

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

MARIA DA CONCEIÇÃO MACHADO GOMES

**PERFIL DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL EM MULHERES
COM E SEM CÂNCER DE MAMA**

VITÓRIA

2016

MARIA DA CONCEIÇÃO MACHADO GOMES

**PERFIL DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL EM MULHERES
COM E SEM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabrícia Ferreira Suaid

VITÓRIA

2016

MARIA DA CONCEIÇÃO MACHADO GOMES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Clínica Odontológica.

Aprovada em: ____ de _____ de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Luiz Alberto Sobral Vieira Júnior
Universidade Federal do Espírito Santo

Membro Externo

Profª Drª. Ana Paula Ferreira Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno

Prof.Dr.Fábio Matos Chiarelli
Faculdades Integradas Santa Teresa
Suplente Externo

A ciência é exatamente a construção divina dos acontecimentos e cabe sempre a nós interpretá-la.

Maria da Conceição Machado Gomes

Aos meus pais, Gabriel e Hilda em especial, desde o começo da minha existência, a alma deles me faz um ser melhor cada dia, obrigada meu Deus por eles.

AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso, que nunca me desamparou, provendo-me de sabedoria, saúde e discernimento para errar menos.

Ao meu Orientador, Professor Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa, do Departamento de Clínica Odontológica da UFES, pela paciência, pelo companheirismo e pela honestidade; Professor amigo, que me ensinou ciência e vida, e incentivo constante para buscar mais e para me tornar uma pessoa melhor e uma pesquisadora compromissada com a ciência e com o indivíduo carente de saúde.

À minha Co-orientadora, Professora Dr^a. Fabrícia Ferreira Suaid, pesquisadora visitante do Departamento de Clínica Odontológica e do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da UFES, pelo amadurecimento deste trabalho em sua conclusão além do carinho.

À Professora Dr^a. Roberta Grasselli Batitucci Pinel, pesquisadora visitante do Departamento de Clínica Odontológica e do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da UFES, pelo apoio no treinamento dos parâmetros periodontais e pela atenção durante algumas dúvidas.

Ao Núcleo de Periodontia da UFES (NUPET), por me ter como parceira em suas pesquisas, e mostrando-me que temos muito a fazer.

Aos Professores Dr^a. Magda Feres, Dr^a. Luciene Figueiredo, Dr. Marcelo De Faveri e a todos os demais professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Guarulhos (UnG), Guarulhos, São Paulo, que proporcionaram conhecimentos e experiências durante o convênio UFES/USP/UnG da CAPES nas palestras e seminários desenvolvidos no Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da UFES e pelo apoio em aceitar a realização dos testes microbiológicos do meu projeto.

À Izilvania Maroly Quinderé Barreto, pela oportunidade ao me receber com muito zelo no Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade Guarulhos (UnG) em Guarulhos, São Paulo.

Ao Diretor do Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes (HUCAM), Dr. Luiz Alberto Sobral Vieira Jr., por receber esta pesquisa de forma positiva e formar

futuras interações para o progresso Medicina/Odontologia em pesquisas científicas e sua colaboração para minha qualificação.

A todos os profissionais do Ambulatório de Mastologia do HUCAM e à fisioterapeuta Cristina Oberda, pela disponibilidade e por me ajudar a tornar possível a realização deste estudo.

À Diretora do Hospital Santa Casa de Misericórdia da EMESCAM, Dr^a. Cristiana Gomes e ao Médico Oncologista Dr. Wesley Vargas Moura, por colaborarem na divulgação deste trabalho as suas pacientes.

Ao Professor Dr. Francisco Carlos Ribeiro e à Professora Dr^a. Juliana Machado Barroso Xavier, pela compreensão em todos os momentos pelo uso dos horários da Clínica de Endodontia no projeto: muito obrigada pelo carinho e pela atenção dispensados a mim.

À Professora Dr^a. Ana Paula Ferreira Nunes, do Departamento de Patologia da UFES, pela oportunidade a mim proporcionada de conhecer um pouco mais da Microbiologia e pela sua atenção especial e disponibilidade para o meu exame de qualificação.

A todos os professores de Odontologia da UFES, especialmente do Mestrado em Clínica Odontológica, meu muito obrigado.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, Professora Dr^a. Selva Maria Gonçalves Guerra, obrigada pelo seu apoio constante durante as reuniões com os mestrandos do Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica.

Aos colegas de curso; que todos tenhamos sucesso em nossos sonhos.

A todos os alunos de graduação de Odontologia de UFES, especialmente da Periodontia, e à aluna Ingrid Augusta, além das alunas de Odontologia da FAESA, Thatiany Oliveira e Gabriela Tonon, por me acompanharem nas sessões de coleta e exame periodontal e por mostrarem iniciativa para buscar mais deste aprendizado.

Aos funcionários da UFES e do Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES), pela parceria natural durante estes meus dois anos na realização deste trabalho. Obrigada Edson Carlos Ramos Ricardo, Carlos Alberto Loyola, Regina Salles, Rosilda Torquato, Neide Lima, Solange Soares Loureiro, Deusa Lucinda dos Santos, Cleonis de Oliveira, Tanisnei Ferraz Lucchi, Rosemary dos Santos Pereira, Marcos de Araujo Candido, Tarcísio Carvalho Vieira, Clebson Rodrigues, Gilson Moura;

Aos funcionários do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI), Brunela da Róz, Carla Baroni Cunha, Lorenzo Lyrio Stringari, e ao Professor Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues, pelo apoio no armazenamento das amostras.

Aos colegas do Laboratório LUCCAR, Jairo Oliveira, Afrânio Destéfani, e aos Professores Dr. Marcos César Cunegundes e Dr. Breno Valentin, pelo apoio técnico da parte metodológica da pesquisa.

A todas as pacientes queridas, pois sem elas seria quase impossível este trabalho.

Aos meus pais, Gabriel Gomes Barreto e Hilda Machado Barreto, pelo amor: vocês sempre foram os pioneiros no começo da minha carreira na construção da base de tudo isso, amo muito vocês,

Ao meu amor, marido e companheiro Raphael Belchior dos Santos Barreto, sempre ao meu lado: obrigado querido por acreditar em mim.

RESUMO

As infecções dentárias e a doença periodontal podem agir como fatores de risco para o câncer de mama. Porém, pouco se sabe da composição da microbiota periodontal nos indivíduos com câncer de mama e sua relação com a perda dentária e a infecção periodontal. **OBJETIVO:** Avaliar a condição clínica e microbiológica do biofilme subgingival em mulheres com e sem câncer de mama. **METODOLOGIA:** Estudo caso-controle e amostra ($n=92$) constituída por 62 mulheres com câncer de mama e 30 mulheres sem câncer de mama portadoras de doença periodontal. 92 amostras de biofilme subgingival oriundas do sítio periodontal mais profundo foram avaliados microbiologicamente. O nível de significância adotado foi de 5% e o teste de Mann-Whitney (1947) foi requerido para verificar as diferenças entre as médias dos grupos caso e controle. Para avaliar as correlações entre os complexos de bactérias nos grupos, se utilizou a correlação de Spearman. **RESULTADOS:** Há associação significativa entre câncer de mama e perda de dentes superiores e inferiores ($p=0,002$ /Caso; $p=0,012$ /Controle), da mesma forma que o sangramento à sondagem, porém com significância para o grupo controle ($p=0,003$). Com relação à detecção das espécies bacterianas, *Treponema denticola* foi a espécie prevalente (90,0%) do complexo vermelho no grupo caso, seguido por *Porphyromonas gingivalis* (80%), e, *Tannerella forsythia* (70,0%). Já no complexo laranja, as espécies *Fusobacterium nucleatum* (*sp. polymorphum*), *Fusobacterium nucleatum* (*sp.nucleatum*) e *Prevotella nigrescens* foram as mais prevalentes (98,3%; 91,7% e 90,0%), enquanto que no complexo amarelo, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus oralis* foram as mais prevalentes (95,0%; 95,0%). *P. gingivalis* mostrou uma relação positiva com a perda dentária nos dentes superiores e inferiores com câncer de mama ($p=0,017$; $p=0,038$), o mesmo ocorrendo para *T. denticola* ($p=0,003$; $p=0,008$). O sangramento à sondagem apresentou uma relação positiva e estatisticamente significativa ($p=0,014$) para os dentes superiores no grupo controle. Outras espécies bacterianas mostraram associações estatisticamente significantes no grupo caso: *P. nigrescens* ($p=0,028$), *F. nucleatum* (*sp. polymorphum*) ($p=0,002$), *Campylobacter showae* ($p<0,001$), *F.periodonticum*, *Streptococcus intermedius* ($p=0,013$) e *S. gordonii* ($p<0,001$). O perfil bacteriológico predominante para bactérias (contagem média das cópias de DNA) nas mulheres do grupo controle destacou seis microrganismos e com significância estatística: *T. denticola*, *Parvimonas micras*, *F. nucleatum* (*sp.polimorphum*), *F. nucleatum* (*sp.nucleatum*) e *S. oralis*. **CONCLUSÃO:** A perda dentária na presença das espécies *P. gingivalis* e *T. denticola* associou significativamente com câncer de mama. Além disso, as mulheres com câncer de mama têm 2,1 vezes mais chances de ter perda dos dentes molares inferiores quando não há detecção da espécie *S. intermedius* em comparação ao grupo controle. Já as perdas dos dentes molares superiores na presença desta bactéria aumentam estas chances em 1,2 vezes. O câncer de mama também se associa significativamente com o sangramento gengival na presença da espécie *T.denticola*.

Palavras-chave: Doença periodontal. Câncer de mama. Microbiota subgingival

ABSTRACT

Dental infections and periodontal disease may act as risk factors for breast cancer. However, little is known about the composition of the periodontal microbiota in individuals with breast cancer and its relation to tooth loss and periodontal infection. **OBJECTIVE:** To evaluate the clinical and microbiological condition of the subgingival biofilm in women with and without breast cancer. **METHODS:** Case-control study and sample (n = 92) consisted of 62 women with breast cancer and 30 women without breast cancer suffering from periodontal disease. 92 samples of subgingival biofilm derived from deep periodontal sites were evaluated microbiologically. The significance level was 5% and the Mann-Whitney test (1947) was required to verify the differences between the means of case and control groups. To evaluate the correlation between the complex of bacteria in the groups, we used the Spearman correlation. **RESULTS:** There is a significant association between breast cancer and loss of upper and lower teeth ($p=0.002/\text{Case}$; $p=0.012/\text{control}$), the same as bleeding on probing, but with significance for the control group ($p = 0.003$). With regard to the detection of bacterial species, *Treponema denticola* was the most prevalent species (90.0%) of red complex samples in the case group, followed by *Porphyromonas gingivalis* (80%), and *Tannerella forsythia* (70.0%). In the complex orange, *Fusobacterium nucleatum* species (sp. *polymorphum*), *Fusobacterium nucleatum* (sp. *nucleatum*) *Prevotella nigrescens* and were the most common (98.3%, 91.7% and 90.0%), while in the complex yellow, *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus oralis* were the most prevalent (95.0%; 95.0%). *P. gingivalis* showed a positive relationship with tooth loss in the upper and lower teeth in the group with breast cancer ($p = 0.017$; $p = 0.038$), the same is true for *T. denticola* ($p = 0.003$; $p = 0.008$). Bleeding on probing showed a positive and statistically significant ($p = 0.014$) for the upper teeth in the control group. Other bacterial species showed statistically significant associations in the case group: *P. nigrescens* ($p = 0.028$), *F. nucleatum* (sp. *polymorphum*) ($P = 0.002$), *Campylobacter showae* ($p < 0.001$), *Fusobacterium periodonticum*, *Streptococcus intermedius* ($p = 0.013$) and *Streptococcus gordonii* ($p < 0.001$). The predominant bacterial profile for bacteria (average score of copies of DNA) in women in the control group, highlighted six microorganisms with statistical significance: *T. denticola*, *Parvimonas micra*, *F. nucleatum* (sp. *polimorphum*), *F. nucleatum* (sp. *nucleatum*) and *S. oralis*. **CONCLUSION:** Tooth loss in the presence of the species *P. gingivalis* and *T. denticola* significantly associated with breast cancer. In addition, women with breast cancer are 2.1 times more likely to have loss of the lower molars when there is no detection of *S. intermedius* species compared to the control group. As for the loss of molar teeth higher in the presence of these bacteria increase these odds by 1.2 times. Breast cancer is also associated significantly with gingival bleeding in the presence of *T.denticola* species.

