p= 0,035$) e *A. Actinomycetencomytans* ($p= 0,035$). Esses achados indicam que mesmo após a terapia periodontal básica, houve a presença dos patógenos dos complexos vermelho, laranja e amarelo no grupo 1B, que são caracterizados na literatura por contribuírem para evolução da periodontite.

5.2.2 Correlação da microbiota subgengival com o nível de inserção clínico (NIC), idade e perda dentária

Na fase 1, avaliando o grupo 2B, houve associação significativa do $NIC \geq 4mm$ com a espécie *Streptococcus anginosus* que foi considerada moderada positiva ($r=0,507$). A idade apresentou correlação significativa com as espécies bacterianas *Treponema denticola* ($r=0,514$), *F. n. sp.vincentii* ($r=0,480$), *Campylobater rectus* ($r=0,497$), *Eikenella corrodens* ($r=0,471$), *Treponema socranskii* ($r=0,466$) e *Propionybacterium acnes* ($r=0,521$) no grupo 2B. A idade se associou com *Selenomonas noxia* ($r=0,498$) no grupo 2A. Quando se avaliou o grupo 1B, houve associação significativa do $NIC (\geq 4mm)$ com as espécies *Capnocytophaga ochracea* ($r=0,514$) foi considerada forte positiva, *Eikenella corrodens* ($r=0,516$) e *Leptotrichia buccalis* ($r=0,481$) foram consideradas moderadas positivas. A idade apresentou correlação significativa com *Streptococcus anginosus* ($r=0,516$) e *Propionybacterium acnes* ($r=0,481$) que foram consideradas moderadas positivas no grupo 1B. A perda dentária apresentou associação com as bactérias *Actinomyces gerencseriae* ($r=0,564$), *Actinomyces odontolyticus* ($r=0,550$), *Capnocytophaga gingivalis* ($r=0,549$) e a *Neisseria mucosa* ($r=0,515$), onde estas foram moderadas positiva e forte positiva para as bactérias *Treponema socranskii* ($r=0,664$), *Streptococcus anginosus* ($r=0,668$) e *Prevotella melaninogenica* ($r=0,731$) no grupo 1B. Para o grupo 1A observou que houve associação significativa entre o

NIC com *A. actinomycetencomytans* ($r=0,468$), *Eikenella corrodens* ($r=0,437$) e *Streptococcus anginosus* ($r=0,411$) e estas foram consideradas moderada positiva. A idade se associou com *Fusobacterium periodonticum* ($r=0,539$), onde esta foi considerada moderada positiva no grupo 1B. A perda dentária foi significativa com *Veillonella parvula* ($r=0,441$), *Eubacterium saburreum* ($r=0,496$) e *Prevotella melaninogenica* ($r=0,526$) e foram consideradas moderadas positivas no grupo 1A (Tabela 7).

Tabela 7 – Correlação do NIC, Idade e a perda dentária com a Microbiota na Fase 1

Fase 1	Grupo 2 n=50						Grupo 1 n=50					
	2B			2A			1B			1A		
Complexo de Socransky	NIC ≥ 4mm	Idade	Perda dentária	NIC ≥ 4mm	Idade	Perda dentária	NIC ≥ 4mm	Idade	Perda dentária	NIC ≥ 4mm	Idade	Perda dentária
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-0,047	-0,189	-0,18	0,071	-0,124	0,008	-0,114	0,14	-0,181	-0,075	0,053	0,21
<i>Treponema denticola</i>	-0,082	0,514*	-0,348	0,055	0,08	0,196	0,055	0,105	-0,154	0,15	-0,048	0,356
<i>Tannerella forsythia</i>	0,125	-0,387	-0,209	0,26	0,049	-0,035	-0,255	0,085	-0,271	-0,136	0,347	0,335
<i>Streptococcus constellatus</i>	0,021	-0,392	-0,091	-0,109	0,099	-0,199	-0,238	0,149	-0,349	0,056	0,158	0,214
<i>Eubacterium nodatum</i>	-0,062	-0,277	-0,128	-0,062	0,112	0,092	-0,113	-0,227	-0,213	-0,168	-0,12	0,29
<i>F. n. (sp.vincentii)</i>	-0,065	0,480*	-0,336	0,156	-0,006	-0,185	-0,011	0,386	-0,294	-0,038	0,138	0,303
<i>Campylobacter rectus</i>	-0,09	0,497*	-0,289	0,096	-0,009	-0,19	0,186	0,256	-0,261	-0,107	0,188	0,18
<i>Parvimonas micra</i>	0,055	-0,402	-0,351	0,165	0,118	-0,162	-0,187	0,243	-0,299	-0,074	-0,152	-0,141
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,153	-0,381	-0,583	0,109	0,15	-0,324	-0,302	-0,317	-0,502	-0,244	-0,253	0,305
<i>F. polymorph</i>	0,07	-0,101	0,176	0,271	0,139	-0,27	-0,114	0,227	-0,287	-0,324	0,119	0,15
<i>Campylobacter showae</i>	0,222	-0,406	0,126	0,156	0,173	-0,089	-0,079	0,113	-0,199	0,055	0,077	0,09
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	0,214	-0,222	-0,398	0,096	0,126	-0,187	-0,068	0,288	-0,482	-0,075	0,539**	0,208
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)</i>	0,141	0,056	0,05	0,113	0,056	-0,262	0,247	0,209	0,031	-0,043	-0,015	0,156
<i>Campylobacter gracilis</i>	0,02	-0,27	0,057	0,111	0,223	-0,152	-0,209	-0,026	0,062	-0,103	-0,142	0,098
<i>Prevotella intermedia</i>	0,15	-0,346	-0,029	0,023	0,023	-0,069	-0,452	0,052	-0,271	-0,142	-0,007	0,251
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,14	-0,233	-0,118	0,228	0,09	-0,212	-0,441	-0,164	-0,419	-0,335	-0,224	0,063
<i>Streptococcus oralis</i>	0,265	-0,149	0,081	0,182	0,118	-0,195	-0,222	0,126	-0,207	-0,096	0,045	0,231
<i>Streptococcus intermedius</i>	0,216	-0,199	-0,125	0,054	0,22	-0,302	-0,342	-0,122	-0,201	-0,335	-0,122	0,338
<i>Streptococcus gordonii</i>	0,051	-0,304	0,045	-0,038	0,066	0,011	-0,397*	-0,012	-0,131	-0,1	0,024	0,14
<i>Streptococcus mitis</i>	0,207	-0,323	-0,087	0,139	0,094	-0,28	-0,262	0,376	0,224	-0,207	0,021	0,192
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	-0,016	0,035	0,149	0,044	-0,05	-0,341	0,327	-0,02	-0,255	0,244	-0,232	0,266
<i>Veillonella parvula</i>	0,19	0,092	0,169	0,175	0,081	-0,115	0,128	-0,021	0,513	0,235	0,008	0,441*
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	0,06	-0,167	0,031	0,007	-0,013	-0,071	0,128	-0,186	0,564*	0,277	-0,2	0,336
<i>Actinomyces israelii</i>	0,325	-0,078	0,041	0,099	0,173	0,195	0,342	-0,15	-0,109	0,353	-0,302	0,31
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0,169	-0,244	-0,039	0,077	0,042	-0,235	-0,041	0,207	0,550*	0,361	-0,003	0,378
<i>Actinomyces actinomycetencomytans</i>	0,121	-0,105	-0,147	0,14	0,21	-0,051	0,054	0,17	0,462	-0,468*	-0,211	0,114
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	-0,087	-0,199	0,003	0,257	0,077	-0,287	0,653**	0,192	-0,037	0,054	-0,239	0,163
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0,187	-0,237	-0,337	0,1	-0,005	0,064	0,127	0,268	0,549*	0,335	-0,153	0,421
<i>Eikenella corrodens</i>	-0,025	0,471*	-0,237	0,116	0,117	-0,241	0,516**	0,322	0,293	0,437*	-0,151	0,321
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0,275	0,266	0,417	-0,117	0,022	-0,022	0,241	-0,123	-0,156	0,272	-0,035	-0,139
<i>Treponema Socranskii</i>	-0,483	0,466*	-0,062	0,118	-0,362	-0,041	-0,116	0,061	0,664**	0,259	-0,209	0,108
<i>Eubacterium saburreum</i>	-0,039	-0,422	-0,147	0,092	0,144	-0,013	0,337	0,25	0,235	0,218	-0,195	0,496*
<i>Streptococcus anginosus</i>	0,507*	-0,089	-0,05	0,125	-0,105	-0,11	0,088	0,463*	0,668**	0,411*	-0,074	0,083
<i>Neisseria mucosa</i>	0,191	-0,152	0,096	0,136	-0,004	-0,226	0,151	0,295	0,515*	0,315	-0,201	0,316
<i>Selenomonas noxia</i>	0,173	0,048	0,225	0,143	0,498**	0,3	0,26	-0,008	0,161	0,109	-0,21	0,325
<i>Propionibacterium acnes</i>	-0,286	0,521*	-0,011	0,13	-0,399	-0,032	0,327	0,498**	0,382	0,296	-0,303	0,18
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0,455	-0,151	-0,038	0,132	0,043	-0,319	0,002	0,256	0,731**	0,166	0,023	0,526*
<i>Gemella morbillorum</i>	0,404	-0,171	0,051	-0,03	0,068	-0,248	0,191	0,034	0,019	0,143	-0,206	0,214
<i>Leptotrichia buccalis</i>	0,228	-0,277	-0,116	0,051	0,062	-0,239	0,481*	0,298	0,012	0,345	-0,314	0,105
<i>Actinomyces oris</i>	-0,084	-0,131	-0,22	0,091	-0,159	0,003	0,075	0,031	-0,143	0,067	-0,13	-0,11

Doença periodontal= DP. Correlação de Spearman; *p <0,050; ** p <0,001 valor p ≤5% 0 at 0,3: fraca >0,3 at 0,6:moderada >0,6 at 0,9: forte
>0,9 at <1: muito forte 1: perfeita.
Grupo1: com câncer Grupo 2: sem câncer A: com DP B: sem DP

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

Na fase 2, a idade apresentou correlação significativa com *Treponema denticola* ($r=0,451$) e *Actinomyces oris* ($r=0,484$) *Eubacterium nodatum* ($r=0,497$), *Streptococcus intermedius* ($r=0,451$), *Treponema socranskii* ($r=0,519$) e *Prevotella melaninogenica* ($r=0,533$) que foram consideradas moderadas positiva no grupo 2B e a perda dentária apresentou associação com *Porphyromonas gingivalis* ($r=0,537$), *Campylobacter showae* ($r=0,448$) e *Selenomonas noxia* ($r=0,521$), onde estas foram consideradas moderadas positivas. Para o grupo 2A observou que houve associação significativa entre o $NIC \geq 4mm$ com as espécies bacterianas, *F polymorph* ($r=0,382$), *Fusobacterium periodonticum* ($r=0,570$), que foram consideradas moderadas positivas. A idade se associou com *Capnocytophaga gingivalis* ($r=0,398$) e *Gemella morbillorum* ($r=0,369$). Houve associação significativa da perda dentária com *Streptococcus anginosus* ($r=0,402$) e esta foi moderada positiva no grupo 2A, conforme a tabela 8.

Tabela 8 – Correlação do NIC, Idade e a perda dentária com a Microbiota na Fase 2

Fase 2	Group 2 n=50						Grupo 1 n=50					
	2B			2A			1B			1A		
Complexo de Socransky	NIC \geq 4mm	Idade	Perda dentária	NIC \geq 4mm	Idade	Perda dentária	NIC \geq 4mm	Idade	Perda dentária	NIC \geq 4mm	Idade	Perda dentária
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,153	0,124	0,537*	0,069	0,223	0,029	0,111	0,208	-0,022	0,142	0,438*	0,307
<i>Treponema denticola</i>	-0,259	0,451*	0,002	0,018	0,127	-0,15	0,064	0,008	-0,019	-0,084	-0,196	-0,019
<i>Tannerella forsythia</i>	-0,283	-0,268	-0,417	0,013	0,01	-0,192	-0,014	-0,151	-0,032	-0,166	-0,103	-0,299
<i>Streptococcus constellatus</i>	-0,024	0,109	0,009	0,367	-0,16	0,027	-0,211	-0,283	0,243	0,234	0,251	-0,294
<i>Eubacterium nodatum</i>	-0,492*	0,497*	0,047	0,019	-0,148	0,242	-0,213	-0,26	-0,128	0,185	0,034	0,127
<i>F. n. (sp.vincentii)</i>	0,04	-0,131	0,094	0,234	-0,095	0,054	-0,43	-0,01	-0,186	0,192	-0,027	0,044
<i>Campylobacter rectus</i>	-0,011	0,208	-0,297	-0,171	-0,19	0,104	-0,021	0,019	0,246	-0,16	0,026	0,134
<i>Parvimonas micra</i>	0,036	0,18	-0,324	0,019	0,127	-0,237	-0,117	-0,082	-0,008	0,092	0,093	0,137
<i>Prevotella nigrescens</i>	-0,328	0,044	-0,036	0,116	-0,032	0,11	-0,113	-0,233	0,298	0,267	0,214	-0,232
<i>F polymorph</i>	0,292	-0,064	0,342	0,382*	-0,098	-0,113	-0,077	-0,248	0,277	0,004	0,286	-0,1
<i>Campylobacter showae</i>	-0,125	0,129	0,448*	-0,141	0,116	0,222	-0,092	-0,178	0,199	-0,15	0,11	-0,428
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	-0,38	-0,038	0,085	0,570**	-0,242	0,129	-0,304	0,133	0,375	0,227	0,277	0,162
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)</i>	-0,135	0,414	0,081	0,028	-0,014	0,297	0,07	-0,218	0,359	-0,284	-0,258	-0,207
<i>Campylobacter gracilis</i>	-0,21	0,018	0,386	0,229	0,073	-0,153	-0,371	0,056	0,176	0,001	-0,1	0,046
<i>Prevotella intermedia</i>	-0,194	0,314	0,162	-0,009	0,06	0,054	-0,282	0,091	0,114	0,068	-0,079	-0,152
<i>Streptococcus sanguinis</i>	-0,36	0,036	-0,003	0,03	-0,069	-0,084	-0,152	-0,429	0,128	0,232	0,071	-0,108
<i>Streptococcus oralis</i>	-0,162	-0,434	-0,309	0,148	-0,148	-0,171	-0,027	-0,434	0,035	0,039	0,339	-0,257
<i>Streptococcus intermedius</i>	0,102	0,451*	0,411	0,294	-0,248	-0,344	-0,094	-0,208	0,432*	0,283	0,299	-0,243
<i>Streptococcus gordonii</i>	-0,405	-0,196	0,038	0,234	0,047	0,011	-0,358	-0,168	0,072	0,018	0,115	-0,457
<i>Streptococcus mitis</i>	-0,214	0,333	0,219	-0,044	-0,078	-0,134	-0,227	-0,099	-0,15	0,455*	0,265	0,02
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	-0,169	0,01	0,041	-0,036	-0,237	0,219	0,191	0,528**	0,302	0,506*	0,433*	-0,078
<i>Veillonella parvula</i>	0,064	-0,127	-0,203	0,041	-0,118	0,129	-0,165	0,101	0,183	0,231	0,439*	-0,255
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	-0,123	0,396	0,02	0,171	-0,115	0,164	-0,102	-0,208	0,382	0,195	0,287	0,083
<i>Actinomyces israelii</i>	-0,223	0,202	-0,166	0,214	-0,009	0,205	-0,129	-0,182	0,419*	0,186	0,405*	-0,032
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	-0,161	0,052	0,089	-0,018	0,167	-0,163	0,043	-0,442	-0,171	0,186	0,252	0,189
<i>A actinomycetencomytans</i>	-0,054	0,041	-0,385	0,15	0,009	-0,004	-0,322	0,023	-0,156	-0,183	-0,157	-0,238
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0,018	0,049	-0,12	0,17	-0,056	0,234	-0,095	-0,143	0,510**	-0,064	0,073	0,166
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	-0,416	0,164	0,092	0,156	0,398*	0,133	-0,335	-0,083	0,276	-0,126	-0,041	-0,296
<i>Eikenella corrodens</i>	-0,339	-0,043	-0,112	-0,076	0,308	-0,054	-0,56	0,097	-0,228	0,042	-0,242	0,021
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	-0,092	-0,228	0,084	-0,254	0,202	-0,037	-0,231	0,029	0,232	0,168	0,277	0,268
<i>Treponema Socranskii</i>	0,069	0,519*	0,096	-0,378	0,126	0,165	-0,063	-0,052	0,037	0,283	0,287	-0,137
<i>Eubacterium saburreum</i>	-0,205	0,147	0,128	0,244	-0,188	0,229	0,072	-0,278	0,189	0,259	0,081	-0,114
<i>Streptococcus anginosus</i>	-0,219	0,109	-0,011	0,263	-0,057	0,402*	0,02	-0,059	-0,176	0,159	0,035	-0,177
<i>Neisseria mucosa</i>	0,073	0,275	0,051	-0,108	-0,153	0,014	-0,17	-0,248	0,124	-0,071	-0,179	-0,284
<i>Selenomonas noxia</i>	0,364	0,095	0,521*	-0,422	0,076	0,186	0,058	-0,167	0,025	0,276	0,293	-0,001
<i>Propionibacterium acnes</i>	-0,117	0,242	-0,013	-0,253	0,234	-0,08	-0,049	-0,123	0,158	0,171	-0,047	-0,521
<i>Prevotella melaninogenica</i>	-0,187	0,533*	-0,081	0,149	-0,051	0,163	-0,146	-0,051	0,279	-0,011	-0,099	-0,363
<i>Gemella morbillorum</i>	0,046	0,133	0,204	0,103	0,369*	0,332	-0,266	0,089	0,243	0,258	0,128	0,135
<i>Leptotrichia buccalis</i>	-0,094	0,115	-0,111	0,186	-0,098	0,172	-0,132	-0,193	0,338	-0,063	0,077	-0,133
<i>Actinomyces oris</i>	-0,031	0,484*	0,385	0,018	0,045	0,283	-0,224	-0,054	0,126	0,003	0,138	-0,201