Key words: Periodontal disease. Breast cancer. Subgingival microbiota.

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS - Centro de Ciências da Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucléico

HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

HPE - Hipótese da Placa Específica

HPNE - Hipótese da Placa Não Específica

HPEC - Hipótese da Placa Ecológica

HSPD - Hipótese do Sinergismo Polimicrobiano Disbiose

IC - Intervalo de Confiança

IOUFES - Instituto de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo

IPV - Índice de Placa Visível

ISG- Índice de Sangramento Gengival Marginal

N - Tamanho da amostra

NCI - Nível Clínico de Inserção

PBS - Profundidade de Bolsa à Sondagem

SS - Sangramento à Sondagem

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TR - Taxa de Risco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização das variáveis clínicas nos grupos caso e controle.....	42
Tabela 2 - Associação entre os grupos da PB e NCI Caracterização da PB e NCI.....	43
Tabela 3 - Comparação entre as quantidades de perda dentária, IPV, ISG e SS nos grupos.....	44
Tabela 4 - Caracterização dos complexos bacterianos nos grupos	45
Tabela 5 - Associação entre as espécies bacterianas nos grupos.....	47
Tabela 6 - Comparação entre as quantidades de bactérias em relação a PB, para dentes superiores e inferiores em cada grupo.....	49
Tabela 7-..Comparação entre as quantidades de bactérias em relação ao NIC, para dentes superiores e inferiores em cada grupo.....	50
Tabela 8 - Comparação entre as quantidades de perda dentária, IPV, ISG e SS nos grupos.....	51
Tabela 9 - Quantidade das espécies bacterianas nos grupo caso e controle.....	54
Tabela 10 – Perda dentária dos molares superiores e inferiores no grupo caso e controle.....	56
Tabela 11 – Associação das perdas dentárias nos molares inferiores e superiores de cada bactéria entre os grupos	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1- BIOFILME DENTO BACTERIANO.....	17
2.2- O NOVO MODELO HIPÓTESE DO SINERGISMO POLIMICROBIANO E DISBIOSE.....	21
2.3. ETIOPATOGENIA DA DOENÇA PERIODONTAL.....	25
2.4. A RELAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL COM CÂNCER	28
3. OBJETIVOS.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. AMOSTRA.....	34
4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	34
4.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	35
4.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	35
4.5. QUESTIONÁRIO ANAMNÉSICO MÉDICO-ODONTOLÓGICO.....	35
4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
4.7. EXAME PERIODONTAL.....	36
4.8. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	37.
4.8.1. COLETA DAS AMOSTRAS DO BIOFILME SUBGENGIVAL.....	37
4.8.2. HIBRIDIZAÇÃO CHECKERBOARD.....	37
4.8.3. HIBRIDIZAÇÃO DAS MEMBRANAS COM AS SONDAS DE DNA.....	38
4.8.4. DETECÇÃO DAS ESPÉCIES.....	39
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4.9.1. Metodologia.....	40
5. RESULTADOS.....	41
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma infecção que envolve as estruturas de proteção e suporte do periodonto, classicamente definidas como gengivite e periodontite (CARRANZA JR; NEWMAN, 2007) e possui resposta imune inflamatória contra micro-organismos presentes no biofilme dento-bacterianos. É conhecida como uma das patologias bucais mais frequentes em toda população (FLEMING, 1999; LY et al., 2014).

O corpo humano contém dez vezes mais células bacterianas do que células humanas (TURNBAUGH et al., 2007) e centenas de vezes mais genes bacterianos do que genes humanos (YANG et al., 2009). Este microbioma tem uma influência significativa sobre o bem-estar físico e mental do hospedeiro (WIKOFF et al., 2009; ARCHAMBAUD et al., 2013) e essas interações com o hospedeiro podem estabelecer saúde e doença. A cavidade bucal é um ambiente úmido e rico nutricionalmente, com temperatura em torno de 35/36°C e pH entre 6,75 a 7,25 (MARSH, 2003; ALMEIDA et al., 2002), condições essas consideradas ótimas para o crescimento de muitas bactérias que podem formar biofilmes; uma estrutura polimicrobiana sobre as superfícies bucais (JENKINSON; LAPPIN-SCOTT, 2001).

O biofilme dento-bacteriano é uma comunidade microbiana embebida em substâncias da matriz extracelular (DONLAN; COSTERTON, 2002), onde os micro-organismos se aderem com concentrações microbianas que podem atingir entre 10^{11} e 10^{12} unidades formadoras de colônias por mililitro (KHULLER, 2009). Esse biofilme incorpora mais de 700 espécies bacterianas e possui métodos distintos de adesão à superfície dentária (AAS et al., 2005), ou seja, apenas 20% a 25% do ambiente oral é de superfície dentária e as superfícies das mucosas são importantes nichos para os biofilmes microbianos periodontais (KERR et al., 1991). Assim, os patógenos periodontais são essenciais, mas sozinhos são insuficientes para causar doença, porém a suscetibilidade do hospedeiro e seus fatores etiológicos primários são determinantes. O biofilme dento-bacteriano não pode ser eliminado totalmente; entretanto, sua natureza patogênica pode ser reduzida por meio da identificação dos eventos biológicos microbianos (carga microbiana total e diferentes técnicas de isolamento de patógenos do biofilme dento-bacteriano) e na manutenção da microbiota normal com métodos de higiene oral adequados, que incluem escovação,

uso do fio dental e bochechos com antimicrobianos. Isso previne o impacto das doenças periodontais sobre doenças sistêmicas específicas (KHULLER, 2009).

Theilade (1966) verificou que patógenos eram bactérias indígenas encontradas na saúde periodontal destacando, assim, o surgimento da Hipótese da Placa Não-Específica, a HPNE, com foco nas doenças periodontais. Portanto, nesta última hipótese foi estabelecido que toda bactéria na placa dental contribui para virulência da microbiota bucal seja na colonização, seja na evasão do mecanismo de defesa, e/ou promovendo a inflamação e destruição tecidual. Loesche (1976) reconheceu a importância do ecossistema da placa dental e propôs uma hipótese intitulada Hipótese da Placa Específica (HPE) a qual estabelece que apenas certos micro-organismos dentro da placa dental são patogênicos e essa patogenicidade depende do crescimento ou da seleção de micro-organismos mais virulentos. As primeiras evidências da HPE foram estudos sobre a etiologia microbiana da gengivite (LÖE et al., 1965; THEILADE et al., 1966) e da periodontite (LINDHE et al., 1973). Mais tarde, Marsh (1994) propôs uma hipótese que combinou os conceitos-chave da HPE e instituiu a Hipótese da Placa Ecológica (HPEC), afirmando que a doença é resultado de um desequilíbrio na microbiota total devido ao estresse ecológico, com aumento de alguns patógenos orais ou micro-organismos relacionados à doença. Depois de reconhecer que os colonizadores primários da placa dental são predominantemente micro-organismos gram-positivos, e, posteriormente, gram-negativos, Socransky et al. (1998) definiram as bactérias dentro da microbiota subgengival, colocando-as em cinco complexos, culminando assim com a Hipótese dos Complexos Microbianos (HCM). Esse conceito enfatizou que certos complexos bacterianos estavam associados a saúde ou doença, com destaque para o complexo vermelho, encontrado principalmente em bolsas periodontais profundas e com sangramento à sondagem (Socransky et al., 1998; Socransky; Haffaje, 2002). Já o conceito de espécies bacterianas-chave, ou seja, Hipótese do Patógeno Chave (HPC) baseia-se nos estudos básicos de ecologia, indicando que certos patógenos em baixas concentrações podem causar doenças inflamatórias pelo aumento da quantidade de micro-organismos da microbiota normal e pela alteração na sua composição (HAJISHENGALLIS et al., 2012). Finalmente, hoje, com os recentes avanços dos estudos sobre a comunidade microbiana na doença periodontal, a Hipótese do Sinergismo Polimicrobiano e

Disbiose (HSPD) (Hajishengallis; LAMONT, 2012) discute que o modelo de patogênese da periodontite é iniciado por uma microbiota disbiótica e sinérgica, uma oposição à visão tradicional do conceito de doença infecciosa causada por uma única espécie bacteriana ou mesmo por alguns periopatógenos seletos, tais como, os micro-organismos do complexo vermelho.

Estudos recentes têm mostrado a relação entre doença periodontal e câncer, possivelmente devido a aspectos crônicos da inflamação da doença periodontal, e que a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, por ser carcinogênica, pode inibir a apoptose das células epiteliais, um mecanismo intrínseco de proteção das células cancerígenas. A taxa de prevalência de bactérias periodontais em indivíduos com câncer pode estar associada à saúde do paciente, existência de qualquer condição oral patogênica, tempo de quimioterapia, estágio da doença, cirurgia, tipo de câncer, idade do paciente e uso prévio ou atual de antibioticoterapia. Por sua vez, o microrganismo *P. gingivalis*, um marcador de maior atividade das bactérias nas doenças periodontais invasivas, é o patógeno periodontal possivelmente correlacionado com maior risco de câncer de pâncreas (SAYEHMIRI, 2015).

Portanto, este estudo tem como objetivo central conhecer o perfil da microbiota das bolsas periodontais de mulheres com câncer de mama submetidas às terapias antineoplásica e sem câncer de mama portadoras de doença periodontal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. BIOFILME DENTO-BACTERIANO

As literaturas entendem biofilme dento-bacteriano como um subconjunto de espécies bacterianas instaladas na cavidade bucal com potencial de crescimento demasiado, expondo novas propriedades que conduzem à destruição do periodonto e outras espécies microbianas que continuam a colonizar a região periodontal. São compostos de microcolônias de células de origem bacteriana (15-20% por volume) capazes de ocorrerem sob diferentes formas regidas por forças de cisalhamento, devido à passagem do fluido sobre o biofilme (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1997).

As bactérias colonizam os tecidos moles, as bochechas e a língua, a margem gengival e suas regiões subgengival e supragengival. Estima-se que cerca de 400 espécies diferentes são capazes de colonizar a cavidade bucal, e qualquer indivíduo pode abrigar 150 ou mais tipos de espécies ao longo da vida. Está estabelecido que os microrganismos que colonizam uma superfície relativamente estável como o dente estão continuamente nas vizinhanças entre os tecidos moles do periodonto, e fatores como as enzimas proteolíticas e o pH podem afetar o desempenho de mecanismos de defesa do hospedeiro. As espécies de bactérias podem ter características inerentes, tornando-as independentes, o que dificulta as tentativas de denominá-las, como, por exemplo, os patógenos ou comensais. Por isso, conhecer suas distinções é importante, principalmente no que concerne ao combate de doenças, que estabelecem a ação das bactérias e envolvem interações com o micro-organismo e o hospedeiro. Nesse caso, a doença periodontal humana, implica uma variedade específica de microrganismos (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994).

Atualmente, a etiologia da doença periodontal está baseada na hipótese dos Complexos Microbianos de Socransky, que descreve cinco complexos microbianos presentes na placa subgengival de indivíduos adultos (Figura 1) (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002). Estes complexos foram didaticamente distribuídos em cores: os complexos amarelo, azul, verde e violeta são constituídos por bactérias que aderem à superfície dentária, constituindo a base da pirâmide do biofilme dento-bacteriano. Essas bactérias são denominadas de colonizadores

primários e não se relacionam com a doença, sendo muitas delas consideradas benéficas. Dentre essas espécies, estão os *Streptococcus*, que constituem 47% a 82% dos colonizadores primários.

No complexo amarelo, as espécies predominantes são *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*. As espécies de *Actinomyces* constituem o complexo azul, enquanto as bactérias *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus* pertencem ao complexo violeta. O complexo verde é constituído pelas espécies *Capnocytophaga ochraceae*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis* e o sorotipo “a” de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (este sorotipo é associado, nos EUA, com a periodontite do adulto, enquanto o sorotipo “b” é relacionado com a periodontite agressiva). Esses complexos basais fornecem receptores e nutrientes, criando condições ecológicas para a agregação das bactérias do complexo laranja, ou seja, *Streptococcus constellatus*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* (sp. *nucleatum*), *Fusobacterium nucleatum* (sp. *vincentii*), *Fusobacterium nucleatum* (sp. *polymorphum*), *Fusobacterium periodonticum*, e *Eubacterium nodatum*, as quais possuem papéis na patogênese das doenças periodontais. Além disso, este complexo precede e cria condições para a instalação do complexo vermelho (ápice da pirâmide), que é formado pelas espécies de *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, considerados microrganismos predominantes e responsáveis pela etiologia da periodontite crônica, além de possuírem íntima relação com bolsas periodontais e com sangramento (TREVIZANI FILHO; SANI NETO, 2002).

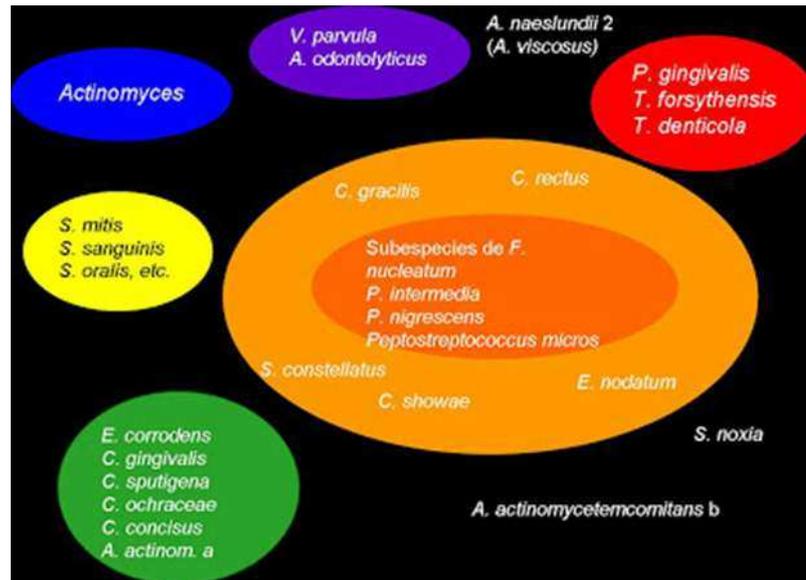


Figura 1 - Complexos Microbianos de Socransky.
Fonte: Socransky et al. (1997).

Com o objetivo de delimitar o perfil microbiano de um número maior de origem clínica para quantificar associações bacterianas nas condições de saúde e doenças bucais, em 1994, um método de detecção de DNA bacteriano de placa dento-bacteriana foi introduzido: a hibridização de até 45 amostras de DNA contra 30 sondas de DNA 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. Embora tenha um uso potencial para a utilização da hibridização *checkerboard* como uma ferramenta de diagnóstico, este método tem sido usado mais rotineiramente para fins de investigação.

Muitas publicações têm relatado a técnica de hibridização *checkerboard* de sondas DNA genômico para estudar os papéis das bactérias na saúde e nas doenças bucais. Em um artigo de destaque, Socransky et al. (1994) analisaram 185 indivíduos, representando cerca de 13.000 amostras de placa, por meio de sondas de DNA genômico inteiros para 40 espécies bacterianas cultiváveis em ensaios de

hibridização *checkerboard* para definir complexos bacterianos, em vez de espécies individuais, que estavam envolvidos na saúde bucal e doença periodontal. Recentemente, a hibridização *checkerboard* tem sido usada também para a quantificação de múltiplos mediadores inflamatórios em amostras do fluido crevicular gengival. Por sua vez, a captura reversa da hibridização *checkerboard* é utilizada para determinar o papel das bactérias na saúde e na doença bucal, incluindo cáries da dentição decídua e permanente, periodontite ulcerativa necrosante e doença periodontal associada com indivíduos HIV soropositivos. A vantagem do método de captura reversa consiste no fato de que as espécies que apenas foram identificadas como filotipos rRNA 16S, ou seja, as não cultiváveis, podem ser monitoradas com a mesma facilidade das espécies cultiváveis conhecidas (PASTER; DEWHIRST, 2009).

A doença periodontal representa o conjunto de condições inflamatórias dos tecidos de sustentação dos dentes que é causada por microrganismos bacterianos específicos. Nesse contexto, a etiologia das infecções periodontais trouxe para a esfera do conhecimento grandes avanços nas últimas décadas. A associação de patógenos bacterianos específicos iniciou-se nos anos 1960 e nos anos 1970 houve o aprimoramento das técnicas de identificação dos microrganismos periodontais nos anos 1970, destacando os grupos patogênicos específicos presentes na doença periodontal. Na década de 1990, a aplicabilidade das abordagens moleculares avançou mais o processo, apontando para a diversidade bacteriana no periodonto já identificada anteriormente (CARRANZA; NEWMAN; TAKEI, 2004).

Cada microrganismo identificado como um agente patogênico humano possui o potencial para existir em qualquer fenótipo ou biofilme, como na interface do dente e a cavidade dentinária preenchida com material restaurador, cateteres e válvulas cardíacas protéticas. A composição física, o grau e a organização de múltiplas espécies que caracterizam a concentração do micro-organismo podem aproximar-se de 10^{11} ou 10^{12} unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml). Nessa fase, novos antígenos podem ser expressados, ocorrendo grandes trocas genéticas e transportes de membranas (KHULLER, 2009).

O modelo sobre a progressão da doença via cavidade bucal emergiu ao longo do tempo. Os pesquisadores não conseguiram identificar bactérias relacionadas à

doença devido a falta de conhecimento e ou limitação de técnicas avançadas, levando à "Hipótese da placa não-específica" (HPNE) ou a ideia de que o somente o armazenamento da microbiota de placa bacteriana foi responsável pela doença sem especificar os níveis de virulência de cada bactéria neste microbiota (THEILADE, 1976). Mais adiante, ocorreu evolução das técnicas para analisar de forma mais criteriosa as mudanças no processo saúde e doença. A segunda hipótese comum foi a Hipótese da Placa Específica (HPE) que propôs que apenas algumas espécies da microbiota ou parte delas estão ativamente envolvidas no desenvolvimento da doença (LOESCHE, 1986). Logo após, outra hipótese foi preconizada pela combinação do conjunto das Hipóteses citadas anteriormente e intitulada como a "Hipótese da Plaque Ecológica" (HPE), que expressa ser a doença o resultado de um desequilíbrio na microbiota como consequência do stress ecológico levando a um grande e considerável crescimento de certos microrganismos relacionados com o processo de desenvolvimento da patogenia (MARSH, 1994). Para finalizar a corrente sobre a determinação e conceito das hipóteses, a "Hipótese do Patógeno Chave" relatada recentemente, propôs que a microbiota com pouca quantidade de agentes patogênicos específicos pode ser o fator etiológico da progressão da doença inflamatória através das alterações com o sistema imune do hospedeiro e remodelação e organização da microbiota (HAJISHENGALLIS ET AL., 2012). Esses achados descritos em torno destas diferentes hipóteses conduzem a continuação de testes para sua aplicabilidade atual visando compreender as vias prováveis da origem das doenças bucais.

2.2. O NOVO MODELO HIPÓTESE DO SINERGISMO POLIMICROBIANO E DISBIOSE

A espécie *P. gingivalis* na placa dento-bacteriana associada à periodontite foi detectada em estudos bacteriológicos iniciais, mas não foi considerada uma indutora potente da inflamação por si só pelo fato de apresentar um paradoxo aparente que não poderia ser facilmente conciliado com seu papel pró-ativo em uma doença inflamatória e poder invadir e sobreviver dentro das células epiteliais gengivais. Efeitos da bactéria *P. gingivalis* são provavelmente exercidos via tanto modulação hospedeira como sinergismo bacteriano. Como modulação hospedeira

pode transitoriamente inibir a indução da interleucina 8 (IL-8), que poderia atrasar o recrutamento de neutrófilos e assim facilitar sua colonização inicial, além de promover a adequação de outro organismo. Um aumento significativo da carga microbiana total foi também observado em indivíduos com periodontite em comparação com pessoas sem periodontite, sem, entretanto, haver uma abordagem concernente à relação causal da presença de *P. gingivalis* ou de outras bactérias na qualidade de agentes patogênicos-chave.

Tendo um papel preponderante como patógeno, *P. gingivalis* é um constituinte de menor quantidade de biofilmes associados à periodontite, apesar de sua alta prevalência e de sua associação à perda óssea progressiva em pacientes com periodontite. Esse patógeno ainda induz o fenótipo anti-apoptótico em células hospedeiras e regula negativamente a expressão de componentes bacterianos pró-inflamatórios, além de também prejudicar a imunidade inata, aumentando o crescimento e alterando a composição da microbiota periodontal (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2012). A espécie *P. gingivalis*, em níveis baixos de colonização, remodelou uma comunidade simbiótica em um estado disbiótico, desencadeando a perda óssea inflamatória. No entanto, causou periodontite na ausência de espécies bacterianas comensais (HAJISHENGALLIS et al., 2011).