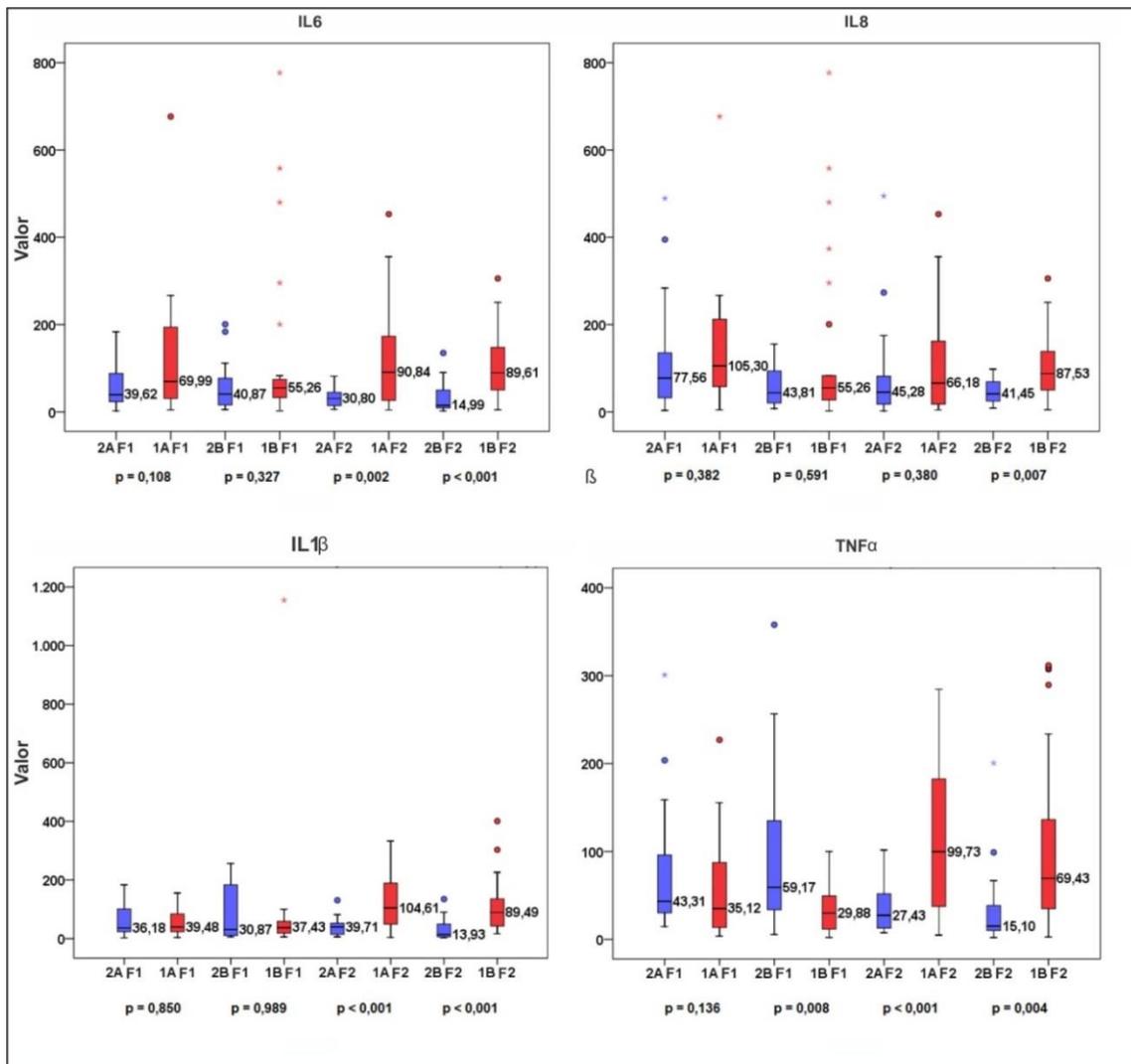
Doença periodontal= DP. Correlação de Spearman; * $p < 0,050$; ** $p < 0,001$ valor $p \leq 5\%$ 0 at 0.3: fraca >0.3 at 0.6:moderada >0.6 at 0.9: forte
>0.9 at <1: muito forte 1: perfeita.
Grupo 1: com câncer Grupo 2: sem câncer A: com DP B: sem DP

A idade apresentou correlação significativa com *Actinomyces naeslundii I* ($r= 0,528$) no grupo 1B que foram consideradas moderadas positivas. A perda dentária apresentou associação com *Streptococcus intermedius* ($r=0,432$), *Actinomyces israeli* ($r=0,419$) e *Capnocytophaga ochracea* ($r=0,510$), onde estas foram consideradas moderada positiva. Para o grupo 1A observou que houve associação significativa entre o NIC com *Streptococcus mitis* ($r=0,455$) e *Actinomyces naeslundii I* ($r=0,506$) e estas foram consideradas moderadas positivas. A idade se associou com *Porphyromonas gingivalis* ($r=0,438$), *Actinomyces naeslundii I* ($r=0,433$), *Veillonella parvula* ($r=0,439$) e *Actinomyces israeli* ($r=0,405$), onde estas foram consideradas moderadas positivas conforme a Tabela 6.

5.3. Avaliação da secreção das citocinas inflamatórias envolvidas na periodontite

Na fase 1, conforme a figura 10, quando comparou o perfil das citocinas entre os grupos e fases, foi encontrado aumento dos níveis da expressão de $TNF\alpha$ no grupo 1B comparado ao grupo 2B, ($p=0.008$), mas as expressões dos níveis de IL8, IL6 e $TNF\alpha$ nos grupos não foram significantes. Também na fase 2, os níveis de $TNF\alpha$ foram maiores nos grupos 1A ($p<0.001$) e 1B ($p=0.004$) e de IL-8 no grupo 1B em comparação ao grupo 2B ($p=0.007$). O mesmo ocorreu para os níveis de IL6 no grupo 1B em relação ao grupo 2B ($p<0.001$) e grupo 1A ($p=0.002$) comparado ao grupo 2A. Os níveis de IL1 β foram maiores no grupo 1B ($p<0.001$) em comparação ao grupo 2B e 1A ($p<0.001$) em relação ao grupo 2A. Vale ressaltar que na fase 2, as expressões de citocinas IL-8, IL-1 β , $TNF\alpha$ e IL-6 foram muito significantes no grupo sem periodontite (1B), mesmo após a adição da terapia periodontal, o mesmo ocorreu para o grupo com periodontite (1A) para citocinas IL-1 β , $TNF\alpha$ e IL6.

Figura 10 – Secreção de Citocinas nos Grupos e Fases



Nota: Teste Mann-Whitney; significativo se $p < 0,050$. Grupo 1: com câncer / Grupo 2: sem câncer / A: com periodontite / B: sem periodontite/ n=100 / F1: Fase 1; F2: Fase 2.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

5.4 Resultados dos parâmetros clínicos periodontais

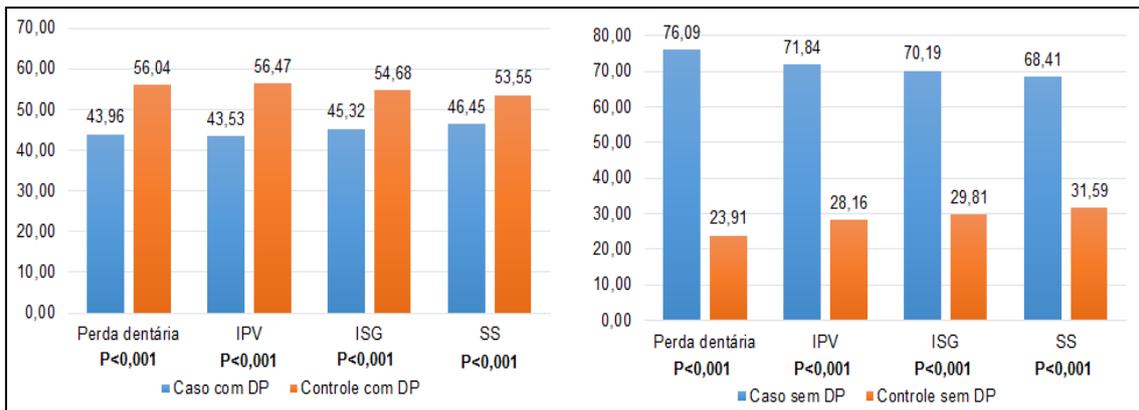
Pelos dados dos parâmetros clínicos periodontais (PCP) obtidos no atendimento clínico e inseridos no periodontograma, foram encontrados os resultados descritos nas figuras 11, 12, 13 e 14.

Na fase 1, foi observada alta taxa de perda dentária (76.09%), IPV (71.84%), ISG (70.19%) e

SS (68.41%) no grupo 1B em comparação ao grupo 2B ($p<0,001$) de acordo com a figura 11. Na figura 12, a PS>4mm (52,17%) foi similar entre os grupos ($p=0,253$), mas o NIC=4mm (59,65%) foi maior no grupo 2 em relação ao grupo 1 ($p<0,001$) com e sem periodontite. No grupo 1, a perda de inserção clínica ou NIC>4mm (60.4%) foi maior quando comparou com o grupo 2 ($p<0,001$) com e sem periodontite.

A PS=4mm (53,37%) foi maior no grupo 2 ($p=0,003$) em relação ao grupo 1. O NIC=4mm (59,65%) foi maior para o grupo 2 ($p<0,001$) em relação ao grupo 1 com e sem periodontite. O NIC>4mm (60,40%) foi maior no grupo 1 ($p<0,001$) em relação ao grupo 2, como demonstra figura 12.

Figura 11 – Caracterização de Perda dentária, IPV, ISG e SS na Fase 1

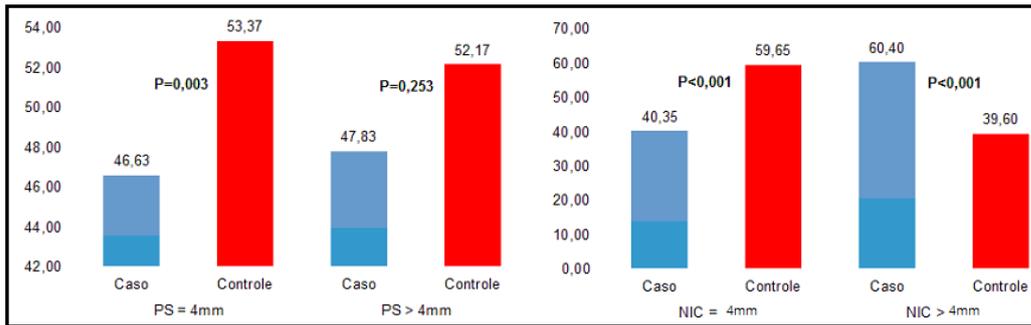


Nota: Grupos 1: com câncer/ grupo 2: sem câncer. A: com ou sem periodontite ou DP. B: sem periodontite ou DP. Perda dentária/ IPV: índice de placa visível/ISG: índice de sangramento gengival/SS: sangramento à sondagem/ n=100/ Teste binomial para duas proporções. Significativo se $p<0,05$.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

Esses dados preliminares podem estar associados aos hábitos de vida como má higiene, acesso aos serviços odontológicos e alimentação em ambos os grupos, pois na fase 1, o monitoramento clínico terapêutico periodontal não havia iniciado. Além desses fatores, em relação ao grupo 1 (com câncer), destaca a perda de inserção clínica que caracteriza o estágio avançado da periodontite.

Figura 12 – Caracterização da PS e NIC na Fase 1

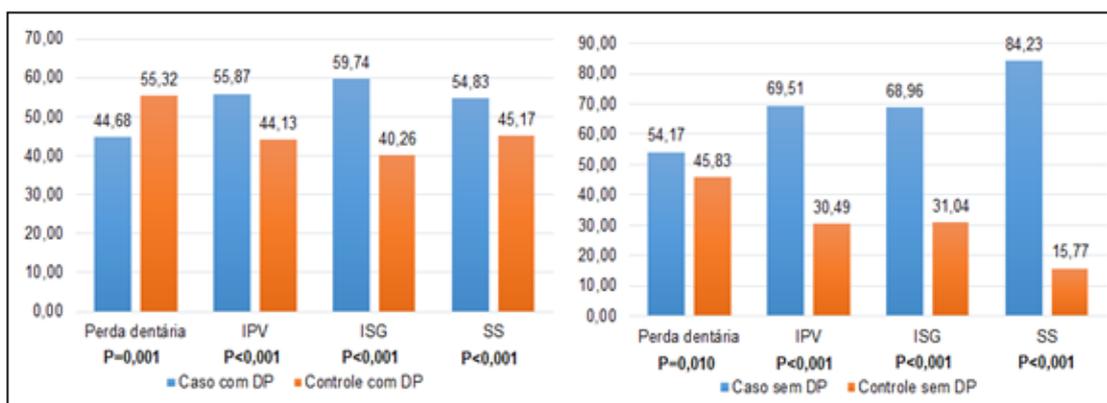


Nota: Grupos 1 e 2 (A e B); n=100. Grupo 1: caso / Grupo 2: controle. PS: profundidade de sondagem/ NIC: nível de inserção clínico/ Teste binomial para duas proporções. Significativo se $p<0,050$.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

As figuras 13 e 14 caracterizam os parâmetros clínicos da fase 2 entre os grupos. A perda dentária (55,32%) apresentou maior prevalência para o grupo 2A ($p=0,001$) em relação ao grupo 1A e no grupo 1B (54,17%) em relação ao grupo 2B ($p=0,010$). O IPV (55,87%), o ISG (59,74%) e o SS (54,83%) foram maiores em prevalência no grupo 1A ($p<0,001$) em relação ao grupo 2A. O IPV (69,51%), o ISG (68,96%) e o SS (84,23%) foram maiores em prevalência no grupo 1B ($p<0,001$) em relação ao grupo 2B.