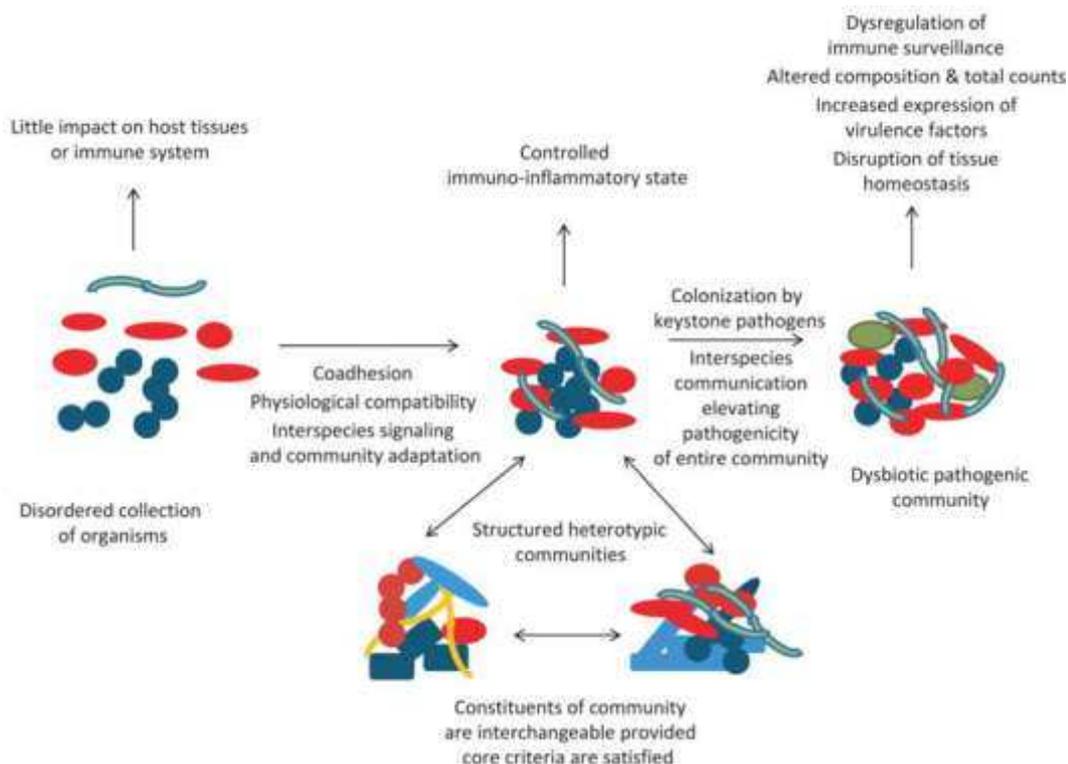


Figura 2 - Sinergismo e Disbiose polimicrobiano na doença periodontal.
Fonte: Hajishengallis e Lamont (2012).

A subversão de leucócitos recrutados por *P. gingivalis* provavelmente facilita a quebra da homeostase dos tecidos, por sua vez, pode permitir a outros membros da comunidade provocar inflamação destrutiva. Tal resposta do hospedeiro, além do seu impacto negativo sobre a integridade do periodonto, leva à ruptura de produtos teciduais que atendem às necessidades nutricionais da comunidade em geral. Por conseguinte, a transição para uma microbiota, provocando doença, pode ser estabilizada. Inversamente, as espécies que não podem crescer sob condições ambientais inflamatórias ou para as quais a inflamação de acolhimento é prejudicial, podem ser suplantadas ou eliminadas. A perturbação da homeostase do tecido seguido por disbiose também pode ser causada por defeitos reguladores do hospedeiro na ausência de um agente patogênico chave. Assim, a periodontite pode ser iniciada na ausência de bactérias pertencentes ao “Complexo Vermelho” ou atuando como patógenos-chave, podendo ser detectada em baixos níveis em indivíduos periodontalmente saudáveis, ressaltando que sua presença nem sempre leva à periodontite. Sendo assim, o organismo pode ser um agente patogênico em alguns casos e comensais em outros. Várias explicações não são exclusivas e

podem envolver a variabilidade no estado do hospedeiro ou da bactéria. Dessa forma, é possível haver indivíduos que tanto podem resistir ou tolerar a conversão da microbiota periodontal de um estado simbiótico para um disbiótico, em virtude do seu estado imuno-inflamatório intrínseco. Outro fator preponderante concernente à *P. gingivalis* é a diversidade de cêpas e virulências dentro da estrutura da população de bactérias *P. gingivalis*, o que pode afetar a sua capacidade para atuar como um agente patogênico-chave. Adicionalmente, mudanças ambientais locais podem influenciar na capacidade da *P. gingivalis* interromper a homeostase das bactérias hospedeiras. Existem condições em que a *P. gingivalis* não pode atuar como um agente patogênico, mas se comportar como um comensal. É cada vez mais evidente, portanto, que a virulência dos organismos patogênicos periodontais, como *P. gingivalis*, adquire importância apenas no contexto de uma comunidade microbiana sinérgica, que é necessária para a expressão de patogenicidade. Essas comunidades mistas proporcionam oportunidades para interações competitivas entre si e tais interações moldam a natureza e função de toda essa organização. Dessa maneira, as comunidades de bactérias podem apresentar sinergia polimicrobiana, definida como um aumento na capacidade de uma bactéria para colonizar e persistir ou elevar os sintomas da doença, quando na presença de outras bactérias. Na verdade, existem inúmeros exemplos de infecções mistas na via oral com organismos que exibem patogenicidade aumentada em comparação com qualquer organismo sozinho. E ainda organismos associados podem compilar um conjunto de enzimas comum para degradar substratos complexos sequencialmente em componentes que podem ser metabolizados pelos membros individuais da comunidade. A introdução de *P. gingivalis* em um biofilme saudável altera o padrão de expressão do gene da comunidade microbiana, sugerindo que esse patógeno-chave poderia adicionalmente modular a microbiota bucal comensal, já que uma comunidade diferenciada com *S. gordonii*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis* expressa cerca de 500 proteínas, indicando que o organismo sofre profundas mudanças fenotípicas em resposta às espécies bucais comuns. Assim, o sinergismo polimicrobiano entre os patógenos periodontais se estende para além do efeito da taxa de crescimento e envolve interações e sinalizações interespecies. Além disso, os mecanismos moleculares que estão na base da sinergia polimicrobiana de bactérias orais revelam sistemas de comunicação hierárquicos, temporalmente distintas, podendo os organismos, por eles, integrar múltiplos sinais de várias formas

e função durante o processo de comunidade heterotípica de desenvolvimento. Ademais, bactérias bucais podem se comunicar através de sistemas dependentes de curto contato e variar sinais difusíveis, incluindo produtos metabólicos e autoindutores, e todos eles influenciar o potencial patogênico. A patogenicidade periodontal exige a cooperação significativa entre espécies. Os avanços recentes discutidos acima são consistentes com um novo modelo de patogênese na qual a periodontite é iniciada por uma ampla microbiota disbiótica e sinérgica, contrariando a visão tradicional de uma doença infecciosa convencional causada por um único ou mesmo vários patógenos do periodonto selecionados, como "complexo vermelho", complementa as hipóteses anteriores de patógenos não específico, específico, ecológico e por fim esta hipótese do sinergismo microbiano e disbiose Na bactéria periodontal, diversos ecossistemas podem ser capazes de cumprir papéis distintos que convergem para formar e estabilizar uma microbiota provocando doença. Esses organismos se envolvem em uma comunicação bidirecional com a comunidade habitante, em especial os agentes patogênicos acessórios, tanto para interromper ou hospedar a vigilância imunológica e elevar a patogenicidade de todo o grupo. Esse papel mais disbiótico especializado vai ser restringido a poucos organismos. A identificação dos patógenos-chave e acessórios a partir do conjunto de organismos gerados pelo microbioma irá apresentar o próximo grande desafio na pesquisa da doença periodontal e, talvez, em outras doenças inflamatórias com etiologia polimicrobiana complexa. Além disso, em um nível de profundidade de compreensão da patogênese da doença periodontal na base do modelo HPSD, pode oferecer novos alvos de intervenção terapêutica (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2012).

2.3. ETIOPATOGENESE DA DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal representa o conjunto de condições inflamatórias dos tecidos de sustentação dos dentes causada por micro-organismos bacterianos específicos. Nesse contexto, a etiologia das infecções periodontais trouxe para a esfera do conhecimento grandes avanços nas últimas décadas. A associação de patógenos bacterianos específicos aconteceu em início dos anos 1960 e 1970 com o aprimoramento das técnicas de identificação dos micro-organismos periodontais, destacando-se os grupos patogênicos específicos presentes na doença periodontal. Na década de 1990, a aplicabilidade das abordagens moleculares avançou mais o

processo, ressaltando-se a diversidade bacteriana no periodonto já identificadas anteriormente (CARRANZA; NEWMAN; TAKEI, 2004).

Recentemente, estudos mostram que a prevalência de bactérias orais marcadoras de infecção periodontal foi pesquisada em diferentes populações, em condições de saúde e doença periodontal. Nesse sentido, Tanner et al. (2002) e Yang et al. (2002) pesquisaram tais supostos patógenos periodontais em amostras de placa do sulco gengival, na superfície dentária e no dorso de língua em crianças e encontraram inúmeros indivíduos com níveis surpreendentes de colonizações por *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans*, na ausência de doença periodontal.

Os estudos de McClellan et al. (1996), Kononem, 1993, Kamma et al. (2000) e Lamell et al. (2000) relatam a ocorrência de colonização desses patógenos periodontais em bebês, crianças, adolescentes e adultos com estado clínico periodontal saudável. O que se observou nesses estudos, então, foi uma característica de isolamento dessas espécies não frequentes obtida por métodos de cultivo diferentemente da observada por métodos moleculares dessas mesmas espécies periodontais, devido, em parte, à sensibilidade do método molecular, e, em parte, à variabilidade regional e racial da prevalência e do nível de colonização desses patógenos (SANZ et al., 2000; ALI et al., 1994; HAFFAJEE et al., 2004; LOPEZ et al., 2004).

Nesta mesma linha de pesquisa, algumas investigações examinaram a prevalência de periodontopatógenos e sua relação com o estado clínico periodontal em amostras populacionais de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Griffen et al. (1998) examinaram uma amostra de conveniência recrutada em uma clínica de universidade e puderam constatar que 79% dos indivíduos doentes e 25% saudáveis eram positivos para *P. gingivalis*. Por outro lado, no grupo com periodonto sadio, a prevalência de *P. gingivalis* variou substancialmente em relação à raça-etnia, com valores de 22% em brancos, 53% em negros e 60% em asiáticos. Ainda neste sentido, Papapanou et al. (2002) relataram alta prevalência dos patógenos periodontais, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *Treponema denticola* em pacientes com periodontite, 95%, 83%, 97%, e 93%, respectivamente, mas nos indivíduos periodontalmente saudáveis, taxas semelhantemente altas foram

encontradas, – 82%, 90%, 82%, e 94%, respectivamente. Por sua vez, o nível da carga bacteriana apresentou colonização substancialmente diferente (ou seja, com contagem média maior ou igual a 10⁵ células bacterianas por amostra de placa) nos indivíduos.