Figura 13 – Caracterização de Perda dentária, IPV, ISG e SS na Fase 2

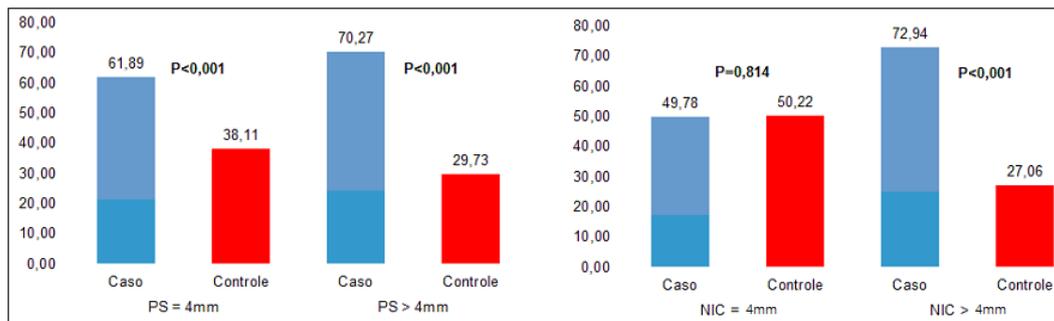


Nota: Grupos 1 e 2 (A e B); n=100. Grupo 1: caso / Grupo 2: controle. Com ou sem periodontite ou DP. Perda dentária/ IPV: índice de placa visível/ISG: índice de sangramento gengival/SS: sangramento à sondagem/ Teste binomial para duas proporções; Significativo se $p<0,050$.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

A PS $\geq 4\text{mm}$ (61,89%;70,27%) e o NIC $>4\text{mm}$ (72,94%) foram maiores nos grupos 1 ($p<0,001$) em relação ao grupo 2. Nota-se que o NIC=4mm é similar entre os grupos 1 e 2 naqueles expostos ou não à periodontite como mostra a figura 14.

Figura 14 - Caracterização da PS e NIC na Fase 2



Nota: Grupos 1 e 2 (A e B); n=100. Grupo 1: caso / Grupo 2: controle. PS= profundidade de sondagem/ NIC= nível de inserção clínico/ Teste binomial para duas proporções; Significativo se $p<0,050$.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

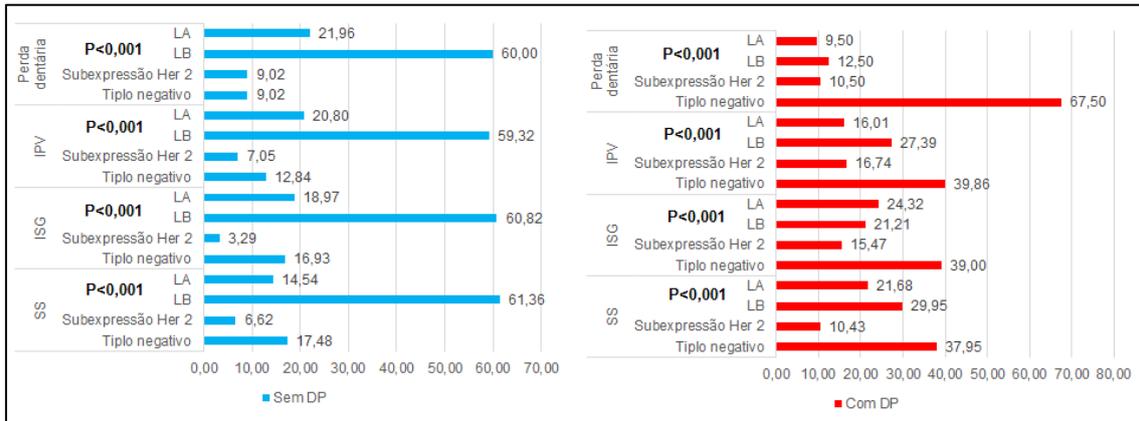
Os resultados dos índices periodontais, principalmente quanto a PS e perda de inserção, foi maior no grupo 1 em relação ao grupo 2 com e sem periodontite, mesmo após o acompanhamento terapêutico periodontal na fase 2. Interessantemente, mesmo na ausência de bolsas periodontais ($PS\geq 4\text{mm}$), observamos a presença do $NIC>4\text{mm}$ na fase 1 e 2 para o grupo 1. Este fato pode estar relacionado com a presença da periodontite anteriormente à pesquisa que talvez tenha sido tratada e com bolsas inativas (com scores menores que 4mm).

5.5. Relação entre os parâmetros clínicos periodontais e subtipos moleculares

Foi feito levantamento de cada subtipo molecular para o câncer de mama entre as pacientes nos registros clínicos na fase 1 e 2, segundo o diagnóstico imunohistoquímico. Desses, o subtipo Luminal B compreendeu 38,2% e triplo negativo 29,7%.

As figuras dos gráficos 15, 16 e 17 caracterizam os parâmetros clínicos da fase 1 entre os subtipos moleculares.

Figura 15 – Caracterização da Perda dentária, IPV, ISG e SS entre os subtipos na Fase 1

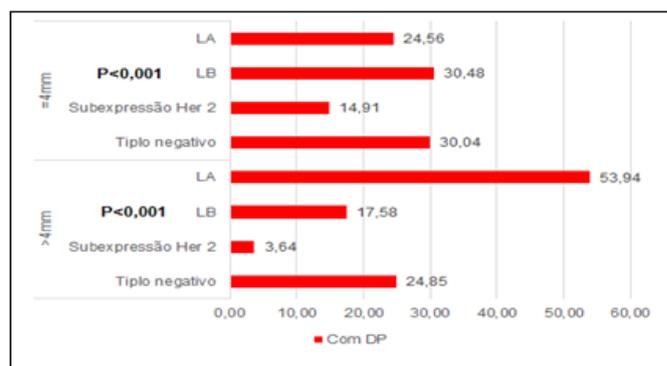


Nota: Grupo 1A (n=24); Grupo 1B(n=26). IPV: índice de placa visível / ISG: índice de sangramento gengival / SS: sangramento à sondagem. Teste-q quadrado para as proporções dos parâmetros clínicos entre os subtipos moleculares.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

Para as pacientes do grupo 1B, a perda dentária (60%), o IPV (59,32%), o ISG (60,82%), SS (61,36%) e NIC=4mm (30,92%) foram maiores em prevalência para o subtipo molecular luminal B ($p<0,001$) em relação aos outros subtipos. Quando se observa o grupo 1A, é possível perceber que para a perda dentária (67,50%), os índices IPV (39,86%), o ISG 39,00%), SS (37,95%) e o NIC>4mm (58,63%) foram maiores em prevalência para o subtipo molecular triplo negativo ($p<0,001$) em relação aos outros subtipos.

Figura 16 – Caracterização da PS entre os subtipos moleculares na Fase 1

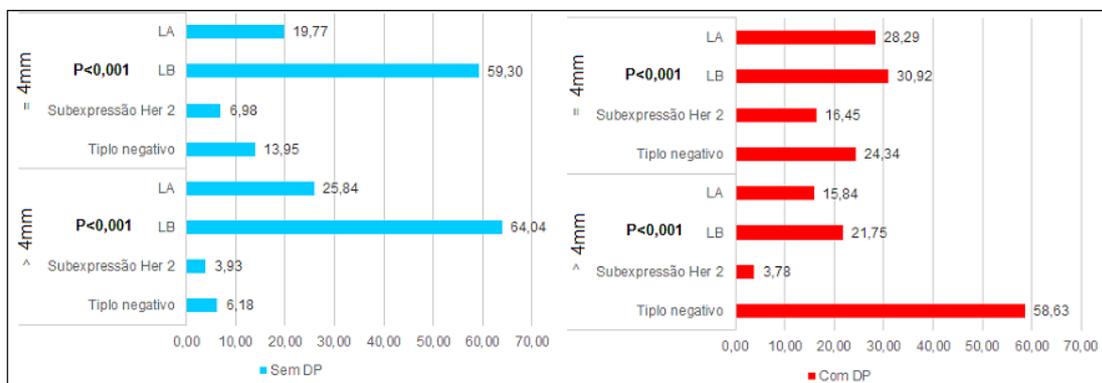


Nota: Grupo 1A (n=24); PS: profundidade de sondagem. Luminal A: LA/ Luminal B: LB. Teste-q quadrado para as proporções dos parâmetros clínicos e os subtipos moleculares.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

A PS=4mm (30,48%) foi maior para o subtipo Luminal B ($p<0,001$) e a PS >4mm (53,94%) subtipo Luminal A ($p<0,001$) em relação aos outros subtipos. No grupo 1B o NIC=4mm (59,30%) foi para o subtipo Luminal B ($p<0,001$) e no grupo 1A (30,92%) em relação aos outros subtipos. No grupo 1B o NIC>4mm (64,04%) foi para o subtipo Luminal B ($p<0,001$) e no grupo 1A (58,63%) para o subtipo triplo negativo em relação aos outros subtipos.

Figura 17 – Caracterização do NIC entre os subtipos moleculares na Fase 1

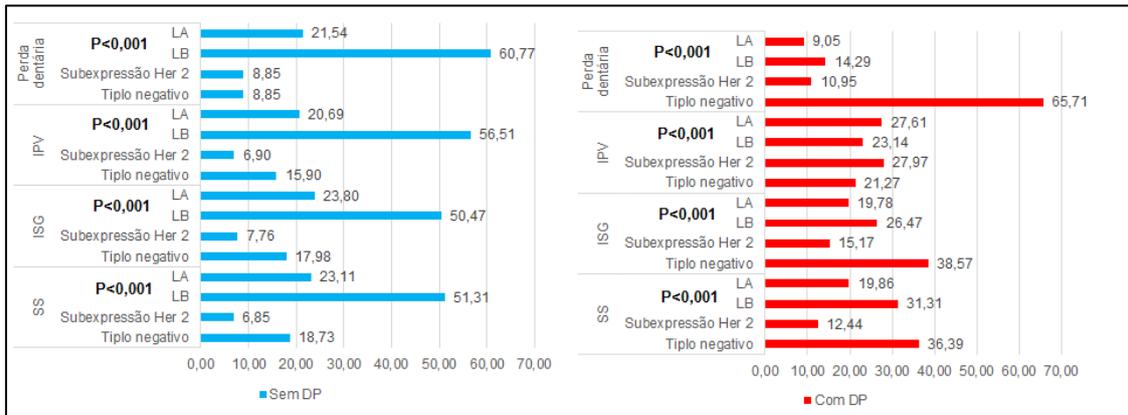


Nota: Grupo 1A (n=24); Grupo 1B (n=26). NIC: nível de inserção clínico. Luminal A: LA/ Luminal B: LB. Teste quadrado para as proporções dos parâmetros clínicos e os subtipos moleculares.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

As figuras dos gráficos 18, 19 e 20 caracterizam os parâmetros clínicos da fase 2 entre os subtipos moleculares. Para as pacientes do grupo 1B, a perda dentária (60,77%), o IPV (56,51%), o ISG (50,47%), SS (51,31%) e NIC>4mm (58,06%) foram maiores em prevalência para o subtipo molecular luminal B ($p<0,001$) em relação aos outros subtipos.

Figura 18 – Caracterização da Perda dentária, IPV, ISG e SS entre os subtipos moleculares na Fase 2

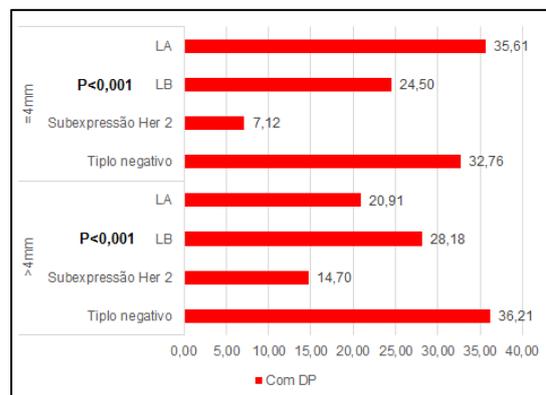


Nota: Grupo 1A (n=24); Grupo 1B (n=26). Perda dentária/ IPV: índice de placa visível/ISG: índice de sangramento gengival/SS: sangramento à sondagem. Teste q quadrado comparou as proporções dos parâmetros clínicos entre os subtipos.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

Quando se observa o grupo 1A, é possível perceber que para a perda dentária (65,71%), o ISG (38,57%), o SS (36,39%), PS>4mm (36,21%) e o NIC=4mm (32,83%) foram maiores em prevalência para o subtipo molecular triplo negativo ($p<0,001$) em relação aos outros subtipos. A PS=4mm (35,61%) foi maior para o subtipo molecular luminal A também em relação aos outros subtipos moleculares.

Figura 19 – Caracterização da PS entre os subtipos moleculares na Fase 2

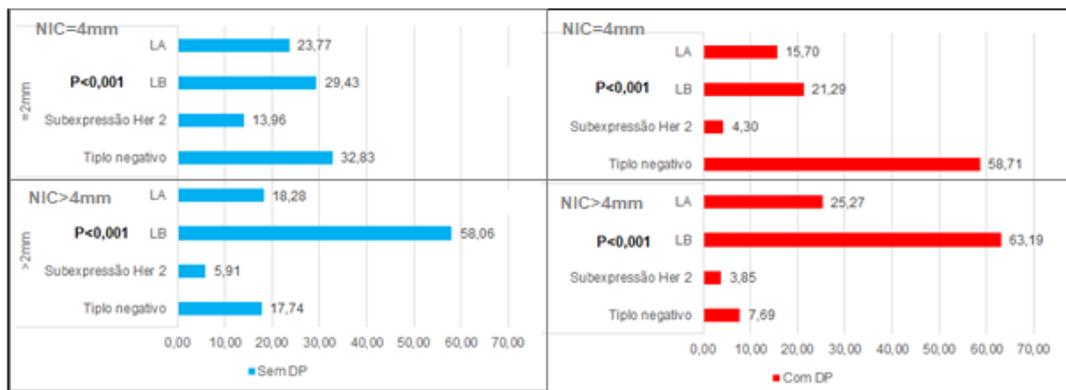


Nota: Grupo 1A (n=24). PS: profundidade de sondagem. Luminal A: LA/ Luminal B: LB. Teste q quadrado para as proporções dos parâmetros clínicos e os subtipos moleculares.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

The subtipo Luminal B foi o mais prevalente nesta investigação, mas para o subtipo triplo negativo, interessantemente, mostrou indicadores inflamatórios periodontais expressivos. Os resultados entre o subtipo TN e Luminal B foi expressiva em comparação aos outros subtipos moleculares. Não houve diferenças observadas entre os subtipos Luminal A e Suexpressão de HER2.

Figura 20 – Caracterização do NIC entre os subtipos moleculares na Fase 2



Nota: Grupo 1A (n=24); Grupo 1B (n=26). NIC: nível de inserção clínica. Luminal A: LA/ Luminal B: LB. Teste quadrado para as proporções dos parâmetros clínicos e os subtipos moleculares.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

5.6. Correlação da microbiota subgengival com o grau histológico dos tumores das pacientes

Em nossa análise, o grau histológico III compreendeu 27% das pacientes e o grau II 56%. O grau histológico para o grupo sem periodontite obteve associação significativa com a perda dentária e o NIC, onde um paciente com grau histológico III e II tem 4,8 e 3,5 mais riscos de ter uma perda dentária em comparação a um paciente com grau histológico I.

Tabela 9 – Associação da Perda Dentária e o NIC com o Grau Tumoral

	Grau histológico (Nottingham)		RR	Erro padrão robusto	z	Valor p*	Intervalo de confiança de 95% para RR		Relação
							Limite inferior	Limite superior	
Perda dentária	1B	I	1	-	-	-	-	-	-
		II	3,812	1,734	2,940	0,003	1,563	9,298	Aumento
		III	4,500	2,461	2,750	0,006	1,540	1,314	Aumento
	1A	I	1	-	-	-	-	-	-
		III	1,355	0,358	1,150	0,250	0,807	2,275	Estável
NIC \geq 4mm	1B	I	1	-	-	-	-	-	-
		II	0,497	0,123	2,820	0,005	0,305	0,808	Aumento
		III	0,359	0,104	3,520	0,001	0,203	0,635	Aumento
	1A	I	1	-	-	-	-	-	-
		III	0,819	0,159	1,030	0,302	0,560	1,197	Estável

Nota: RR - Risco relativo; *. Regressão de Poisson simples. n=50. 1-Categoria de referência; significativo se $p < 0,050$. 1A: com periodontite; 1B: sem periodontite.

Fonte: GOMES & SPERANDIO (via SPSS versão 24)

E um paciente com grau histológico II e III tem os riscos de ter um NIC aumentado em 0,5 e 0,4 quando comparado a um paciente com grau I (Tabela 9). No grupo sem periodontite, os resultados para perda dentária e NIC \geq 4mm foram significantes quanto ao grau tumoral maior.

6. DISCUSSÃO

Nossos achados revelaram a prevalência dos casos de câncer de mama em pacientes a partir dos 50 anos. Estas observações são consistentes com estudos anteriores que relatam que quase 75% de todos os CAM ocorrem em mulheres na pós-menopausa e 66-80% desses são positivos para receptor de hormônio, o que confirma a relação com as alterações nos níveis sistêmicos de estrogênio e progesterona (TAICHMAN et al., 2015). Berben e colaboradores (2020) confirmaram que o CAM como muitos cânceres epteliais mostra a maior incidência com o aumento da idade, pois o envelhecimento deteriora e diminui as respostas imunológicas contra o tumor culminando em seu avanço (FUENTES et al., 2017).

O perfil sócio demográfico como o consumo de álcool e tabaco foram predominantes no grupo 1. Estudos em geral afirmam a relação entre o tabagismo e o risco para o desenvolvimento de vários tipos de câncer (TAKADA et al., 2020), este pode não ter impacto clinicamente significativo nas características de tumores precoce entre mulheres, mas pode estar associado a mudanças moleculares e genéticas (GOLDVASER et al., 2017). Já o consumo de bebida alcoólica é considerado um agente carcinogênico com evidências na literatura como no CAM, câncer colorretal, fígado, laringe, esôfago e cavidade bucal (COGLIANO et al., 2011; INUMARU; SILVEIRA; NAVES, 2011) e outros mecanismos como acetaldeído, estresse oxidativo, alterações epigenéticas e baixas concentrações de ácido retinóico associadas a um ciclo celular alterado (SEITZ et al., 2012).

A caracterização da microbiota nos grupos 1A e 1B obtiveram a presença de quase todos os patógenos do complexo vermelho, laranja e amarelo na fase 2 comparada com a fase 1 em relação aos grupos 2A e 2B. Ademais, outras espécies do complexo amarelo, verde, roxo e de *Actinomyces* (complexo azul) são usualmente relacionadas com a saúde periodontal, portanto aumenta a quantidade de dados que tendem a provar que estas espécies podem estar associadas também com a periodontite e doenças sistêmicas (CARROUEL et al., 2016). A abordagem em duas fases mostra a presença significante dos patógenos dos complexos verdes, de *Actinomyces* e outras espécies comuns na microbiota após a terapia periodontal básica, mostrando que o tratamento foi responsivo pela avaliação clínica das pacientes apresentando-se um periodonto clinicamente saudável nos grupos sem câncer. Já no grupo com câncer sem periodontite, mesmo após a terapia periodontal básica, houve a presença dos patógenos dos complexos vermelho, laranja e amarelo, caracterizados na literatura por

contribuírem para evolução da periodontite.

Quanto ao $NIC \geq 4\text{mm}$, houve aumento das espécies do complexo verde, *Streptococcus anginosus* no grupo 1A e *Leptotrichia buccalis* no grupo 1B na fase 1. *Streptococcus anginosus* têm sido encontrada em pacientes com periodontite severa e agressiva (DHILLON; KINGSLEY; HOWARD, 2019). Achados recentes confirmaram que *Leptotrichia* spp estão associadas tanto com a presença ou ausência da periodontite (FANA et al., 2021), mostrando a prevalência de patógenos considerados não agressivos correlacionados com o $NIC \geq 4\text{mm}$, especialmente no grupo com câncer. *Streptococcus mitis* e *Actinomyces naeslundii* correlacionaram com o aumento do $NIC \geq 4\text{mm}$ no grupo 1A na fase 2. A espécie *S. mitis* têm sido associada a vários tipos de câncer (CHOCOLATEWALA; CHATURVEDI; DESALE, 2010). Em uma revisão sistemática RISMAYUDDIN e colaboradores (2020) demonstraram que a patogenicidade de *A. naeslundii* é induzida por interações polimicrobianas no desenvolvimento de doenças orais. Em correlação à idade, houve um aumento quanto às espécies *Propionibacterium acnes* no grupo 1B e *Fusobacterium periodonticum* no grupo 1A, na fase 1, esses achados corroboram com a literatura que o acúmulo persistente da espécie *Propionibacterium acnes* pode acarretar uma resistência à fagocitose em uma variedade de órgãos e tecidos, resposta inflamatória crônica e capacidade de produzir enzimas que facilitam a destruição tecidual na periodontite (EADY & EILEEN, 1994). *F. periodonticum* e *F. nucleatum* têm a adesina FadA como potencial marcador específicos de atividade anti apoptótica (CHEN et al., 2022) podendo promover o crescimento tumoral. A perda dentária correlacionou de forma positiva com o aumento de *A. Gerencseriae* e *Treponema socranskii* no grupo 1B e *Eubacterium saburreum* no grupo 1A, na fase 1. Espécies como *Actinomyces gerencseriae* podem induzir a destruição de tecidos periodontais moles e duros (VIELKIND et al., 2015), facilitando a migração apical do epitélio periodontal e consequentemente a ausência do elemento dentário. Investigações apontaram a presença da espécie *T. socranskii* com frequência junto à *T. denticola* e *P. gingivalis* em associação com a severidade da periodontite (TAKEUCHI et al., 2001). *Eubacterium saburreum* foi encontrada em infecções com espécies bacterianas do complexo vermelho, laranja e amarelo e associadas com a probabilidade de perda óssea oral medida pela crista óssea alveolar (BRENAN et al., 2007) que pode resultar na também na destruição do elemento dentário. Na fase 2, *Streptococcus intermedius*, *Actinomyces israeli*, *Capnocytophaga ochracea* aumentaram em correlação à perda dentária no grupo 1B. *Actinomyces israeli* e espécies de *Actinomyces* não costumam ser virulentas, mas rompem a integridade das membranas da mucosa e a presença deles em

tecidos desvitalizados propiciam a invasão para estruturas corporais mais profundas e leva a doenças em humanos (KARPIŃSKI, 2019). A inflamação periodontal pode contribuir para diversas sucessões microbianas durante a quimioterapia e patógenos como *Capnocytophaga* podem representar um risco sistêmico em indivíduos com câncer (MEURMAN, 2010). Na fase 1, observou um aumento em correlação à idade com as espécies *Streptococcus anginosus* no grupo 1B. AMMANN e colaboradores (2013) mostraram em um estudo o aumento da perda dentária na presença de *Streptococcus anginosus*. Patógenos-chave na progressão da periodontite como *P. gingivalis*, *Veillonella parvula* e espécies de *Actinomyces* foram relacionadas com o aumento da idade no grupo 1A na fase 2. Outras investigações observaram que espécies de *Actinomyces* foram encontradas em grandes proporções no biofilme subgengival de indivíduos acima de 60 anos de idade. Além disso, o declínio das funções do sistema imune é provocado pelo avanço natural da idade, o que refere geralmente a “imunosenescência” (KARPIŃSKI, 2019). *V. parvula* é um patógeno importante na periodontite e condições inflamatórias crônicas presente frequentemente na cavidade oral (MATERA et al., 2009), encontradas também em abundância junto às espécies de *Actinomyces* na progressão do carcinoma oral de células escamosas (YANG et al., 2018). No que refere às espécies de *Actinomyces*, estas espécies agregadas à *E. corrodens* através da sua lectina específica GalNAc estimula a atividade mitogênica dos linfócitos B (CARROUEL et al., 2016), como a espécie *F. nucleatum* encontradas em abundância em amostras de tumores de mama com presença da lectina específica GalNAc (PARHI et al., 2020). Nos ensaios de HENNE e colaboradores (2014), a espécie *C. ochracea*, estava presente em indivíduos com periodonto saudável. *E. corrodens* e *C. ochracea* foram relacionadas a muitos patógenos e elas são as primeiras espécies a constituir os biofilmes supra e subgengival de pacientes periodontalmente saudáveis (TELES et al., 2013; ARMITAGE, 2013). Benhardt e colaboradores (2019), em um estudo transversal, identificaram altos níveis das espécies *Actinomyces gerencseriae* e *Neisseria mucosa* em mulheres com CAM. Espécies como (*Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus mitis*) foram sugeridas como marcadores de diagnóstico e consideradas preditoras de 80% dos casos de câncer (KARPIŃSKI, 2019) confirmando nossos achados quanto essas espécies nos grupos 1A e 1B.

No contexto inflamação periodontal e câncer, marcadores imunes biologicamente significativos na progressão de vários tumores, como as citocinas, desempenham um papel crucial na patogênese da periodontite (TASDEMIR et al., 2020).

Encontramos resultados significativos dos níveis da citocina IL8 no grupo 1B em relação ao grupo 2B na fase 2. A expressão coordenada de IL8 facilita o trânsito de neutrófilos do tecido gengival para o sulco gengival (FINOTI et al., 2017), mesmo na ausência da periodontite registrada, o processo inflamatório pode estar relacionado com o uso de antineoplásico e ou associado a alguma condição sistêmica.

A IL6 obteve maior quantidade no grupo 1B em relação ao grupo e 2B e no grupo 1A em relação ao grupo 2A na fase 2. Esta citocina participa da atividade osteoclástica e reabsorção óssea com a IL8 durante o processo inflamatório da periodontite (LINDHE & LANG, 2020) e desempenha funções pleiotrópicas em vários tipos celulares, portanto, é produzida não só por células do sistema imunológico, mas também por células tumorais de mama e fibroblastos do estroma mamário (SANGUINETTI et al., 2015). Marcadores inflamatórios como citocinas IL8 mostraram um aumento com o envelhecimento, conseqüentemente, a inflamação crônica associada a idade pode induzir uma menor resposta imune tumoral (REA et al., 2018) e está relacionada ao estímulo da invasão e metástase (HARTMAN et al., 2013). No contexto de envelhecimento e inflamação, IL-6 é uma das citocinas pró-inflamatórias mais descritas, envolvida em doenças agudas, bem como inflamação crônica (REA et al., 2018). As interações entre mediadores inflamatórios são diversas em relação à idade e respondem de maneira diferente à evolução e ao tratamento do CAM (BERBEN et al, 2020).

A citocina TNF α foi maior em mediana no grupo 1A em relação ao grupo 2A e 1B em relação ao grupo 2B na fase 2. Na periodontite, TNF α aumenta a permeabilidade tecidual e a degradação da matriz extracelular e subsequente destruição tecidual (LINDHE & LANG, 2020). Clinicamente, as concentrações séricas elevadas e o aumento da expressão de TNF α estão presentes em várias doenças pré-neoplásicas e malignas em comparação aos tecidos e sangue de indivíduos saudáveis. Evidências sugerem que TNF α pode regular o processo de crescimento e progressão do tumor e a sua inibição pode ajudar em novas condutas terapêuticas contra o câncer (SZLOSAREK et al., 2006; SCHETTER; HEEGAARD & HARRIS, 2010). A expressão da IL-1 β também foi significativa para o grupo 1B sobre o 2B e no grupo 1A em relação ao grupo 2A. Esta citocina participa do início da progressão da periodontite envolvida de forma direta e indireta na osteoclastogênese, levando à perda óssea alveolar no estágio avançado (LINDHE & LANG, 2010). No CAM os níveis de IL-1 β estão relacionados a tumores de pior estadiamento e com perfil mais agressivo (carcinomas invasivos) (ESPINOZA et al., 2016). Existem implicações maiores da periodontite além da

cavidade oral e revela novas abordagens potenciais para o tratamento de doenças inflamatórias sistêmicas que interagem com ela (FINE et al., 2020).

Para caracterização da periodontite de forma mais precisa, destaca-se a perda de inserção clínica (NIC), a quantidade de sítios periodontais que apresentaram acúmulos de biofilmes expressivos (IPV) e o sangramento à sondagem (SS) associados essencialmente às bolsas periodontais profundas ($PS \geq 4\text{mm}$). Os resultados foram significativos para o grupo 1B e 1A em relação à perda dentária, IPV, ISG e SS em comparação aos grupos 2B e 2A na fase 2. No entanto, a perda dentária pode não ser um marcador direto da periodontite, todavia, é plausível que as associações que observamos podem estar ligadas a fatores que agravam a sua evolução ocorridos anterior ao início da pesquisa assim como os índices IPV, ISG e SS. Os valores de $PS \geq 4\text{mm}$ foram maiores no grupo 1A em relação ao grupo 2A e do $NIC > 4\text{mm}$ foi expressivo nos grupos 1A e 1B em relação aos grupos 2A e 2B na fase 2. A diminuição do NIC caracteriza a perda óssea alveolar com avanço da periodontite e esses achados possivelmente sugerem alguma relação com a condição sistêmica no grupo com câncer. Por exemplo, o risco na redução da crista óssea alveolar afeta o NIC (TAICHMAN et al., 2015), perda dentária (KRALL, 2006) e a baixa taxa de estrogênio ocorrente na menopausa (TAICHMAN et al., 2015). Além de que, os efeitos do envelhecimento humano nos tecidos periodontais são baseados em mudanças biomoleculares nas células do ligamento periodontal que exarcebam a perda óssea em pacientes idosos com periodontite (HEBLING, 2009). Os dados dos PCP em relação aos subtipos do CAM apresentaram fortes associações entre os perfis dos subtipos moleculares para o CAM nas fases 1 e 2. Foram observados valores significativos para a perda dentária, IPV, ISG, $NIC > 4\text{mm}$ e o SS maiores para o subtipo molecular triplo negativo em relação aos outros subtipos na fase 1. Na fase 2 do nosso estudo, o $NIC = 4\text{mm}$, perda dentária, ISG, $PS > 4\text{mm}$ e SS prevaleceram no subtipo triplo negativo (o subtipo molecular mais agressivo). O subtipo mais agressivo do tumor de mama (TN) compreende 29,7% dos diagnósticos neste estudo, portanto, há uma notável correlação das condições clínicas periodontais com avanço do processo inflamatório e surpreendentemente com o nível de agressividade do tumor.

A análise do grau tumoral II revelou grande prevalência entre os índices de perda dentária e NIC. Os parâmetros clínicos periodontais obtiveram significância para o grupo 1B. Estudos prévios de MORAES et al, 2016, mostraram que 39% da população estudada apresentou grande associação dos parâmetros de NIC e que 78% dessas lesões estavam em estágios avançados em níveis III and IV para o câncer oral. Um estudo avaliou diretamente a perda

dentária e periodontite como fatores de risco potenciais para a carcinogênese (MEYER et al., 2008). Evidências crescentes apóiam o papel da inflamação no desenvolvimento, progressão, metástase e resistência ao tratamento do câncer (GRETEN, GRIVENNIKOV, 2019).

A característica da periodontite como um processo inflamatório relacionada ao câncer difere entre os tipos de tumores, podendo afetar muitos aspectos da malignidade e resposta a drogas quimioterápicas (MANTOVANI et al., 2008). Importante considerar que a mucosa oral representa um dos alvos da terapia antineoplásica e pode apresentar-se edemaciada, inflamada e/ou ulcerada e essas alterações podem comprometer a saúde sistêmica, prolongar o tempo de internação hospitalar podendo reduzir a sobrevida do paciente (HESPANHOL, 2010). A inflamação persistente como a progressão da periodontite associada ao CAM pode compartilhar vias semelhantes para suas patogenicidades.

7. CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho obtidos nos grupos estudados nos permitem concluir que:

- A microbiota subgingival apresentou grande presença dos patógenos-chave do desenvolvimento da periodontite como os contidos nos complexos vermelho, laranja e amarelo nos grupos 1A e 1B comparado com o grupos 2A e 2B. A grande correlação da microbiota entre o $\text{NIC} \geq 4\text{mm}$, idade e perda dentária no grupos e fases demonstraram um padrão diferente como a relação cada vez mais comum de patógenos tido comensais e ou saudáveis promovendo atividade patológica, principalmente neste grupo com câncer.
- Marcadores inflamatórios comuns na progressão da periodontite e de muitos tumores como as citocinas inflamatórias (IL-8, $\text{TNF}\alpha$, IL6 e $\text{IL1}\beta$) foram prevalentes nos sítios periodontais com o aumento significativo da inflamação clínica pelos parâmetros clínicos periodontais nas pacientes com câncer.
- Dada a relevância do subtipo triplo negativo, que reúne tumores majoritariamente agressivos e quimiorresistentes, foi observado a inflamação oral (periodontite) persistente nos grupos com este diagnóstico.
- Dados mencionados acima descritos permaneceram mesmo após terapia periodontal básica.
- O perfil sócio demográfico desse estudo mostrou que o CAM foi predominante nas mulheres com faixa etária na menopausa e pós-menopausa que estão ligadas ao envelhecimento/imunosenesescência, portanto, estes fatores devem ser levados em conta ao traçar a estratégia do tratamento ideal para cada indivíduo.
- Potenciais focos de infecção oral precisam ser diagnosticados e tratados antes de iniciar a terapia antineoplásica. A recomendação para a adequação bucal ou terapia periodontal básica é imprescindível antes do início do tratamento do câncer de mama entre outras patologias. Mesmo considerando que a saúde bucal seja importante para as mulheres sob uso de antineoplásicos, o grupo sem câncer também apresentou certa limitação quanto aos cuidados orais de higiene e esta condição deve ser avaliada constantemente.
- Faz-se necessário a condução e a otimização de estudos que não sejam apenas propostas de tratamento paliativo por meio de estratégias que minimizem os efeitos adversos dos fármacos antineoplásicos, mas que conduzam à identificação de metabólitos e/ou biomarcadores que estejam relacionados à doença, ou até mesmo fatores que possam potencializar seus efeitos

sobre a cavidade bucal, de forma a engajar as avaliações de risco confiáveis e terapias econômicas preventivas das patologias na cavidade oral (o tratamento eficaz), assim melhorar a sobrevivência dos pacientes.

- Uma associação entre periodontite e câncer pode nos levar a considerar pacientes com periodontite como população em risco de desenvolver o câncer.

8. PERSPECTIVAS

- Diante da caracterização da microbiota realizada neste estudo, cabe uma análise da possível presença de patógenos bacterianos do complexo de Socransky em biópsias de tumores de mama (por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR)) e sua provável influência na progressão dos tumores de mama.
- Quanto ao acompanhamento das pacientes neste ensaio clínico, cabe: além da caracterização dos parâmetros clínicos periodontais (perda dentária, IPV, ISG, PS, NIC e SS) e dos níveis de secreção de citocinas IL8, TNF α , IL6, IL1 β , IL17, investigar outros biomarcadores como inflamosomas, fator nuclear Kappa beta, receptor de estrogênio e o fator de crescimento transformante beta (TGF β) 1, 2 e 3 nos fluidos gengivais participaria do processo de progressão tumoral no CAM com o tratamento antineoplásico quimioterápico.
- Dada à epidemiologia ascendente do CAM, abordagens multidisciplinares vêm sendo adotadas na clínica oncológica com o intuito de aprimorar a eficácia da terapêutica antineoplásica, por conseguinte, promover incrementos na sobrevida e na qualidade de vida de suas portadoras;
- Prosseguir com as investigações da aplicabilidade da terapia periodontal como um dos requisitos para o início do tratamento do câncer sob a influência do tratamento antineoplásico.

9. REFERÊNCIAS

ABED J. et al. Colon cancer-associated *Fusobacterium nucleatum* may originate from the oral cavity and reach colon tumors via the circulatory system. **Frontier Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020. Doi.org/10.3389/fcimb.2020.00400.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica gvims/ggtes/anvisa nº 04/2020 orientações para serviços de saúde: medidas de prevenção e controle que devem ser adotadas durante a assistência (atualizada em 21/03/2020).

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY (ASCO) 2010 Annual Meeting. [accessed 2020 Nov 20]. <https://www.medscape.com/viewcollection/30906>.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC); editing status 2021-12-17; re3data.org- Registry of Research Data Repositories. <http://doi.org/10.17616/R3M60F> last accessed: 2022-03-14.

AMMANN T.W. et al. Impact of early colonizers on in vitro subgingival biofilm formation. **PLoS ONE**, v.8, n.12, 2013.

ARAL K. et al. Inflammasomes and their regulation in periodontal disease: A review. **Journal of Periodontal Research**, v.00, p.1–15, 2019.

ARJUNAN P. et al. Oral pathobiont activates anti-apoptotic pathway, promoting both immune suppression and oncogenic cell proliferation. **Nature**, v. 8, n.16607, 2018.

ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 34, n. 1, p. 9-21, 2004.

ARMITAGE, G. C. Learned and unlearned concepts in periodontal diagnostics: a 50-year perspective. **Periodontology 2000**, v. 62, n.1, p.20-36, 2013.

ARORA M. et al. An exploration of shared genetic risk factors between periodontal disease and cancers: A Prospective Co-Twin Study. **Am J Epidemiol**. v. 171, n 2, p. 253–259, 2010.

BARRETT J. R. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. **European Journal of Cancer**, v.42, p.760–767, 2006.

BAUMGARTEN, S; FRASOR, J. Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. **Molecular Endocrinology**, v.26, n.3, p.360–371, 2012.

BEIKLER T. et al. Gene expression in periodontal tissues following treatment. **BMC Medical Genomics**, v.1:30, 2008.

BENHARDT V. R. et al. Subgingival microbial profile of women with breast cancer: a cross-sectional study. **Applied Cancer Research**, v.39, p.13, 2019.

BERBEN I. et al. Age-related remodelling of the blood immunological portrait and the local tumor immune response in patients with luminal breast cancer. **Clinical & Translational Immunology**, v.1184, n9, p.01-22, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 15, de 15 de março de 2012. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRENNAN R.M. et al. Bacterial species in subgingival plaque and oral bone loss in postmenopausal women. **Journal of Periodontology**. v.78, p.1051-1061, 2007.

BUI F.Q. et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. **Biomedical Journal**, v.42, p.27-35, 2019.

CAMPISI G; BIZZOCA M.L; LO MUZIO L. COVID-19 and periodontitis: reflecting on a possible association. **Head & Face Medicine**, v.17, n.16, 2021.
<https://doi.org/10.1186/s13005-021-00267-1>.

CARROUEL F. et al. Quantitative molecular detection of 19 major pathogens in the interdental biofilm of periodontally healthy young adults. **Frontier Microbiology**, v.7, n. 840, 2016.

CATON G.J. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Clin Periodontol**, v.45, n.20, p.1-8, 2018. [http:// dx.doi.org/10.1111/jcpe.12935](http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12935). PMID: 29926489.

CAVALLA F. et al. Genetic association with subgingival bacterial colonization in chronic periodontitis. **Genes**, v.9, n.271, 2018. Doi:10.3390/genes90602712018.

CHEANG M. C. U. et al. Ki67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

CHEN C. et al. Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. **The ISME Journal**, v. 12, p.1210–1224, 2018.

CHEN Y. et al. More than just a periodontal pathogen – the Research Progress on *Fusobacterium nucleatum*. **Frontiers Cellular Infection Microbiology**, v.12, 2022. doi.org/10.3389/fcimb.2022.815318.

COGLIANO V. J. et al. Preventable exposures associated with human cancers. **J Natl Cancer Inst.** v. 103, n. 24, p. 1-13, 2011.

COLLEGE OF AMERICAN PHATOLOGISTS. Cancer Protocol Templates. <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools>

CORBELLA S. et al. Is periodontitis a risk indicator for cancer? A meta-analysis. **PLoS ONE**, v 13, e0195683, 2018.

COUSSENS, L.; ZENA, W. Inflammation and cancer. **Nature**, v.420, n.7219, p.860-873, 2002.

CULBERTSON M.G. et al. The psychosocial determinants of quality of life in breast cancer survivors: a scoping review. **BMC Cancer**, v. 20, n. 948, 2020.

DEL PRETE A. et al. Molecular pathways in cancer-related inflammation. **Biochem Med (Zagreb)**, v.21, p.264–75, 2011.

DEO, P. N.; DESHMUKH, R. Oral microbiome: unveiling the fundamentals. **Journal of Oral Maxillofacial Pathology**, v.23, p.122-128, 2019

DHILLON, N.; KINGSLEY, K.; HOWARD, K.M. Prevalence of *Selenomonas noxia* among pediatric and adult orthodontic patients. **International Journal of Research and Reports in Dentistry**, v.2, n.1, p.1-7, 2019.

DONABEDIAN, A. An introduction to quality assurance in health care. New York: Oxford University, 2003.

EADY E.A.; EILEEN I. Propionibacterium acnes - friend or foe? **Reviews in Medical Microbiology**, v. 5, n.3, p.163-173, 1994.

ELEBYARE O. et al. The crossroads of periodontitis and oral squamous cell carcinoma: immune implications and tumor. **Frontier Oral Health**, 2021.

ESPINOZA J.A. et al. Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 12, p. e1248015, 2016.

FANA A.S. et al. The prevalence of novel periodontal pathogens and bacterial complexes in Stage II generalized periodontitis based on 16S rRNA next generation sequencing. **Journal of Applied Oral Sciences**, v.29, 2021.

FINE N. et al. Periodontal Inflammation Primes the Systemic Innate Immune Response. **Journal of Dental Research**, v.100, n. 3, p.318-325, 2020.

FINOTI L.S. et al. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v.96, n.2, 2017. doi: 10.1097/MD.0000000000006932.

FITZPATRICK, S. G.; KATZ, J. The association between periodontal disease and Cancer: A review of the literature. **Journal of dentistry**, v.38, p.83-95, 2010.

FOWLER, E.B.; BREAUULT, L.G; CUENIN, M.F. Periodontal disease and its association with systemic disease. **Mil Med**, v.166, p.85-89, 2001.

FRAGOMENI, S.M; SCIALIS, A; JERUSS, J.S. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. **Surgical Oncology Clinical of North America**, v.27, n.1, p. 95–120, 2018. doi:10.1016/j.soc.2017.08.005.

FUENTES E. et al. Immune system dysfunction in the elderly. **An. Acad. Bras. Ciênc**, v.89, n.1, p. 285-299, 2017.

GIBERTONI F. et al. Evolution of Periodontal disease: immune response and RANK/RANKL/OPG system. **Brazilian Dental Journal**, v.28, n.6, p.679-687, 2017.

GOLDBERG J.E.; K.L. SCHWERTFEGER. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. **Current Drug Targets**, v.11, n.1, p.133-146, 2010.

GOLDVASER H. et al. The association between smoking and breast cancer characteristics and outcome. **BMC Cancer**, v.17, n.624, 2017.

GRETEN, F.R.; GRIVENNIKOV S.I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. **Cell Press**, v.51, n.1, p. 27-41, 2019.

HAIJSHENGALLIS G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat. Rev. Immunol**, v.15, p.30–44, 2015.

HARTMANN, Z.C. et al. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. **Cancer Research**, v.73, n.11, 2013. Doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4524-T.

HEBLING, E. Effects of human ageing on periodontal tissues. **Periodontal Diseases - A Clinician's Guide**. 2009. <https://www.researchgate.net/publication/26336559>.

HEIKKILÄ P. et al. Periodontitis and cancer mortality: Register-based cohort study of 68,273 adults in 10-year follow-up. **International. J. Cancer**, v.142, p.2244–2253, 2018.

HESPANHOL F.L. et al. Manifestações bucais em pacientes submetidos à quimioterapia. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p.85-94, 2010.

HOARE A. et al. Chronic Inflammation as a Link between periodontitis and carcinogenesis. **Mediators Inflammation**, v.27, 2019. doi: 10.1155/2019/1029857.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A.; NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 7, p. 1259-1270, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. ESTIMATIVA 2020 – Incidência de Câncer no Brasil, 2020. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2020/index.asp>>. Acesso em: 08 de maio de 2020.

JEMAL A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n.2, p. 69–90, 2011.

JIANG, X; SHAPIRO, D.J. The immune system and inflammation in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n.1, p.673-682, 2014.

KARPINSKI, T.M. Role of oral microbiota in cancer development. **Microorganisms**, v.7, n.20, 2019.

KILIAN, M. et al. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. **British Dental Journal**, v, 221, n.10, 2016.

KIYOSE, S. Chromogenic in situ hybridization (CISH) to detect HER2 gene amplification in breast and gastric cancer: Comparison with immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH). **Pathology International**, v. 62, n.11, p.728–734, 2012.

KOLENBRANDER, P.E. et al. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontology 2000**, v.42, p.47-79, 2006.

KRALL, E.A. Osteoporosis and the risk of tooth loss. **Clin Calcium**, v.16, p.287–290, 2006.

KUMAR, P.S. Oral microbiota and systemic disease. **Anaerobe**, v. 24, p.90-93, 2013.

LAMONT, J.R.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nature Review Microbiology**, v.16, n.12, p.745–759, 2018.

LINDHE, J.; LANG, N.P. Tratado de Periodontia Clinica e Implantologia Oral. 6 ed. Rio de Janeiro; **Guanabara Koogan**, 2020.

MANTOVANI A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, p.436-444, 2008.

MATERA G. et al. Receptor recognition of and immune intracellular pathways for *Veillonella parvula* lipopolysaccharide. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.12, p.1804-1809, 2009.

MEURMAN, J. H. Oral microbiota and cancer. **Journal of Oral Microbiology**, v.2, p.5195, 2010.

MEYER M. S. et al. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease and cancer. **Cancer Causes Control**, v.19, p.895-907, 2008.

MICHAUD D. S. et al. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. **J Natl Cancer Inst.** v. 99, n. 2, p. 171-175, jan. 2007.

MICHAUD D. S. et al. Periodontal disease, tooth loss and cancer risk in a prospective study of male health professionals. **Lancet Oncology**. v.9, n. 6, p. 550-558, jun. 2008.

MICHAUD, D.S. Role of bacterial infections in pancreatic cancer. **Carcinogenesis**, v.34, n.10, p.2193–2197, 2013.

MOHANTY, R. et al. Socransky's different microbial complexes. Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. **J Family Med Prim Care**, v.8, n.11, p.3480-3486, 2019. doi:10.4103/jfmpc.jfmpc_759_19.

MOLON R.S. et al. Linkage of periodontitis and rheumatoid arthritis: current evidence and potential biological interactions. **Int. J. Mol. Sci**, v.20, n.4541, 2019. doi:10.3390/ijms20184541.

MORAES R.C. et al. Association between chronic periodontitis and oral/ oropharyngeal cancer. **Brazilian Dental Journal**, v.27, n.3, p.261-266, 2016.

NAZIR M. et al. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillanc. **Scientific World Journal**. [https://doi: 10.1155/2020/2146160](https://doi.org/10.1155/2020/2146160).

NEWMAN, T.; CARRANZA, K. *Periodontia Clínica* 2019. 13^a ed. Rio de Janeiro; **Guanabara Koogan**, 2020.

OHYAMA H. et al. An unusual autopsy case of pyogenic liver abscess caused by periodontal bacteria. **Jpn Infect**, v.62, p.381-383, 2009.

PALOMINO, D.C.T.; MARTI, L.C. *Quimiocinas e Imunidade*. Einstein, v.13, n.3, p.469-73, 2015.

PARHI L. et al. Breast cancer colonization by *Fusobacterium nucleatum* accelerates tumor growth and metastatic progression. **Nature communications**, v.11, n. 3259, 2020.

PASCALICCHIO, J.; FRISTACHI, C.; BARACAT, F. Câncer da mama: fatores de risco, prognósticos e preditivos. **Revista Brasileira de Mastologia**, v.11, n.1, p.71-84, 2001.

PASTER, B. J.; DEWHIRST, F.E. Molecular microbial diagnosis. **Periodontology 2000**, v.51, p. 38–44, 2009. Doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00316.x.

PENDYALA G. et al. Links demystified: Periodontitis and cancer. **Journal of Dental Research**, n.6, v. 10, 2013.

PEROU C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

RAJEEV R. et al. Role of bacteria in oral carcinogenesis. **South Asian Journal of Cancer**, v.1, p.78-83, 2012.

REA I. M. et al. Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines. **Frontier. Immunology**, v.9, p.586, 2018.

RECH L. R. et al. Associação entre doença periodontal e síndrome coronariana aguda. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.2, n.88, 2007.

RISMAYUDDIN N. A. R. et al. The pathogenicity of *Actinomyces naeslundii* is associated with polymicrobial interactions: a systematic review. **Scientific Dental Journal**, v.4, p.73-8, 2020.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol**, v.18, p.217–42, 2000.