Nos pacientes com periodontite e sem periodontite foram identificadas taxas de colonização bem diferentes em três das quatro espécies, ou seja: 19% versus 3% para *P. gingivalis*, 54% versus 12% para *T. forsythia* e 46% versus 19% para *T. denticola*. Com relação ao patógeno *A. actinomycetemcomitans*, foi constatada uma taxa bem menor (1%), mas similar foi encontrada nos indivíduos com periodontite e sem periodontite, diferentemente do estudo de Hamlet et al. (2001), que detectaram taxas de 23% para *A. actinomycetemcomitans* e de 15% para *P. gingivalis* em funcionários de uma universidade australiana.

Em populações asiáticas, patógenos periodontais foram investigados por Timmerman et al. (1998) em uma população rural de adolescentes da Indonésia, sendo detectado *P. gingivalis* em 87% e *A. actinomycetemcomitans* em 57% dos indivíduos com doença periodontal. Já Mombelli et al. (1998), examinando trabalhadores chineses jovens, detectaram *A. actinomycetemcomitans* em 62% e *P. gingivalis* em 55% dos indivíduos com doença periodontal, ao contrário de Papapanou et al. (1997) e Papapanou et al. (2002), que constataram altos níveis de *P. gingivalis* e *T. forsythia* em indivíduos chineses e tailandeses da zona rural também com doença periodontal. Os autores também detectaram *A. actinomycetemcomitans* nesses mesmos indivíduos, que tinham taxas de colonização de 83% e 93%, respectivamente. Além disso, verificou-se nos estudos de Papapanou et al. (1997, 2002) uma correlação entre o nível de carga bacteriana e a condição clínica periodontal, ou seja, os indivíduos com periodontite apresentaram mais chances de encontrar os periodontopatógenos *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* em bolsas periodontais igual ou maior que 5,0mm e com significância estatística. Essa situação de colonização bacteriana também foi apontada por Socransky et al. (1998), quando verificaram que a presença de três ou mais sítios periodontais com bolsas periodontais maior ou igual a 5,0mm e com diferentes níveis de perda de inserção em indivíduos com a doença periodontal revelou chances significantes para as bactérias do complexo vermelho.

De modo semelhante, estudos longitudinais em populações não tratadas têm suportado a relação entre níveis de colonização por bactérias periodontais específicas e progressão da doença periodontal. No estudo de Papapanou et al. (1997), a carga bacteriana subgengival correlacionou-se com a progressão da periodontite num período precedente de 10 anos. Mais ainda, os perfis bacterianos mostraram uma relação positiva com 75% dos indivíduos que tinham 10 ou mais sítios periodontais com perda de inserção longitudinal maior ou igual a 3,0mm e com 85% daqueles que permaneceram estáveis durante o período de observação. A progressão da doença periodontal também foi relacionada à presença do patógeno *A. actinomycetemcomitans* em um estudo de sete anos em adolescentes indonésios conduzido por Timmerman et al. (2001) e em um acompanhamento subsequente de 15 anos do mesmo grupo (VAN DER VELDEN et al., 2006). Entretanto, Machtei et al. (1999) relataram que indivíduos colonizados por *T. forsythia* no início da doença periodontal exibiram maior perda óssea alveolar, um maior percentual de sítios com perda tecidual e perda dentária duas vezes maior do que indivíduos não colonizados, enquanto Hamlet et al. (2004) relataram uma maior chance de perda de inserção em adolescentes quando foram colonizados por *T. forsythia*.

2.4. A RELAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL COM O CÂNCER

De acordo com Khajuria e Metgud (2015), o câncer oral é a neoplasia mais comum, estando em sexto lugar como o tumor maligno mais frequente, com taxa de crescimento de 40% nos países desenvolvidos.

A doença periodontal tem sido associada a muitas doenças sistêmicas, e recentemente há uma ligação positiva entre ela e várias formas de câncer, como o esofágico, gástrico, do pulmão, da próstata, da mama, os hematológicos, entre outros. Segundo Fitzpatrick e Katz (2009), existem consistências para o aumento de risco de câncer oral e esofágico com a doença periodontal, sendo a inflamação um fator importante, tanto para a doença periodontal como para o câncer. Além disso, têm sido observadas variações da microbiota salivar nos pacientes com câncer de pâncreas e pancreatite crônica, as quais fornecem também a prova da microbiota salivar como uma fonte para a descoberta de biomarcadores não-invasivos de doenças sistêmicas (FARREL et al., 2015).

As populações microbianas na mucosa bucal diferem entre locais saudáveis e não saudáveis, e certas espécies de bactérias orais têm sido associadas com doenças malignas. Os microrganismos orais inevitavelmente sobrerregulam citocinas e outros mediadores inflamatórios que afetam as vias metabólicas, podendo estes estar envolvidos na carcinogênese. Cabe aqui mencionar as alterações causadas pelo tratamento de câncer sobre a microbiota oral, o que pode conduzir ao aparecimento de agentes patogênicos potenciais e outros problemas de saúde sistêmica (MEURMAN, 2010). A idéia de que a infecção bacteriana possa contribuir para o câncer tem como exemplo a espécie *Helicobacter pylori* como um agente causador do câncer gástrico, passando a ser reconhecido oficialmente como a primeira espécie bacteriana a causar essa doença.

A mais provável associação de carcinogênese e bactéria oral é com o carcinoma oral de células escamosas, apresentando em sua superfície grandes níveis de *P. gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, se comparado com a superfície da mucosa oral sadia. É igualmente plausível que a não detecção precoce das lesões cancerígenas e pré-cancerígenas facilita a colonização e o crescimento da bactéria oral, o que pode levar a existência de um papel etiológico. De acordo com Whitmore e Lamont (2014), a inflamação desregulada e crônica tem sido considerada um fator contribuinte para o desenvolvimento do tumor. Outro fator importante é o metabolismo de substâncias potencialmente cancerígenas por bactérias relevantes na cavidade oral, sendo a microbiota pré-existente local uma facilitadora da tumorigênese.

Estudos realizados sobre os biofilmes na superfície oral de pacientes com carcinoma oral de células escamosas também sugeriram um aumento de *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Actinomyces* e *Clostridium* (anaeróbios) e *Hemophilus*, *Enterobacteriaceae* e *Streptococcus spp* (aeróbios). As bactérias simplesmente representam colonização secundária ou participam da carcinogênese por interação do hospedeiro (CHOCOLATEWALA; PANKAJ; DESALE, 2015).

Estudos epidemiológicos mostraram que jovens com doença periodontal e com perda dos dentes molares são mais suscetíveis à morte prematura causada por doenças fatais, tais como, neoplasias malignas, doenças cardiovasculares e doenças do sistema digestivo (HUJOEL et al., 2003; SÖDER et al., 2011). Outros

estudos relataram associações da periodontite com câncer de próstata, câncer de mama, câncer de pâncreas e de pulmão (ARORA et al., 2010; MICHAUD et al. 2007; TANWIR; SADIA; SHAUKAT, 2012), do trato digestivo, câncer colorretal, de pâncreas, de cabeça e de pescoço em indivíduos que não eram tabagistas e nem alcoólicos (MANTOVANI et al., 2008).

Existem também associações entre doença periodontal e distúrbios sistêmicos, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, doenças pulmonares, câncer e malformação neonatal. A justificativa para esses problemas está relacionada aos aspectos, em longo prazo, da inflamação da doença periodontal, pois a bactéria *P. gingivalis* é cancerígena, uma vez que algumas reações imunológicas e inflamatórias ativam o hospedeiro. Um efeito carcinogênico importante da *P. gingivalis* é a inibição apoptótica nas células epiteliais – a apoptose – que é 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 e, assim, propagar para células contíguas.

As doenças periodontais são causadas por um grupo de bactérias anaeróbicas periodontais, que são, em sua maioria, gram-negativa, destacando-se a relação entre a bactéria *P. gingivalis* e câncer, a qual foi investigada por estudos de meta-análise, e os resultados revelaram que a prevalência de *P. gingivalis* entre indivíduos com câncer foi significativamente mais elevada do que nos indivíduos saudáveis (SAYEHMIRI, 2015).

Várias infecções causam acúmulo intracelular de agente patogênico, que conduz à supressão de apoptose. Esta estratégia prevê que o agente patogênico intracelular pode sobreviver, apesar de as tentativas do sistema imune do hospedeiro destruir as células infectadas por apoptose, que permite que as células transformadas tornam-se tumorigênicas. Sugere-se que as bactérias poderiam ser atenuadas utilizando vacinas para modular a imunidade do hospedeiro contra o câncer, o que poderia esclarecer o papel da detecção microbiana não só na prevenção ou no início do diagnóstico de câncer oral, mas também para um tratamento eficaz, melhorando a sobrevivência dos pacientes (CHOCOLATEWALA et al., 2015).

Rajeev et al. (2015), ao compararem a microbiota salivar entre pacientes com câncer de pâncreas e saudáveis constataram uma variação significativa dessa microbiota, fato que comprova ser ela fonte informativa para se descobrir biomarcadores não invasivos de doenças sistêmicas. O papel da bactéria na indução do tumor irá destacar a carcinogênese bacteriana no prognóstico de câncer bucal.

Existem relatos de que o vírus também desempenha um grande papel no aumento da doença periodontal, como por exemplo, a infecção por citomegalovírus e/ou de Epstein-Barr (EBV) tipo 1 associada ao câncer, incluindo linfoma e carcinoma nasofaríngeo (FITZPATRICK; KATZ, 2009), e o papiloma vírus humano (HPV), principal causa do desenvolvimento do câncer de colo do útero e do câncer de garganta. A infecção por HCMV ou EBV inibe a resposta imunológica (produção de macrófagos) e, portanto, tem papel patogênico no desenvolvimento da doença periodontal. Assim, é possível afirmar que as associações entre agentes infecciosos de agentes patogênicos bacterianos, vírus de herpes, vírus de Epstein-Barr (EBV) tipo 1, citomegalovírus (CMV) desempenham um papel sinérgico importante na patogênese da periodontite crônica. Constata-se ainda que as infecções virais, tais como infecções por vírus de papiloma humano, estão associadas ao câncer de mama. Diante disso se pode afirmar que, em geral, infecções persistentes e prevalentes em populações relacionam-se a doenças malignas.

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em mulheres em todo o mundo além de ser a maior causa de mortalidade relacionada ao câncer. Segundo Söder et al. (2011), as taxas de incidência são altas em países desenvolvidos e também crescentes no mundo em desenvolvimento. Os autores comprovaram, em um estudo prospectivo de 3.273 pacientes selecionados aleatoriamente com idade entre 30 e 40 anos durante 17 anos, que a doença periodontal crônica indicada por molares ausentes está estatisticamente associada ao câncer de mama. Em outro estudo de coorte de Freudenheim et al. (2015), no qual foram analisados a doença periodontal e o câncer de mama primário invasivo em 93 mulheres na pós-menopausa e na faixa etária de 50 a 79 anos, durante quatro anos, foi confirmado um aumento significativo de risco de câncer da mama invasivo entre as que relataram uma história de doença periodontal.