SANGUINETTI A. et al. Interleukin-6 and pro inflammatory status in the breast tumor microenvironment. **World Journal of Surgical Oncology**, v.13, p. 129, 2015.

SANTOS G.L. et al. Fumo e álcool como fatores de risco para o câncer bucal. **Odontologia Clínica Científica (Online)**, v.9, n.2, p.131-133, 2010.

SCHENKEIN H.A. et al. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. **Periodontology 2000**, v.83, n.1, p.90-106, 2020.

SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v.31, p.37-49, 2010.

SEITZ H.K. et al. Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: update 2012. **Alcohol and Alcoholism**, v. 47, n. 3, p. 204-212, 2012.

SIEGEL R. et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J Clin**, v.61, n.4, p.212, 2011.

SLATTERY M.L. et al. Tumor markers and rectal cancer: Support for an inflammation-related pathway. **Int J Cancer**, v.125, p.1698– 1704. 2009.

SOCRANSKY, S.S. et al. Checkerboard DNA-DNA Hybridization. **Biotechniques**, v.17, p.788-792, 1994.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000**, v.28, n.1, p.12-55, jan. 2002.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000**, v. 38, n.1, p. 135-187, 2005.

SÖDER B. et al. Periodontal disease may associate with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 127, n. 2, p. 497-502, 2011.

SON J. et al. Prediction of breast cancer molecular subtypes using radiomics signatures of synthetic mammography from digital breast tomosynthesis. **Scientific Reports. Nature**, v.10, n. 21566, 2020. Doi.org/10.1038/s41598-020-78681-9.

SOORY, M. Oxidative stress induced mechanisms in the progression of periodontal diseases and cancer: A common approach to redox homeostasis? **J Cancers**, v.2, p.670–92, 2010.

STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. **Rev Odontol UNESP**, v. 47, n.4, p. 189-197, 2018.

SZLOSAREK P. et al. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. **Eur J Cancer**, v. 42, n.6, p.745-50, 2006.

TAICHMAN L.S. et al. Periodontal health in women with early stage postmenopausal breast cancer newly on aromatase inhibitors: A pilot study. **Journal Periodontol**. Ann Arbor, v.86, p. 906-916, 2015.

TAKADA K. et al. The effect of smoking on biological change of recurrent breast cancer. **J Transl Med**, v.18, n.153, 2020.

TAKEUCHI Y. et al. *T. socranskii*, *T. denticola* and *P. gingivalis* are associated with the severity of periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v.72, n.10, p.1354-1363, 2001.

TANWIR, F.; SADIA; SHAUKAT, D. Relation ship between periodontal disease, tooth loss and cancer. **Pakistan Oral Dent J**, p. 62-65, 2012.

TARIQ M. et al. Treatment modalities and evaluation models for periodontitis. **Int J Pharm Investig**, v.2, p.106-122, 2012.

TASDEMIR, I. et al. Assessment of saliva and gingival crevicular fluid soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR), galectin-1, and TNF- α levels in periodontal health and disease. *Journal of Periodontal Research*, v.55, n.5, p. 622-630, 2020.

TELES, R. et al. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. **Periodontology** 2000; v. 62, p. 95–162, 2013.

TONETTI, M.S.; GREENWELL, H.; KORNMANN, K.S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, v.89, n.1, p.159–172, 2018.

VAN DOOIJEWERT, C.; VAN DIESRT, P.J.; ELLIS, I.O. Grading of invasive breast carcinoma: the way forward. **European Journal of Pathology**, 2021. doi.org/10.1007/s00428-021-03141.

VAN KEMPEN, L. C.; DE VISSER, K. E.; COUSSENS, L. M. Inflammation, proteases and cancer. **European Journal of cancer**, v.42, p.728-34, 2006.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 10, p. 207-210, 2012.

VIELKIND P. et al. Prevalence of Actinomyces spp. in patients with chronic periodontitis. **International Journal of Medical Microbiology**, v.305, n.7, p.682-688, 2015.

WU Y. et al. Effect of aging on periodontal inflammation, microbial colonization, and disease susceptibility. **Journal of Dental Research**, v. 95, n.4, p.460–466, 2016.

YANG C.Y. et al. Oral microbiota community dynamics associated with oral squamous cell carcinoma staging. **Frontier Microbiology**, v. 9, n.862, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.00862.

YUAN S. et al. Evaluation of Methods for the Extraction and Purification of DNA from the Human Microbiome. **Plos One**, v.7, n.3, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0033865.

YAN Y. et al. Clinical evaluation of ultrasonic subgingival debridement versus ultrasonic subgingival scaling combined with manual root planing in the treatment of periodontitis: study protocol for a randomized controlled trial. **BMC Trials**, v. 21, n.113, 2020.
Doi.org/10.1186/s13063-019-4031-y.

10. APÊNDICES

A. ARTIGOS SUBMETIDOS

Clinical Oral Investigations
IMMUNE RESPONSE OF PERIODONTITIS AND ITS CORRELATION WITH BREAST
CANCER
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CLOI-D-21-02362	
Full Title:	IMMUNE RESPONSE OF PERIODONTITIS AND ITS CORRELATION WITH BREAST CANCER	
Article Type:	Original Article	
Corresponding Author:	Leticia Batista Azevedo Rangel, Ph.D Federal University of Espirito Santo: Universidade Federal do Espirito Santo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Espirito Santo: Universidade Federal do Espirito Santo	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Maria da Conceição Machado Gomes, M.D	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Maria da Conceição Machado Gomes, M.D Roberto Silva Ribeiro Júnior Tatiana Massariol Pimenta Bárbara da Silva Martins Clara Miotto Silva Diandra Zipinotti Santos Lorenzo Lyrio Stringari Glaucia Rodrigues de Abreu Rodrigo Ribeiro Rodrigues Priscila Ladeira Casado Alfredo Feitosa Leticia Batista Azevedo Rangel	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Estado do Espirito Santo	Not applicable
Abstract:	<p>Objective The aim of this study was to assess the secretion of inflammatory cytokines from gingival crevicular fluid (GCF), the periodontal clinical parameters (PCP): probing depth (PD)/clinical attachment of level (CAL)/ visible plaque (VP)/ gingival bleeding (GB)/bleeding on probing (BOP) and the relationship between PCP with immunohistochemistry profile for breast cancer (BC).</p>	

Journal of Oral Microbiology
ASSESSMENT OF SUBGINGIVAL BIOFILM AND ITS RELATIONSHIP WITH THE
STATUS OF TUMORS IN A POPULATION WITH BREAST CANCER
 --Manuscript Draft--

Full Title:	ASSESSMENT OF SUBGINGIVAL BIOFILM AND ITS RELATIONSHIP WITH THE STATUS OF TUMORS IN A POPULATION WITH BREAST CANCER	
Manuscript Number:	ZJOM-2021-0120	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	subgingival microbiota; breast tumor; periodontal disease	
Abstract:	<p>Aim: The aim of this study was to compare the subgingival microbiota of subjects with and without breast cancer (BC). Patients with BC (Group 1; n= 50) and without BC (Group 2; n=50) with periodontitis (A) and without periodontitis (B).</p> <p>Materials and methods: The study was conducted in two phases (P1 and P2). One biofilm sample was collected from each subject and analyzed by DNA-DNA Hybridization (Checkerboard DNA-DNA).</p> <p>Results: The relative abundance of the subgingival microbiota differed between the Case and Control groups. However, some species was higher in patients in the Case than in Control subjects and differed between the groups in both phases. Composition of the subgingival microbial community according to Socransky complex was related to periodontal disease, followed by clinical attachment of level (CAL\geq4mm), age and tooth loss, which were shown to be showed abundant in Cases when compared with controls. Patients with Tumor Grade II and III had a higher prevalence of tooth loss and CAL\geq4mm.</p> <p>Conclusion: It was concluded that in individuals with BC, the sub-gingival microbiota exhibited atypical changes, but nevertheless they developed periodontal disease.</p>	

B. PARECER DO CEPE

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CITOCINAS DO FLUIDO GENGIVAL E MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE SÍTIOS COM PERIODONTITE CRÔNICA EM MULHERES COM E SEM CÂNCER DE MAMA

Pesquisador: ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 88131918.6.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.725.799

Apresentação do Projeto:

Segundo o pesquisador responsável o projeto irá "Avaliar parâmetros clínicos, radiográficos, microbiológicos e imunológicos dos efeitos da quimioterapia anti-neoplásica sobre as condições clínicas da doença periodontal em pacientes com e sem câncer de mama".

Objetivo da Pesquisa:

O pesquisador responsável pelo projeto descreveu os objetivos do projeto da seguinte maneira:

"Objetivo Primário:

Estudar a produção de citocinas no fluido gengival e a microbiota subgengival em sítios com periodontite de mulheres com e sem câncer de mama sob quimioterapia antineoplásica.

Objetivo Secundário:

-Avaliar a condição bucal e periodontal de mulheres com e sem câncer de mama;- Caracterizar a condição sociodemográfica das mulheres com e câncer de mama;

-Comparar os níveis de produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF nos fluidos gengivais dos sítios com periodontite nos grupos;

-Caracterizar a microbiota subgengival dos sítios com periodontite e dos sítios periodontais clinicamente saudáveis nos grupos;

-Comparar o perfil das citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF com as características clínicas periodontais e com a microbiota subgengival dos sítios com periodontite nos grupos.

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



Continuação do Parecer: 2.725.799

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA, os riscos e benefícios do projeto Resposta Inflamatória e Bactérias de Bolsas Periodontais de Mulheres com e sem Câncer de Mama são:

Riscos:

O desconforto será mínimo, tais como: dor, pequeno edema do local, mas todas as medidas terapêuticas serão realizadas por meio de ações de rotina da prática odontológica a ser realizado pela especialista em Periodontia

Benefícios:

Os resultados desta pesquisa poderão contribuir para saber quais são as alterações que ocorrem na quantidade de citocinas (moléculas) responsáveis pela inflamação e na quantidade de bactérias nas gengivas, após a terapia bucal (tratamento periodontal) dos tecidos gengivais com inflamação gengival. Dessa maneira, a periodontista poderá orientar melhor os pacientes quanto ao período de retorno de suas consultas ao dentista, quanto aos cuidados que devem ser tomados em relação à adequada higienização bucal no período de tratamento gengival, bem como alertar à população das consequências da falta de higiene oral.*

Os riscos e benefícios estão de acordo com a Res. CNS N° 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto possui relevância científica e social.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No projeto CITOCINAS DO FLUIDO GENGIVAL E MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE SÍTIOS COM PERIODONTITE CRÔNICA EM MULHERES COM E SEM CÂNCER DE MAMA do pesquisador ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA constam os seguintes documentos:

Folha de rosto: apresentada

Projeto detalhado: apresentado

TCLE: apresentado

Termos de anuência das instituições onde a pesquisa será realizada: apresentada

Cronograma: apresentado

Orçamento: apresentado

Recomendações:

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



Continuação do Parecer: 2.725.799

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 1117923.pdf	18/06/2018 11:18:48		Aceito
Outros	FUNCAO.pdf	15/06/2018 17:59:42	ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	15/06/2018 12:35:54	ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CHSCMV.pdf	15/06/2018 12:34:18	ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CIUFES.pdf	15/06/2018 12:33:35	ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CHUCAM.pdf	15/06/2018 12:33:07	ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	15/06/2018 12:32:26	ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	15/06/2018 12:31:45	ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA	Aceito
Folha de Rosto	ROSTO.pdf	15/06/2018 12:30:13	ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Continuação do Parecer: 2.725.799

VITÓRIA, 20 de Junho de 2018

Assinado por:
KARLA DE MELO BATISTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: SIN CEP: 29.040-091
UF: ES Município: VITÓRIA
Telefone: (27)3335-7211 E-mail: cep.ufes@hotmail.com

1-K05 - GENGIVITE E DOENÇAS PERIODONTAIS

K050 – Gengivite aguda

K051 – Gengivite crônica

K052 – Periodontite aguda

K053 – Periodontite crônica

K054 - Periodontose

K055 - Outras doenças periodontais

K056 - Doença periodontal, sem outras especificações

2- C50 - NEOPLASIA MALIGNA DA MAMA

CID 10 - C50 Neoplasia maligna da mama

CID 10 - C50.5 Neoplasia maligna do quadrante inferior externo da mama

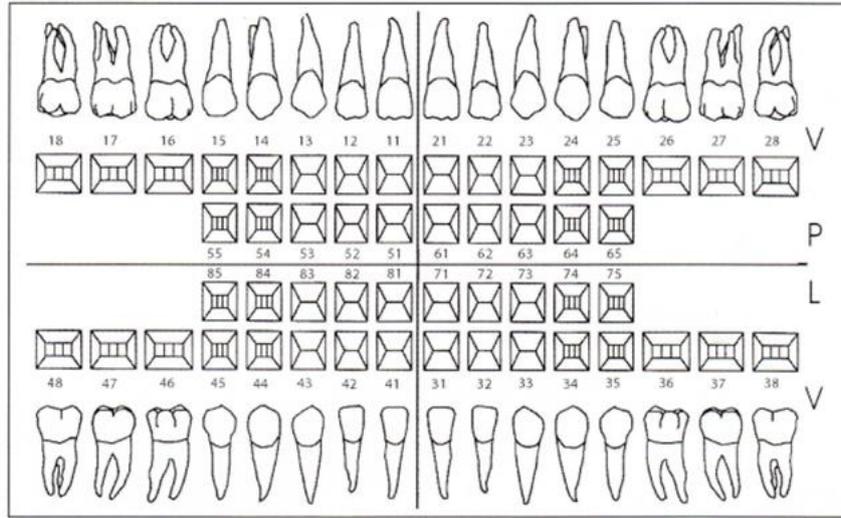
CID 10 - C50.6 Neoplasia maligna da porção axilar da mama

CID 10 - C50.8 Neoplasia maligna da mama com lesão invasiva

CID 10 - C50.9 Neoplasia maligna da mama, não especificada

E. ODONTOGRAMA

ODONTOGRAMA



ANEXOS

1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

A Sra. _____ foi convidada a participar da pesquisa intitulada **“CITOCINAS DO FLUIDO GENGIVAL E MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE SÍTIOS COM PERIODONTITE EM MULHERES COM E SEM CÂNCER DE MAMA”**, sob responsabilidade de Maria da Conceição Machado Gomes.

JUSTIFICATIVA

A presença de placa bacteriana pode afetar a gengiva causando inflamação gengival conhecida como periodontite. Através do presente estudo, verificaremos quais são os genes dos tecidos gengivais de dentes com e sem inflamação gengival que estão sendo alterados antes e durante o tratamento com quimioterapia ou radioterapia no tratamento do câncer de mama, e, também observar se existe alguma alteração desses genes após o tratamento gengival.

OBJETIVOS DA PESQUISA

Este trabalho propõe a realizar um estudo sobre microbiota e citocinas inflamatórias da bolsa gengival e fluido do sulco gengival de locais com inflamação gengival (periodontite) e de locais saudáveis dos referidos sulcos em mulheres com e sem câncer de mama.

PROCEDIMENTOS

Esta pesquisa constará de exame clínico da gengiva, da presença de dentes com cárie, obturados, perdidos, indicados para extração, e de raízes residuais através de um espelho bucal, sonda periodontal reta e curva, questionário sócio-demográfico e da obtenção de coleta de fluido crevicular gengival de 2 sítios periodontais saudáveis e 2 doentes clinicamente e o mesmo para coleta de placa subgengival. Esse exame será realizado por uma especialista em Periodontia, antes de iniciar a quimioterapia ou radioterapia, sessenta dias após a terapia antineoplásica e seis meses após a intervenção bucal por meio de raspagem e alisamento radicular, controle de placa, polimento dentário e aplicação tópica de flúor em todas as pacientes. As amostras dos tecidos gengivais serão obtidas por meio de cirurgia a retalho gengival da papila interproximal do dente com inflamação e sem inflamação gengival e imediatamente após será suturado com fio de seda 4,0 o tecido gengival. Os tecidos gengivais removidos serão imersos dentro de tubos de plástico (CRIOTUBO 2,0 ml) e após serão armazenados em freezer a -80° C no Laboratório de Biologia Molecular do Câncer Humano do Curso de Farmácia e Bioquímica da UFES sob Coordenação da Dra. Leticia Batista de Azevedo Rangel.