Encontrar esses achados em outras populações nos permitirá compreender melhor a associação entre doença periodontal e câncer de mama, com o potencial de fornecer novos conhecimentos e novas estratégias de prevenção de câncer de mama, fator relevante para a saúde pública (KHAJURIA; METGUD, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL:

Avaliar o perfil microbiológico do biofilme subgengival de mulheres com câncer de mama e sob tratamento antineoplásico assistidas no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, e de mulheres sem câncer de mama assistidas no ambulatório de Periodontia do Instituto de Odontologia da UFES.

3.2. ESPECÍFICOS:

1. Demonstrar as características sócio-demográficas, de saúde sistêmica, comportamentais e preocupação com o tratamento odontológico;
2. Analisar os parâmetros clínicos periodontais nos grupos caso e controle;
3. Analisar o perfil microbiológico do biofilme subgengival nos grupos caso e controle;
4. Comparar os parâmetros clínicos periodontais com o perfil microbiológico do biofilme subgengival nos grupos caso e controle;
5. Comparar as contagens médias dos complexos microbianos nos grupos caso e controle.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRA

A amostra deste estudo foi composta por um total de 92, sendo 62 pacientes com diagnóstico de câncer de mama e com doença periodontal, assistidas no Ambulatório de Mastologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), e submetidas às terapias antineoplásicas (grupo caso) e 30 mulheres sem diagnóstico de câncer de mama e com doença periodontal (grupo controle) assistidas no Ambulatório 2 do Instituto de Odontologia (IOUFES) no Espírito Santo.

A amostra (*n*) deste estudo caso-controle foi aleatória. Após diagnóstico confirmado de câncer de mama pela equipe médica de mastologistas do HUCAM, as pacientes foram encaminhadas ao Serviço de Periodontia no Ambulatório 2 do IOUFES. A seleção das pacientes, as quais foram submetidas ao exame clínico periodontal completo, foi realizada por uma cirurgiã-dentista treinada em Periodontia (MCMG). Levou-se em consideração o número de dentes perdidos (APÊNDICE A) e o questionário anamnésico médico-odontológico (APÊNDICE B). A presença de doença periodontal nas mulheres portadoras de câncer de mama foi confirmada após diagnóstico da presença de pelo menos uma bolsa periodontal com profundidade de sondagem e nível de inserção clínico $\geq 4,0$ mm em qualquer maxilar.

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

As participantes voluntárias deveriam ter as seguintes características clínicas: periodontite crônica em pelo menos um sítio com profundidade de bolsa à sondagem (PBS) e nível clínico de inserção (NCI) maior ou igual a 4,0mm em qualquer maxilar; presença de no mínimo dez dentes na cavidade bucal; idades entre 30 e 75 anos de idade; diagnóstico confirmado de câncer de mama assistido pela equipe médica do Serviço de Mastologia do HUCAM/UFES e com indicação de esvaziamento linfático.

4.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão adotados foram: ter idade abaixo de 30 anos; com câncer de mama e sem esvaziamento linfático, ser portadora somente de gengivite; não possuir o mínimo de dez dentes na cavidade bucal; ter realizado outro tipo de cirurgia que não esteja relacionada ao câncer de mama; ser portadora de desordens locais ou sistêmicas que causam lesões nas mucosas orais; estar usando terapia com antimicrobiano ou antibiótico dentro de duas semanas a quatro semanas prévias ao exame bucal; ter presença de infecção aguda oral pré-existente; ser gestante; ter reabilitações protéticas extensas, tais como: prótese total superior e inferior, prótese parcial removível superior ou inferior apoiada em menos de dez dentes naturais na cavidade bucal, histórico de tratamento periodontal prévio nos últimos seis meses e alergia à clorexidina.

4.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todas as participantes foram informadas dos objetivos da pesquisa e de seus riscos e benefícios. Após consentimento do Comitê de Ética do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) (ANEXO A), as pacientes que concordaram em participar voluntariamente do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B), de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº466/12) para serem incluídas oficialmente neste estudo. Todas as pacientes foram submetidas à profilaxia, orientação de higiene oral e aplicação tópica de flúor no Serviço de Periodontia (Ambulatório 2) do IOUFES. O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do CCS da UFES/Plataforma Brasil e aprovado com o número CAAE 21597313.2.0000.5060 (ANEXO C).

4.5. QUESTIONÁRIO ANAMNÉSICO MÉDICO-ODONTOLÓGICO

As informações demográficas, clínicas, comportamentais, sistêmicas e bucais relacionadas ao uso das terapias antineoplásicas para o câncer de mama foram obtidas por meio de um questionário anamnésico médico-odontológico

estruturado (APÊNDICE 2), contendo as variáveis independentes, idade (anos), tabagismo, etilismo, hipertensão, diabetes, depressão, ansiedade, cardiopatias, outras neoplasias, visita ao dentista e tratamento periodontal. Não foram coletados dados dos prontuários médicos do HUCAM sobre o desfecho oncológico atribuível ao câncer de mama.

4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Trata-se de um estudo caso-controle. No primeiro contato com as pacientes, além de responderem ao questionário anamnésico, foram realizados procedimentos clínicos de profilaxia dental e coleta de amostras subgengivais de placa bacteriana em um sítio com bolsa periodontal mais profunda nas pacientes que se enquadravam nos critérios de inclusão e exclusão.

4.7. AVALIAÇÃO CLÍNICA PERIODONTAL

A avaliação clínica periodontal foi realizada por uma cirurgiã-dentista treinada e treinada para este procedimento em periodontia (MCMG) com o objetivo de realizar o diagnóstico clínico periodontal. As mensurações clínicas periodontais foram registradas no formulário Periodontograma (APÊNDICE A) e em seis sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e distolingual), em todos os dentes (exceto os terceiros molares), utilizando-se sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15, Hufriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

A perda dentária foi registrada como ausência de qualquer dente, utilizando-se o próprio periodontograma. Foram analisados os seguintes parâmetros periodontais: (1) Sondagem do Nível de Inserção Clínico (NIC), aferindo-se a distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical da bolsa/sulco periodontal; (2) Profundidade Clínica de Sondagem ou Profundidade de Bolsa à Sondagem (PBS), aferindo-se a distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável da bolsa/sulco periodontal; (3) Índice de Placa Visível (IPV): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa

supragengival visível (AINAMO; BAY, 1975); (4) Índice de Sangramento Gengival Marginal (ISG): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento gengival marginal, após percorrer levemente a sonda ao longo; e (5) Sangramento à Sondagem (SS): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento após 20 segundos da sondagem.

A presença de periodontite crônica foi definida se: PBS \geq 4,0mm e NCI \geq 4,0mm em algum dente e no mesmo sítio e não contíguo, classificando-se a doença em localizada (menos de 30% dos dentes envolvidos) e generalizada (mais de 30% dos dentes afetados) (ARMITAGE, 1999). O diagnóstico clínico de periodontite crônica baseou-se nas seguintes características: (1) Prevalência maior em adultos, podendo ocorrer em crianças e adolescentes; (2) Taxas de progressão baixas a moderadas; (3) Quantidade de depósitos microbianos consistente com a severidade da destruição periodontal; (4) Nenhum padrão de agregação familiar, e (5) Presença frequente de cálculo subgengival (ARMITAGE, 2004).

4.8. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.8.1. Coleta das amostras do biofilme dental subgengival

Foram coletadas ao todo 92 amostras de biofilme subgengival das bolsas periodontais nas 92 pacientes por meio de curetas periodontais Gracey (Hu-friedy Mfg Co Inc. Chigago IL), após a profilaxia dos dentes, utilizando-se gazes e curetas periodontais, com vista à remoção do biofilme supragengival e/ou do cálculo dentário. Foi selecionado um sítio periodontal mais profundo por paciente após as pacientes terem sido diagnosticadas com câncer de mama e indicadas para esvaziamento linfático e terem recebido qualquer terapia antineoplásica. As amostras foram transferidas para tubos de plásticos (Eppendorf) contendo 300ul de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6) e estocados a -80°C no NDI- UFES.

4.8.2. Hibridização Checkerboard DNA-DNA

Esta fase foi realizada no Laboratório de Microbiologia Oral do Programa de Pós-graduação de Odontologia da Universidade de Guarulhos/UnG em Guarulhos-

SP. A identificação dos micro-organismos presentes no biofilme subgengival dos sítios selecionados foi realizada por meio da técnica de hibridização *Checkerboard DNA-DNA* (SOCRANSKY et al. 1994). A cada tubo de Eppendorf contendo a amostra de placa subgengival foi adicionado 0,15ml de NaOH 0,5M. As suspensões foram fervidas em banho-maria por cinco minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de 5M de acetato de amônia. Com isso, as células bacterianas foram lisadas e o DNA ficou suspenso na solução. Cada suspensão de placa contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “Minislot” (Immuntics, Cambridge, MA, USA) e o DNA, concentrado na membrana de nylon (15 X 15 cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA). A membrana foi removida do aparato, e o DNA depositado na membrana foi então fixado na mesma por intermédio de aquecimento em forno a 120°C por 20 minutos. As duas últimas canaletas do “Minislot” foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies de micro-organismos para serem investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas.

4.8.3. Hibridização das membranas com as sondas de DNA

Após fixação do DNA nas membranas, estas foram pré-hibridizadas a 42°C por uma hora numa solução de 50% formamida, 1% caseína, 5 X SSC, 25 mM de fosfato de sódio (pH 6.5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “Miniblotter 45” (Immuntics, Cambridge, MA, USA) com as linhas contendo os DNAs fixados perpendiculares às canaletas do “Miniblotter”. O “Miniblotter” contém 45 canaletas que servem cada uma para a colocação de uma sonda de DNA. As sondas de DNA foram construídas utilizando-se o “random primer digoxigenin labeling Kit” (Boehringer Mannheim), como descrito por Feinberg e Vogelstein, em 1983. Sondas de DNA específicas para 40 espécies bacterianas, selecionadas devido à sua associação com diferentes tipos de doenças e saúde periodontais, foram usadas neste estudo (SOCRANSKY et al. 1994). Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de 10^4 células bacterianas. Suas concentrações foram ajustadas de tal modo que as intensidades dos sinais de todas as sondas fossem semelhantes. Cada canaleta do “Miniblotter 45” foi preenchida com 130 µl de uma determinada sonda, contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6.5), 0,2

mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 ng/ml de sonda de DNA). As sondas hibridizam perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato de xadrez com as linhas de DNA, horizontais, e as sondas, verticais. O aparato contendo as membranas foi colocado dentro de um saco plástico para evitar a desidratação das mesmas. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu a 42°C, durante um período de no mínimo 20 horas.