DURAÇÃO E LOCAL DA PESQUISA

Esses procedimentos serão realizados no Serviço de Periodontia do IOUFES no Ambulatório II e no Laboratório de Biologia Molecular do Câncer Humano do Curso de Farmácia e Bioquímica da UFES. A duração dessa pesquisa é de até três (03) anos. Todas as pacientes receberão gratuitamente o tratamento gengival por uma especialista (MCMG) no Ambulatório 2 do Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES).

RISCOS E DESCONFORTOS

O desconforto será mínimo, mas todas as medidas terapêuticas serão realizadas por meio de ações de rotina da prática odontológica a ser realizado pela especialista em Periodontia (MCMG).

BENEFÍCIOS

Os resultados desta pesquisa poderão contribuir para saber quais são as alterações que ocorrem na quantidade de moléculas responsáveis pela inflamação e pela saúde gengival, bem como as modificações dos genes após a terapia bucal (tratamento periodontal) dos tecidos gengivais com inflamação gengival. Dessa maneira, a periodontista poderá orientar melhor os pacientes, enfatizando os cuidados que devem ser tomados em relação à adequada higienização bucal no período de tratamento gengival, bem como alertar à população das consequências da falta de higiene oral.

GARANTIA DE MANUTENÇÃO DO SIGILO E PRIVACIDADE

Toda informação obtida neste estudo será confidencial. Em nenhum momento o seu nome será divulgado, sendo tratado apenas por um número. Apenas as pessoas envolvidas no estudo terão acesso a estas informações. Os pesquisadores se comprometem a resguardar sua identidade durante todas as fases da pesquisa, inclusive após publicação.

OBRIGAÇÕES FINANCEIRAS

Este projeto não implicará em qualquer custo ao paciente. Do mesmo modo, o participante voluntário desta pesquisa não será beneficiado financeiramente ou receberá qualquer ajuda, prêmios ou bonificações.

DESTINO DE MATERIAIS E/OU DADOS DA PESQUISA

Todos os resultados do trabalho em questão serão tornados públicos pelos meios normais de comunicação científica. Poderão ser apresentados através de publicações em periódicos científicos nacionais e internacionais, apresentados oralmente, como palestras, conferências e sob forma de painéis em encontros científicos ou congressos na área tratada.

GARANTIA DE INDENIZAÇÃO

Há garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

GARANTIA DE RECUSA EM PARTICIPAR DA PESQUISA E/OU RETIRADA DE CONSENTIMENTO

A Sra. não é obrigada a participar da pesquisa, podendo deixar de participar dela em qualquer momento de sua execução, sem que haja penalidades ou prejuízos decorrentes de sua recusa, bem como caso decida retirar seu consentimento.

ESCLARECIMENTOS E DÚVIDAS

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou para relatar algum problema, a Sra. pode contatar a pesquisadora MARIA DA CONCEIÇÃO MACHADO GOMES no telefone (27) 9 9805-6922, e-mail falecomaria@gmail.com, ou endereço Rua Aurora de Aguiar Ferreira, nº 90 Bloco: O Apto: 303 Jardim Camburi Vitória-ES CEP: 29090-310, BRASIL. Tem a garantia de que receberá todas as informações, respostas e esclarecimentos sobre qualquer dúvida à cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados a esta pesquisa. O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES) através do telefone (27) 3335-7211, e-mail cep.ufes@hotmail.com ou correio: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, Prédio Administrativo do CCS, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP 29040-090, Vitória-ES, Brasil. O CEP/CCS/UFES tem a função de analisar os projetos de pesquisa visando a proteção dos participantes dentro de padrões éticos nacionais e internacionais. Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira, de 8 às 14 horas.

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de igual teor, assinada pela pesquisadora principal ou seu representante, rubricada em todas as páginas.

Vitória-ES, _____ de _____ de _____.

Participante da pesquisa

Na qualidade de pesquisadora responsável pela pesquisa "**CITOCINAS DO FLUIDO GENGIVAL E MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE SÍTIOS COM PERIODONTITE EM MULHERES COM E SEM CÂNCER DE MAMA**", declaro ter cumprido as exigências da Resolução CNS 466/12 e CNS 441/2011, as quais estabelecem diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Pesquisador



2- QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA, MÉDICA E ODONTOLÓGICA.

1) Está sobre tratamento médico?

() Sim - Por qual motivo? _____

() Não

2) Está tomando algum medicamento?

() Sim - Qual (is) _____

3) Já esteve hospitalizado?

() Sim – Qual motivo? _____

() Não

4) Já teve ou tem alguma das enfermidades abaixo citadas:

Doença do coração () Sim () Não () Não sei

Hipotensão arterial () Sim () Não () Não sei

Alergia () Sim () Não () Não sei

Asma () Sim () Não () Não sei

Artrite () Sim () Não () Não sei

Doença nos rins () Sim () Não () Não sei

Epilepsia () Sim () Não () Não sei

Diabetes () Sim () Não () Não sei

Sinusite () Sim () Não () Não sei

Hepatite () Sim () Não () Não sei

Sarampo () Sim () Não () Não sei

Gastrite () Sim () Não () Não sei

Tuberculose () Sim () Não () Não sei

É portador do vírus HIV? () Sim () Não () Não sei

Doenças da infância? () Sim () Não () Não sei

Qual (is)? _____

5) Já sofreu algum traumatismo na face () Sim () Não () Não sei

6) É fumante? () Sim () Não () Não sei

7) Faz uso de bebida alcoólica? () Sim () Não () Não sei

8) Você percebe que a sua saúde geral está () Boa () Regular () Ruim () Não sei

9) () Ganhou ou () perdeu peso nos últimos dois anos?

Avaliação do Histórico Odontológico

10) Faz acompanhamento odontológico? () Sim () Não () Não sei

Quantas vezes por ano: _____

Data do último atendimento: _____

Experiências: _____

11) Tratamento anterior () Periodontia () Endodontia () Ortodontia () Protético ()
Restauração () Cirúrgico

Outros: _____

12) Sangramento gengival () Sim () Não () Não sei ()

Quando: _____ () Provocada () Espontânea

13) Sente dor nos dentes ou próximo a eles: () Sim () Não () Não sei

Se sente dor, ela é: () forte () fraca () localizada () difusa

14) Sua gengiva cresceu (aumento gengival)? () Sim () Não () Não sei

15) Sua gengiva diminuiu (recessão gengival) ? () Sim () Não () Não sei

16) Seus dentes estão ou já estiveram moles? () Sim () Não () Não sei

17) Sua gengiva tem ou já teve bolhas (abscessos, fístula) () Sim () Não () Não sei

18) Algum dentista já disse que você tem doença periodontal? () Sim () Não () Não sei

- 19) Dificuldade de mastigação/deglutição () Sim () Não () Não sei
- 20) Dor na ATM? () Sim () Não () Não sei ()
- 21) Aftas recorrentes? () Sim () Não () Não sei ()
- 22) Herpes labial: () Sim () Não () Não sei ()
- 23) Já fez radioterapia? () Sim () Não () Não sei
- 24) Já fez quimioterapia () Sim () Não () Não sei
- 25) Tem outro problema de saúde bucal não relacionado?
-

Avaliação dos Hábitos Comportamentais

- 26) Tem bruxismo _____ Outros _____
- 27) Frequência de escovação por dia: 1 () 2 () 3 () 4 () 5 ()
- 28) Tipo de escova dental: () Macia () Média () Dura () Não sabe
- 29) Faz uso de fio dental: () Sim () Não () As vezes () Nunca
- 30) Faz uso de bochechos?: () Sim, Qual? _____ Frequência: _____
() Não () Não sei
- 31) Consome doce/açúcar? () Sim, Frequência: _____ () Não () Não sei
- 32) Alimentação saudável () Sim () Não () Não sei
- 33) Tem sensação de boca ou lábios ressecados? () Sim () Não () Não sei
- 34) Usa prótese dentária? () Sim () Não () Às vezes () Nunca
- 35) Tipo de higienização da prótese: _____

3. CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo da amostragem foi baseado na disponibilidade de mulheres que se apresentam mensalmente na Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM - UFES). Como o tratamento anti-neoplásico varia de paciente para paciente, dependendo dos tipos de diagnósticos. Para possibilitar uma relação mais segura e realística da casuística, optamos por fazer uma amostragem com relação 1:1, ou seja, para cada caso (mulher com câncer de mama) 1 mulher controle (mulheres sem câncer de mama). Portanto, teremos um grupo de doentes intitulado câncer de mama e um grupo sem doença, ou seja, sem neoplasia maligna de mama. O fator de risco que envolve os pacientes expostos em ambos os grupos é a doença periodontal .

O cálculo amostral foi obtido pela fórmula apresentada por Fleiss (1981, pp. 44-45), seguir:

$$n_1 = \frac{[Z_{\alpha/2}\sqrt{(r+1)\bar{p}\bar{q}} + Z_{1-\beta}\sqrt{rp_1q_1 + p_2q_2}]^2}{r(p_1 - p_2)^2}$$

$$n_2 = rn_1$$

Onde,

n_1 = número de casos;

n_2 = número de controles;

$Z_{\alpha/2}$ = nível alfa de significância bicaudal da distribuição normal padrão;

$Z_{1-\beta}$ = poder do teste da distribuição normal padrão;

r = proporção de controles por casos;

p_1 = proporção de casos expostos e $q_1 = 1 - p_1$;

p_2 = proporção de controles expostos e $q_2 = 1 - p_2$;

$\bar{p} = \frac{p_1 + rp_2}{r+1}$ e $\bar{q} = 1 - \bar{p}$.

a- TAMANHO AMOSTRAL (CENÁRIO 1)

O programa utilizado para a realização do cálculo amostral foi o Epi-info versão 7.0. Os parâmetros utilizados no cálculo foram: a prevalência de periodontite entre os casos de 79.2%, com razão de chances de 3.0, número de controles por caso de 1:1, poder de 80%, nível de confiança de 90%, onde chegou-se ao tamanho de amostra de 50 mulheres em cada grupo, o que resultou em um tamanho de amostra de 100 mulheres.

b- TAMANHO AMOSTRAL (CENÁRIO 2)

Os parâmetros utilizados no cálculo foram: a prevalência de periodontite entre os casos de 79.1%, com razão de chances de 3.1, número de controles por caso de 1:1, poder de 80%, nível de confiança de 90%, onde chegou-se ao tamanho de amostra de 46 mulheres em cada grupo, o que resultou em um tamanho de amostra de 92 mulheres.

c- TAMANHO AMOSTRAL (CENÁRIO 3)

Os parâmetros utilizados no cálculo foram: a prevalência de periodontite entre os casos de 79.1%, com razão de chances de 3.5, número de controles por caso de 1:1, poder de 80%, nível de confiança de 90%, onde chegou-se ao tamanho de amostra de 37 mulheres em cada grupo, o que resultou em um tamanho de amostra de 74 mulheres.

d- TAMANHO AMOSTRAL (CENÁRIO 4)

Os parâmetros utilizados no cálculo foram: a prevalência de periodontite entre os casos de 79.2%, com razão de chances de 3.5, número de controles por caso de 1:1, poder de 80%, nível de confiança de 95%, onde chegou-se ao tamanho de amostra de 47 mulheres em cada grupo, o que resultou em um tamanho de amostra de 94 mulheres.

e- TAMANHO AMOSTRAL (CENÁRIO 5)

Os parâmetros utilizados no cálculo foram: a prevalência de periodontite entre os casos de 75.7%, com razão de chances de 3.5, número de controles por caso de 1:1, poder de 80%, nível de confiança de 95%, onde chegou-se ao tamanho de amostra de 44 mulheres em cada grupo, o que resultou em um tamanho de amostra de 88 mulheres.

f- TAMANHO AMOSTRAL (CENÁRIO 6)

Os parâmetros utilizados no cálculo foram: a prevalência de periodontite entre os casos de 79.2%, com razão de chances de 3.8, número de controles por caso de 1:1, poder de 80%, nível de confiança de 95%, onde chegou-se ao tamanho de amostra de 41 mulheres em cada grupo, o que resultou em um tamanho de amostra de 82 mulheres.

4. COEFICIENTE KAPPA DE COHEN

Esse coeficiente se baseia no número de respostas concordantes, mais precisamente, no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os avaliadores. O coeficiente Kappa é calculado por:

$$K = \frac{K_1 - K_2}{1 - K_2}$$

$$1 - K_2$$

em que, K: proporção observada de concordâncias (soma das respostas concordantes dividida pelo total); K2: proporção esperada de concordâncias (soma dos valores esperados das respostas concordantes dividida pelo total).

FONTE: (WIDMANN, 2020).

5. TABELAS COMPLEMENTARES

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA COBERTURA DO TRATAMENTO NO GRUPO CASO.

		Caso com DP		Caso sem DP	
		n	%	n	%
Quimioterapia	Sim	23	95,83	25	96,15
	Não	1	4,17	1	3,85
Radioterapia	Sim	23	95,83	24	92,31
	Não	1	4,17	2	7,69
Tamoxifeno/Inibidor de Aromatase	Sim	10	41,67	7	26,92
	Não	14	58,33	19	73,08

Fonte: Ambulatório de Ginecologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM - UFES) e o ambulatório 2 do Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES)

5.2 VALORES DE PERDA DENTÁRIA, IPV, ISG, PS, NIC E SS PARA CADA GRUPO (FASE1).

	Controle			Caso			Valor p*	
	Mediana	Média	Desvio padrão	Mediana	Média	Desvio padrão		
Perda dentária	6,0	7,5	5,6	7,0	9,3	7,1	0,226	
IPV	49,0	52,1	35,2	48,5	50,8	25,0	0,792	
ISG	31,0	38,0	33,2	37,0	38,6	25,1	0,478	
PS	=4mm	15,0	17,4	13,3	15,0	19,0	14,0	0,739
	>4mm	3,5	6,0	6,8	5,5	11,8	15,0	0,112
NIC	=4mm	8,5	10,4	7,5	6,0	7,7	7,0	0,044
	>4mm	5,0	8,6	8,5	9,0	14,7	13,6	0,008
SS	52,5	52,7	30,9	56,0	58,7	30,9	0,401	

Fonte: Ambulatório de Ginecologia (HUCAM - UFES) e o ambulatório 2 do (IOUFES).

*Teste de Mann-Whitney; mediana dos parâmetros clínicos entre os grupos/ Significativo se $p < 0,050$.

5.3. VALORES DE PERDA DENTÁRIA, IPV, ISG, PS, NIC E SS PARA CADA GRUPO (FASE 2).

	Controle			Caso			Valor p*	
	Mediana	Média	Desvio padrão	Mediana	Média	Desvio padrão		
Perda dentária	6,0	7,7	6,1	7,0	9,6	7,0	0,174	
IPV	17,0	17,5	7,4	24,0	25,9	11,9	< 0,001	
ISG	40,5	37,3	16,5	72,0	66,6	24,3	< 0,001	
PS	=4mm	12,0	14,0	10,5	28,0	27,5	11,5	< 0,001
	>4mm	2,5	5,1	6,0	10,5	14,6	15,8	< 0,001
NIC	=4mm	7,5	9,9	7,1	8,0	9,4	6,4	0,908
	>4mm	4,0	5,9	5,3	10,5	14,7	14,1	< 0,001
SS	46,0	44,3	26,3	90,5	85,1	30,2	< 0,001	

Fonte: Ambulatório de Ginecologia do (HUCAM - UFES) e o ambulatório 2 do (IOUFES).

*Teste de Mann-Whitney; mediana dos parâmetros clínicos entre os grupos/ Significativo se $p < 0,050$.

5.4. COMPARAÇÃO DA PERDA DENTÁRIA, IPV, ISG, PS, NIC E SS ENTRE OS SUBTIPOS MOLECULARES (FASE 1)

		Sem DP			Valor p	Com DP			Valor p
		Mediana	Média	Desvio padrão		Mediana	Média	Desvio padrão	
Perda dentária	LA	4,0	9,3	10,3	0,671**	5,0	4,8	2,1	0,053**
	LB	8,0	10,9	7,7		4,5	4,2	1,8	
	Subexpressão Her 2	11,5	11,5	10,6		7,0	7,0	0,0	
	Tiipo negativo	2,0	7,7	10,7		10,0	12,3	5,7	
IPV	LA	24,5	30,5	15,9	0,714*	66,5	66,5ab	8,1	0,044*
	LB	38,5	37,3	17,8		83,0	75,8ab	20,9	
	Subexpressão Her 2	31,0	31,0	14,1		100,0	92,7b	15,4	
	Tiipo negativo	27,5	28,3	11,3		61,0	60,2a	17,3	
ISG	LA	19,0	20,2	11,5	0,439*	71,0	76,3	14,1	0,089*
	LB	24,0	29,8	21,1		39,5	44,3	21,7	
	Subexpressão Her 2	10,5	10,5	6,4		75,0	64,7	44,4	
	Tiipo negativo	27,5	27,0	12,8		48,0	44,5	18,1	
PS	LA	-	-	-	-	27,5	28,0	15,3	0,191*
	LB	-	-	-		22,5	23,2	12,2	
	Subexpressão Her 2	-	-	-		26,0	22,7	15,3	
	Tiipo negativo	-	-	-		8,0	12,5	13,0	
>4mm	LA	-	-	-	-	14,0	22,3	26,0	0,439*
	LB	-	-	-		14,0	9,7	7,5	
	Subexpressão Her 2	-	-	-		3,0	3,0	2,8	
	Tiipo negativo	-	-	-		5,0	8,2	5,5	
NIC	LA	3,5	5,7	6,4	0,668**	7,0	14,3	16,3	0,638**
	LB	6,0	7,8	5,9		10,0	9,4	9,1	
	Subexpressão Her 2	12,0	12,0			11,0	8,3	6,4	
	Tiipo negativo	10,0	8,0	6,2		3,5	4,6	3,4	
>4mm	LA	12,5	11,5	5,4	0,767*	16,5	16,8	14,4	0,305*
	LB	8,0	10,4	7,7		13,5	15,3	10,1	
	Subexpressão Her 2	7,0	7,0			6,0	5,3	3,1	
	Tiipo negativo	5,5	5,5	6,4		20,0	24,8	20,3	
SS	LA	11,5	26,3	24,4	0,388*	101,5	100,3b	9,1	0,013*
	LB	35,5	47,6	26,8		99,5	92,3ab	18,0	
	Subexpressão Her 2	36,0	36,0	17,0		73,0	64,3ab	29,0	
	Tiipo negativo	50,0	47,5	26,0		59,0	63,8a	22,4	

IPV – Índice de placa visível; ISG – Índice de sangramento gengival; PS – Profundidade à sondagem; NIC – Nível de inserção clínico; SS – Sangramento à sondagem. LA - Luminal A; LB - Luminal B. * ANOVA para medidas independentes; ab - Letras diferentes indicam diferenças entre as médias (teste de comparações múltiplas de Tukey); **. Teste de Kruskal-Wallis; Significativo se $p < 0,050$. (-) Estatística não computada porque não há PS para sem DP.

5.5 COMPARAÇÃO DA PERDA DENTÁRIA, IPV, ISG, PS, NIC E SS ENTRE OS SUBTIPOS MOLECULARES (FASE 2)

		Sem DP			Valor p*	Com DP			Valor p*
		Mediana	Média	Desvio padrão		Mediana	Média	Desvio padrão	
Perda dentária	LA	4,0	9,3	10,3	0,903	5,0	4,8a	2,1	0,009
	LB	8,5	11,3	7,4		5,5	5,0ab	2,7	
	Subexpressão Her 2	11,5	11,5	10,6		7,0	7,7ab	1,2	
	Triplo negativo	2,0	7,7	10,7		10,0	12,5b	6,0	
IPV	LA	15,5	18,0	9,5	0,915	38,0	38,8	14,9	0,139
	LB	20,5	21,1	10,4		35,0	38,0	9,9	
	Subexpressão Her 2	18,0	18,0	1,4		34,0	31,0	11,8	
	Triplo negativo	17,0	20,8	9,9		29,0	26,8	9,1	
ISG	LA	82,5	67,5	36,8	0,862	77,0	80,5ab	9,1	0,008
	LB	66,0	61,4	28,5		73,5	71,8ab	11,6	
	Subexpressão Her 2	66,0	66,0	43,8		76,0	82,3b	16,4	
	Triplo negativo	91,5	76,5	31,0		61,0	57,1a	13,8	
PS	LA	-	-	-	-	31,5	34,5	7,8	0,141
	LB	-	-	-		35,0	31,0	10,8	
	Subexpressão Her 2	-	-	-		30,0	32,3	12,7	
	Triplo negativo	-	-	-		19,0	21,7	11,1	
PS	LA	-	-	-	-	20,0	31,3	32,1	0,123
	LB	-	-	-		13,5	14,3	8,5	
	Subexpressão Her 2	-	-	-		11,0	8,3	5,5	
	Triplo negativo	-	-	-		9,0	10,5	9,2	
NIC	LA	3,5	5,7	6,4	0,771	13,5	15,8	10,1	0,170
	LB	6,0	8,3	5,8		11,0	13,0	8,4	
	Subexpressão Her 2	11,0	11,0			14,0	12,3	4,7	
	Triplo negativo	6,5	8,3	6,7		8,0	7,9	3,2	
NIC	LA	12,5	11,5	5,4	0,640	18,0	18,3	14,6	0,406
	LB	7,5	9,6	7,9		15,0	16,5	10,6	
	Subexpressão Her 2	7,0	7,0			7,0	6,7	2,5	
	Triplo negativo	2,0	4,7	5,5		14,0	24,8	21,1	
SS	LA	87,5	78,2	43,3	0,731	110,5	110,5b	3,5	0,001
	LB	78,0	74,4	27,5		117,0	116,2b	10,0	
	Subexpressão Her 2	69,5	69,5	38,9		93,0	92,3ab	2,1	
	Triplo negativo	107,0	95,0	38,1		66,0	73,6a	24,8	

IPV – Índice de placa visível; ISG – Índice de sangramento gengival; PS – Profundidade à sondagem; NIC – Nível de inserção clínico; SS – Sangramento à sondagem. LA - Luminal A; LB - Luminal B.*ANOVA para medidas independentes; ab - Letras diferentes indicam diferenças entre as médias (teste de comparações múltiplas de Tukey); **, Teste de Kruskal-Wallis; Significativo se $p < 0,050$. (-) Estatística não computada porque não há PS para sem DP.

6. DISTRIBUIÇÃO DA TRIAGEM DAS PACIENTES NOS GRUPOS

TRIAGEM: GRUPO CASO=108 / CONTROLE=105

Motivo	Pacientes
Atendidas Caso	50
Laudo inconclusivo	31
Co morbidade	02
Ausência de elementos dentários	04
Maiores de 70 anos	08
Já iniciaram tratamento	02
Somente cirurgia	02
Óbitos	05
Outros	13
Cadastro IOUFES- Controle	92
Atendidas - Controle	50

7. CARACTERIZAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPOSTOS OU NÃO Á DP

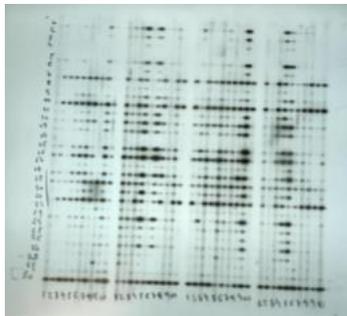


12. FIGURAS COMPLEMENTARES

- 1- Minislot para as preparo e colocação das amostras do biofilme subgingival bacteriano.



- 2- Filme após a revelação manual



Fonte: arquivo LBDP-UnG, Guarulhos-SP.

3- Tomadas radiográficas periapicais nas Fases para avaliação do estágio da periodontite

Grupo 1A



Grupo 2A



Grupo 2A



4- Modelos de Diagnóstico obtidos:

a- Anátomo-patológico

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes
Serviço de Anatomia Patológica

EXAME ANÁTOMO-PATOLÓGICO

REGISTRO DO EXAME: [REDACTED] REGISTRO NO SAME: [REDACTED]
 PACIENTE: [REDACTED] IDADE: [REDACTED]
 SERVIÇO REQUISITANTE: MASTOLOGIA
 MÉDICO(A) REQUISITANTE: Dra. [REDACTED]
 DATA DA REQUISIÇÃO DO EXAME: [REDACTED] DATA DO LAUDO: [REDACTED]

INFORMES CLÍNICOS
Nódulo de mama.

ESPÉCIME E MÉTODOS
Mama esquerda (UQL) / Biópsia por agulha.
Amostra para microscopia: vários fragmentos; 7 blocos; inclusão seletiva.
Método de coloração: H&E.
Número de espécimes: 1.

MACROSCOPIA
Fragmento irregular de tecido, amarelado e oleoso, transfixado por fio metálico. O fragmento mede 4x1,5x1,5cm.

CONCLUSÃO
Carcinoma ductal infiltrante caracterizado por:
Grau de diferenciação (sBR modificado): 3 (Escore Nuclear: 3; Escore Tubular: 3; Escore Mitótico: 2).
Tamanho do tumor: 2,5cm de diâmetro.
Componente intraductal: Presente; do tipo comedo e sólido, de alto grau.
Volume do componente intraductal: Cerca de 20%, em relação a neoplasia invasora.
Infiltrado linfocitário peritumoral: Não foi observado.
Invasão angiolinfática: Não foi observada.
Invasão perineural: Não foi observada.
Margens cirúrgicas: Comprometida pelo componente invasor.

INFORMES CLÍNICOS
Carcinoma ductal infiltrante grau III.

ESPÉCIME E MÉTODOS
Mama esquerda / Mastectomia radical ("Status" biópsia).
Amostra para microscopia: vários fragmentos, 11 blocos, inclusão seletiva.
Método de coloração: H&E
Número de espécimes: 10.

MACROSCOPIA
Mama pesando 319g, medindo 14x9x3,5cm. Elipse de pele medindo 14x5,3cm. Areolo-mamilar medindo 2,5x2,2cm. Superfície de corte tem 1 nódulo na união dos quadrantes laterais medindo 3x1,5cm, espiculado, tingido de azul. Na região retroareolar, lesão cística de conteúdo acastanhado medindo 1cm no maior diâmetro. Tumor dista da margem inferior 1cm.
Da gordura axilar foram dissecados 14 linfonodos, o maior medindo 3x1,5cm. Alguns linfonodos exibem superfície de corte branca, firme e fosca.

CONCLUSÃO
Espécime: Mama esquerda.
Tipo do tumor: Carcinoma mamário invasivo do tipo não especial.
Grau: 3 (Escore Nuclear: 3; Escore Tubular: 3; Escore Mitótico: 2).
Localização do tumor: União dos quadrantes laterais.
Tamanho do tumor: 30x15mm.
Componente "in situ": presente.
Tipo do componente "in situ": cribriforme e sólido.
Grau do componente "in situ": intermediário.
Componente "in situ" extenso: não foi observado.
Microcalcificações: presentes.
Invasão angiolinfática: presente, com linfangite carcinomatosa na pele.
Multifocalidade tumoral: não foi observada.
Multicentricidade tumoral: não foi observada.
Margens de ressecção: livres de comprometimento neoplásico.
Distância Tumor-Margem mais próxima: inferior, 10mm.
Pele: comprometida pela neoplasia.
Areola: livre de comprometimento neoplásico.
Mamilo: livre de comprometimento neoplásico.
Linfonodos axilares: Adenocarcinoma metastático para 2 dos 15 linfonodos isolados, incluído o sentinela com extensão extra-capsular.
Estadiamento: pT2 pN1.

FONTE: Serviço de Anatomia Patológica/HUCAM/UFES.

b- Imunohistoquímico

RELATÓRIO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA EM MAMA		CB	
Paciente:	Idade:	Sexo: Feminino	
História Clínica: Nódulo de mama.		Recebido em	
Material Recebido: Bloco(s) de parafina (2) rotulado(s) como: E xxxxxxxxxx			
Patologista/Médico:		Procedência: Vitória (ES)	
Estudo imuno-histoquímico: Após desparafinação e tratamento dos tecidos com soluções próprias para recuperação de epitopes, os cortes histológicos foram incubados com painel de anticorpos monoclonais e/ou policlonais. A seguir utilizou-se o sistema de detecção baseado em polímero. Controles positivos e negativos foram utilizados para atestar a fidelidade das reações. Resultados individuais para os marcadores estudados estão sumarizados na tabela a seguir. Os resultados especificados dizem respeito às células de interesse no contexto de cada caso.			
Painel de Anticorpos	Clone	Resultado nas céls. neoplásicas	Obs. / Bloco
• Receptor de Estrógeno	EP1	Negativo (controle interno +)	(E. ^{xy} xy)
• Receptor de Progesterona	PgR636	Negativo (controle interno +)	(E. ^{xy} x)
• Produto do oncogene HER2	SP3	Escore 0 (Negativo)	(E. ^{xy} x)
• Ki-67 - Antígeno de proliferação celular	MIB1	Positivo	50% (E. ^{xy} x)
Diagnóstico:			
MAMA ESQUERDA: CARCINOMA INVASIVO NEGATIVO PARA RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA E ESCORE 0 (NEGATIVO) PARA HER2. VER COMENTÁRIO.			
O diagnóstico histológico desta neoplasia está baseado exclusivamente na avaliação do presente material. De acordo com o consenso da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e Colégio Americano de Patologistas (CAP) de 2010, os receptores de estrógeno e de progesterona são considerados positivos quando há expressão nuclear em >= 1% das células neoplásicas, independentemente da intensidade da imunocoloração. A expressão da oncoproteína HER2 apresenta implicação prognóstica e preditiva de resposta ao tratamento com trastuzumabe e regimes quimioterápicos contendo antracíclicos. O consenso da ASCO/CAP de 2013 recomenda o critério apresentado na tabela abaixo para avaliação da expressão da proteína HER2 por imuno-histoquímica. Este ensaio não foi validado para tecidos descalcificados. Nesse tipo de tecido, os resultados devem ser interpretados com cuidado devido a probabilidade da ocorrência de resultados falso-negativos.			

Critérios para interpretação da imunocoloração para HER2

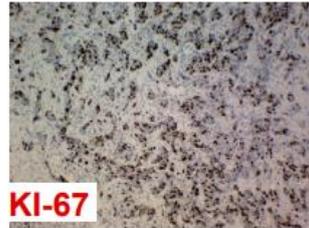
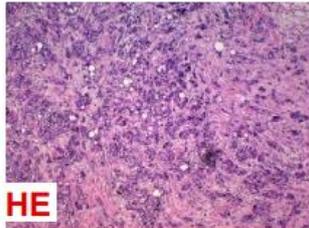
Padrão de coloração	Escore	Conclusão quanto a Hiperexpressão HER2
Ausência de imunocoloração nas células neoplásicas ou Imunocoloração de membrana incompleta e fraca/difícilmente perceptível <= 10% das células tumorais**	0	Negativo
Imunocoloração de membrana incompleta e fraca/difícilmente perceptível em mais de 10 % das células tumorais**	1+	Negativo
Imunocoloração de membrana contínua, incompleta, fraca ou moderada em mais de 10% das células tumorais ou Imunocoloração de membrana completa e intensa <= a 10% das células tumorais*. Esse resultado indica a necessidade de confirmação por FISH	2+	Duvidoso
Imunocoloração de membrana completa e intensa em mais de 10% das células tumorais	3+	Positivo

* Casos que apresentam imunocoloração de membrana completa e intensa em <=10% das células, são considerados 2+ (duvidoso). Porém, isto pode representar heterogeneidade de expressão. Assim, o ideal é a repetição da imunocoloração para HER2 em outra área de carcinoma invasivo.

** Se o resultado do HER2 for negativo na biópsia inicial, repetição do HER2 no material de ressecção pode ser realizado nos seguintes casos: Tumor grau 3 ; Pequena área de tumor invasivo na biópsia; Material de ressecção contendo carcinoma morfológicamente diferente da biópsia; Dúvida sobre condições pré-analíticas da biópsia (incluindo tempo de fixação).

Referências:

1. Wolff AC et al. ASCO/CAP HER2 Testing in Breast Cancer Update. Arch Pathol Lab Med. doi: 10.5858/arpa.2018-0902-SA. 2. Hammond MH et al ASCO/CAP guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Arch Pathol Lab Med—Vol 134, June 2010.



FONTE: Serviço de Anatomia Patológica/HUCAM/UFES.