4.8.4. Detecção das espécies

Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do “Miniblotter” e lavadas por 5 minutos em temperatura ambiente, seguidas de duas lavagens de 20 minutos, a 65°C, numa solução adstringente (0,1 X SSC, 0,1% SDS), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora numa solução contendo 0,1 M ácido maleico, 3M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0, e por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim), numa diluição de 1/25.000. As membranas foram então lavadas com uma solução de 0,1M ácido maleico, 3M NaCl, 0,2M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, duas vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0,1M Tris HCl, 0,1M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5. Em seguida, as membranas foram incubadas em uma solução detectora, Lumi Phos 530 (Lumigen, Southfield, MI, USA), por 45 minutos a 37°C.

Por fim, as membranas foram colocadas num cassete sob um filme radiográfico (KodaK X-OMAT) por aproximadamente 40 minutos e os filmes, revelados logo em seguida. A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10⁵ e 10⁶ bactérias. Desta forma, o número “0” será registrado quando não houver detecção do sinal; “1” equivalerá a um sinal menos intenso que o controle de 10⁵ células; “2” equivalerá a aproximadamente 10⁵ células; “3”, entre 10⁵ e 10⁶ células; “4” aproximadamente 10⁶ células e “5”, mais de 10⁶ células. Estes registros foram então utilizados para

determinar os níveis das diferentes espécies investigadas no estudo, expressos em nível médio de cada espécie (contagem) em cada sítio.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.9.1. Metodologia

A amostra foi caracterizada pela frequência observada, porcentagem, medida de tendência central e de variabilidade. Para a verificação da distribuição de probabilidade normal das variáveis utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov (1933). As comparações entre as proporções dos grupos caso e controle foram realizadas pelo teste do Qui-Quadrado de Pearson (1900) e quando as premissas deste teste não foram satisfeitas utilizou-se o teste Exato de Fisher (1922). O teste de Mann-Whitney (1947) foi requerido para verificar as diferenças entre as médias dos postos¹ dos grupos caso e controle. Para avaliar as correlações entre os complexos de bactérias nos grupos caso e controle foi utilizada a correlação de Spearman (1904). A regressão logística múltipla avaliou a relação de causa e efeito das perdas dentárias dos molares superiores e inferiores de cada bactéria entre os grupos. O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5% e o *software* utilizado foi o IBM SPSS *Statistics version 21*.

¹ Primeiro coloca-se os dados em ordem numérica e depois lhes é dado um valor (posto ou ordem) para que seja calculada a média dos mesmos e por fim a estatística de teste que verificará a existência ou não de diferenças entre os postos médios.

5 RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a caracterização da amostra para variáveis clínicas. A faixa etária entre 45 e 51 anos correspondeu a 32,1% do grupo controle, enquanto a faixa entre 52 e 58 anos correspondeu a 36,2% do grupo-caso. As tabagistas do grupo-controle são 12,5% das respondentes à pesquisa e de caso, 5,0%; as etilistas 12,5% controle e 11,7% caso; as hipertensas 48,0% controle e 45,0% caso; as com diabetes 20,8% controle e 11,7 caso; as com depressão 12,0% controle e 18,3% caso; as ansiosas 44,0% controle e 61,7% caso; as cardiopatas 20,0% controle e 15,0% caso; as outras neoplasias 37,5% controle e 6,7% caso; 96,0% das mulheres do grupo controle visitaram o dentista, enquanto as do grupo caso todas visitaram (100,0%); as que fizeram tratamento de gengiva 56,0% controle e 25,4% caso. As demais variáveis clínicas não cabem às mulheres do grupo-controle, portanto 64,9% fizeram esvaziamento linfático no grupo-caso; 78,9% fizeram quimioterapia (caso); 70,2% fizeram radioterapia (caso) e 71,9% utilizaram a medicação tamoxifeno/inibidor de aromatase (caso).

Tabela 1 - Caracterização das variáveis clínicas nos dois grupos

		CONTROLE		CASO	
		n	%	n	%
Faixa etária	44 anos ou menos	8	28.6	8	13.8
	45 a 51 anos	9	32.1	17	29.3
	52 a 58 anos	8	28.6	21	36.2
	59 anos ou mais	3	10.7	12	20.7
Tabagismo	Não	21	87.5	57	95.0
	Sim	3	12.5	3	5.0
Etilismo	Não	21	87.5	53	88.3
	Sim	3	12.5	7	11.7
Hipertensão	Não	13	52.0	33	55.0
	Sim	12	48.0	27	45.0
Diabetes	Não	19	79.2	53	88.3
	Sim	5	20.8	7	11.7
Cardiopatias	Não	20	80.0	51	85.0
	Sim	5	20.0	9	15.0
Outras neoplasias	Não	15	62.5	56	93.3
	Sim	9	37.5	4	6.7
Visita ao dentista	Não	1	4.0	0	0.0
	Sim	24	96.0	60	100.0
Tratamento de gengiva	Não	11	44.0	44	74.6
	Sim	14	56.0	15	25.4
Esvaziamento linfático	Não	0	0.0	20	35.1
	Sim	0	0.0	37	64.9
Quimioterapia	Não	0	0.0	12	21.1
	Sim	0	0.0	45	78.9
Radioterapia	Não	0	0.0	17	29.8
	Sim	0	0.0	40	70.2
Tamoxifeno / Inibidor de aromatase	Não	0	0.0	16	28.1
	Sim	0	0.0	41	71.9

O teste do Qui-Quadrado não evidenciou haver relação ($p < 0,05$) significativa entre os grupos para a profundidade da bolsa à sondagem (PB) e o nível de inserção clínico (NIC), ou seja, a profundidade e o nível de inserção clínico são semelhantes entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Associação entre os grupos da Profundidade de Bolsa (PB) e Nível de inserção clínico (NIC)

		Controle		Caso		Valor p*
		n	%	n	%	
PB dentes superiores	4 a 5,0mm	19	70.4	36	78.3	0.575
	Igual ou maior que 6,0mm	8	29.6	10	21.7	
PB dentes inferiores	4 a 5,0mm	18	66.7	41	78.8	0.281
	Igual ou maior que 6,0mm	9	33.3	11	21.2	
NIC dentes superiores	4 a 5,0mm	11	39.3	22	46.8	0.632
	Igual ou maior que 6,0mm	17	60.7	25	53.2	
NIC dentes inferiores	4 a 5,0mm	10	34.5	22	40.7	0.641
	Igual ou maior que 6,0mm	19	65.5	32	59.3	

*. Teste do Qui-Quadrado.

A perda dentária nos dentes superiores, nos dentes inferiores e o sangramento à sondagem nos dentes superiores foram significativos ao nível de 5%. Logo, há diferenças entre as quantidades de perda dentária nos dentes superiores, tendo o grupo-caso mais perdas. O mesmo grupo também apresentou mais perdas quando avaliados os dentes inferiores. O sangramento à sondagem apresentou haver maior quantidade deste problema para o grupo-controle. As demais quantidades são semelhantes entre os grupos, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação entre as quantidades de perda dentária, IPV, ISG e SS nos grupos

		Média dos postos	Valor p*
Perda dentária dentes superiores	Controle	33.0	0.002
	Caso	50.5	
Perda dentária dentes inferiores	Controle	35.2	0.012
	Caso	49.3	
IPV dentes superiores	Controle	42.2	0.533
	Caso	45.7	
IPV dentes inferiores	Controle	43.4	0.878
	Caso	44.3	
ISG dentes superiores	Controle	47.6	0.404
	Caso	42.9	
ISG dentes inferiores	Controle	40.6	0.418
	Caso	45.1	
SS dentes superiores	Controle	55.6	0.003
	Caso	38.8	
SS dentes inferiores	Controle	47.9	0.243
	Caso	41.2	

*. Teste de Mann-Whitney.

Os complexos de bactérias são apresentados na Tabela 4. Avaliando somente o complexo vermelho, percebe-se que a detecção da bactéria *Porphyromonas gingivalis* foi de 60,0% no grupo-controle e 80,0% no grupo-caso; a *Treponema denticola* 76,7% no controle e 90,0% no caso e a *Tannerella forsythia* 53,3% no controle e 70,0% no caso.

Já no complexo laranja, observou-se a detecção na bactéria *Streptococcus constellatus* em 50,0% no controle e 71,7% no caso, *Eubacterium nodatum* 63,3% no controle e 83,3% no caso, *Fusobacterium nucleatum (sp.vincentii)* 53,3% no controle e 75,0% no caso, *Campylobacter rectus* 60,0% no controle e 73,3% no caso, *Parvimonas micra* 80,0% no controle e 8,0% no caso, *Prevotella nigrescens* 73,3% no controle e 91,7% no caso; *Fusobacterium nucleatum (sp. polymorphum)* 76,7% no controle e 98,3% no caso; *Campylobacter showae* 50,0% no controle e 90,0% no caso; *Fusobacterium periodonticum* 70,0% no controle e 90,0% no caso;

Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum) 83,3% no controle e 93,3% no caso; *Campylobacter gracilis* 83,3% no controle e 90,0% no caso e *Prevotella intermedia* 56,7% no controle e 76,7% no caso.

O complexo amarelo apresentou detecção na bactéria *Streptococcus sanguinis* em 56,7% no grupo controle e 70,0% no grupo caso; *Streptococcus oralis* 90,0% no controle e 95,0% no caso; *Streptococcus intermedius* 53,3% no controle e 80,0% no caso; *Streptococcus gordonii* 63,3% no controle e 95,0% no caso e *Streptococcus mitis* 70,0% no controle e 86,7% no caso.

Tabela 4 - Caracterização dos complexos de bactérias nos dois grupos

			Controle		Caso	
			N	%	n	%
Complexo vermelho	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não detectado	12	40.0	12	20.0
		Detectado	18	60.0	48	80.0
	<i>Treponema denticola</i>	Não detectado	7	23.3	6	10.0
		Detectado	23	76.7	54	90.0
	<i>Tannerella forsythia</i>	Não detectado	14	46.7	18	30.0
		Detectado	16	53.3	42	70.0
Complexo laranja	<i>Streptococcus constellatus</i>	Não detectado	15	50.0	17	28.3
		Detectado	15	50.0	43	71.7
	<i>Eubacterium nodatum</i>	Não detectado	11	36.7	10	16.7
		Detectado	19	63.3	50	83.3
	<i>Fusobacterium nucleatum (sp. vincentii)</i>	Não detectado	14	46.7	15	25.0
		Detectado	16	53.3	45	75.0
	<i>Campylobacter rectus</i>	Não detectado	12	40.0	16	26.7
		Detectado	18	60.0	44	73.3
	<i>Parvimonas micra</i>	Não detectado	6	20.0	12	20.0
		Detectado	24	80.0	48	80.0
	<i>Prevotella nigrescens</i>	Não detectado	8	26.7	5	8.3
		Detectado	22	73.3	55	91.7
	<i>Fusobacterium nucleatum (sp. polymorphum)</i>	Não detectado	7	23.3	1	1.7
		Detectado	23	76.7	59	98.3
	<i>Campylobacter showae</i>	Não detectado	15	50.0	6	10.0
		Detectado	15	50.0	54	90.0
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	Não detectado	9	30.0	6	10.0	
	Detectado	21	70.0	54	90.0	
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)</i>	Não detectado	5	16.7	4	6.7	
	Detectado	25	83.3	56	93.3	

Complexo amarelo	<i>Campylobacter gracilis</i>	Não detectado	5	16.7	6	10.0
		Detectado	25	83.3	54	90.0
	<i>Prevotella intermedia</i>	Não detectado	13	43.3	14	23.3
		Detectado	17	56.7	46	76.7
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Não detectado	13	43.3	18	30.0
		Detectado	17	56.7	42	70.0
	<i>Streptococcus oralis</i>	Não detectado	3	10.0	3	5.0
		Detectado	27	90.0	57	95.0
	<i>Streptococcus intermedius</i>	Não detectado	14	46.7	12	20.0
		Detectado	16	53.3	48	80.0
	<i>Streptococcus gordonii</i>	Não detectado	11	36.7	3	5.0
		Detectado	19	63.3	57	95.0
	<i>Streptococcus mitis</i>	Não detectado	9	30.0	8	13.3
		Detectado	21	70.0	52	86.7

As bactérias *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* (sp. *polymorphum*), *Campylobacter showae*, *Fusobacterium periodonticum* e a *Streptococcus gordonii* apresentaram diferenças ($p < 0.05$) entre as suas proporções para os grupos controle e caso. Portanto, as proporções de bactérias detectadas foram maiores em todas estas bactérias para o grupo caso com 91,7%, 98,3%, 90,0%, 90,0%, 80,0% e 95,0% respectivamente. As demais bactérias foram consideradas semelhantes nos dois grupos, conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Associação entre as bactérias nos grupos

		Controle		Caso		Valor p*
		n	%	n	%	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não detectado	12	40.0	12	20.0	0.075*
	Detectado	18	60.0	48	80.0	
<i>Treponema denticola</i>	Não detectado	7	23.3	6	10.0	0.115**
	Detectado	23	76.7	54	90.0	
<i>Tannerella forsythia</i>	Não detectado	14	46.7	18	30.0	0.161*
	Detectado	16	53.3	42	70.0	
<i>Streptococcus constellatus</i>	Não detectado	15	50.0	17	28.3	0.061*
	Detectado	15	50.0	43	71.7	
<i>Eubacterium nodatum</i>	Não detectado	11	36.7	10	16.7	0.062*
	Detectado	19	63.3	50	83.3	
<i>Fusobacterium nucleatum (sp.vincentii)</i>	Não detectado	14	46.7	15	25.0	0.055*
	Detectado	16	53.3	45	75.0	
<i>Campylobacter rectus</i>	Não detectado	12	40.0	16	26.7	0.232*
	Detectado	18	60.0	44	73.3	
<i>Parvimonas micra</i>	Não detectado	6	20.0	12	20.0	0.999*
	Detectado	24	80.0	48	80.0	
<i>Prevotella nigrescens</i>	Não detectado		0.0	5	8.3	0.028**
	Detectado	22	73.3	55	91.7	
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. polymorphum)</i>	Não detectado	7	23.3	1	1.7	0.002**
	Detectado	23	76.7	59	98.3	
<i>Campylobacter showae</i>	Não detectado	15	50.0	6	10.0	< 0.001*
	Detectado	15	50.0	54	90.0	
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	Não detectado	9	30.0	6	10.0	0.032*
	Detectado	21	70.0	54	90.0	
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)</i>	Não detectado	5	16.7	4	6.7	0.262**
	Detectado	25	83.3	56	93.3	
<i>Campylobacter gracilis</i>	Não detectado	5	16.7	6	10.0	0.496**
	Detectado	25	83.3	54	90.0	
<i>Prevotella intermedia</i>	Não detectado	13	43.3	14	23.3	0.086*
	Detectado	17	56.7	46	76.7	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Não detectado	13	43.3	18	30.0	0.244*
	Detectado	17	56.7	42	70.0	

*. Teste do Qui-Quadrado.

(Cont.)

** Teste Exato de Fisher.

Tabela 5 - Associação entre os grupos das bactérias

(Conclusão)

		Controle		Caso		Valor p*
		n	%	n	%	
<i>Streptococcus oralis</i>	Não detectado	3	10.0	3	5.0	0.659**
	Detectado	27	90.0	57	95.0	
<i>Streptococcus intermedius</i>	Não detectado	14	46.7	12	20.0	0.013*
	Detectado	16	53.3	48	80.0	
<i>Streptococcus gordonii</i>	Não detectado	11	36.7	3	5.0	< 0.001**
	Detectado	19	63.3	57	95.0	
<i>Streptococcus mitis</i>	Não detectado	9	30.0	8	13.3	0.085*
	Detectado	21	70.0	52	86.7	

*. Teste do Qui-Quadrado.

** Teste Exato de Fisher.

Os testes do Qui-Quadrado e Exato de Fisher foram requeridos para verificar se as proporções de PB e NIC em cada bactéria foram diferentes para cada grupo. A quantidade de bactérias detectadas em relação à profundidade de bolsa (PB) não apresentou diferenças nas proporções nos grupos controle e caso, conforme Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Comparação entre as quantidades de bactérias em relação à profundidade de bolsa (PB) para dentes superiores e inferiores em cada grupo

			Controle		Caso		Valor p
			n	%	n	%	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não detectado	PB dentes superiores (4 a 5,0mm)	7	36.8	7	19.4	0.200**
	Detectado		12	63.2	29	80.6	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não detectado	PB dentes superiores (≥6,0mm)	5	62.5	3	30.0	0.342**
	Detectado		3	37.5	7	70.0	
<i>Treponema denticola</i>	Não detectado	PB dentes superiores (4 a 5,0mm)	3	15.8	5	13.9	0.999**
	Detectado		16	84.2	31	86.1	
<i>Treponema denticola</i>	Não detectado	PB dentes superiores (≥6,0mm)	3	37.5	0	0.0	0.069**
	Detectado		5	62.5	10	100.0	
<i>Tannerella forsythia</i>	Não detectado	PB dentes superiores (4 a 5,0mm)	10	52.6	13	36.1	0.264*
	Detectado		9	47.4	23	63.9	
<i>Tannerella forsythia</i>	Não detectado	PB dentes superiores (≥6,0mm)	3	37.5	2	20.0	0.608**
	Detectado		5	62.5	8	80.0	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não detectado	PB dentes inferiores (4 a 5,0mm)	5	27.8	7	17.1	0.483**
	Detectado		13	72.2	34	82.9	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não detectado	PB dentes inferiores (≥ 6,0mm)	6	66.7	3	27.3	0.175**
	Detectado		3	33.3	8	72.7	
<i>Treponema denticola</i>	Não detectado	PB dentes inferiores (4 a 5,0mm)	4	22.2	4	9.8	0.231**
	Detectado		14	77.8	37	90.2	
<i>Treponema denticola</i>	Não detectado	PB dentes inferiores (≥6,0mm)	3	33.3	1	9.1	0.285**
	Detectado		6	66.7	10	90.9	
<i>Tannerella forsythia</i>	Não detectado	PB dentes inferiores (4 a 5,0mm)	9	50.0	14	34.1	0.385*
	Detectado		9	50.0	27	65.9	
<i>Tannerella forsythia</i>	Não detectado	PB dentes inferiores (≥ 6,0mm)	4	44.4	1	9.1	0.127**
	Detectado		5	55.6	10	90.9	

*. Teste do Qui-Quadrado.

** . Teste Exato de Fisher.

A quantidade de bactérias detectadas em relação ao nível de inserção clínico (NIC) não apresentou diferenças entre as proporções nos grupos controle e caso (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação entre as quantidades de bactérias em relação ao nível de inserção clínico (NIC) para dentes superiores e inferiores em cada grupo

			Controle		Caso		Valor p
			n	%	n	%	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não detectado	NIC dentes superiores (4 a 5)	3	27.3	2	9.1	0.304**
	Detectado		8	72.7	20	90.9	
	Não detectado	NIC dentes superiores (≥ 6)	9	52.9	8	32.0	0.150*
	Detectado		8	47.1	17	68.0	
<i>Treponema denticola</i>	Não detectado	NIC dentes superiores (4 a 5)	3	27.3	2	9.1	0.304**
	Detectado		8	72.7	20	90.9	
	Não detectado	NIC dentes superiores (≥ 6)	4	23.5	2	8.0	0.202**
	Detectado		13	76.5	23	92.0	
<i>Tannerella forsythia</i>	Não detectado	NIC dentes superiores (4 a 5)	5	45.5	9	40.9	0.999**
	Detectado		6	54.5	13	59.1	
	Não detectado	NIC dentes superiores (≥ 6)	9	52.9	6	24.0	0.100*
	Detectado		8	47.1	19	76.0	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não detectado	NIC dentes inferiores (4 a 5)	3	30.0	6	27.3	0.999**
	Detectado		7	70.0	16	72.7	
	Não detectado	NIC dentes inferiores (≥ 6)	8	42.1	6	18.8	0.106*
	Detectado		11	57.9	26	81.3	
<i>Treponema denticola</i>	Não detectado	NIC dentes inferiores (4 a 5)	2	20.0	3	13.6	0.999**
	Detectado		8	80.0	19	86.4	
	Não detectado	NIC dentes inferiores (≥ 6)	5	26.3	2	6.3	0.087**
	Detectado		14	73.7	30	93.8	
<i>Tannerella forsythia</i>	Não detectado	NIC dentes inferiores (4 a 5)	4	40.0	10	45.5	0.999**
	Detectado		6	60.0	12	54.5	
	Não detectado	NIC dentes inferiores (≥ 6)	9	47.4	7	21.9	0.070*
	Detectado		10	52.6	25	78.1	

*. Teste do Qui-Quadrado.

** . Teste Exato de Fisher.

A comparação da perda dentária, Índice de Placa Visível (IPV), Índice de Sangramento Gengival (ISG) e Sangramento à Sondagem (SS) estratificada pelas

bactérias detectadas e não detectadas com cada grupo é apresentada na Tabela 8. Avaliando somente as bactérias não detectadas, é possível perceber que houve diferenças entre os grupos para as perdas dentárias nos dentes superiores e inferiores e o sangramento à sondagem para a bactéria *Treponema denticola*. Assim, o grupo-caso obteve maiores perdas dentárias nas bactérias não detectadas nos dentes superiores e inferiores, enquanto o grupo controle teve maior quantidade de sangramento para a bactéria *Treponema denticola*. As demais bactérias apresentaram quantidades semelhantes nos dentes superiores e inferiores para perda dentária, IPV, ISG e SS no grupo controle e grupo caso.

Para as bactérias detectadas, *P. gingivalis* foi significativa para a perda dentária nos dentes superiores, *T. denticola* para a perda dentária nos dentes superiores e inferiores e no sangramento à sondagem nos dentes superiores. Assim, o grupo caso obteve maiores perdas dentárias nas bactérias não detectadas nos dentes superiores e inferiores, enquanto o grupo controle teve maior quantidade de sangramento para a bactéria *T. denticola*. As demais bactérias apresentaram quantidades semelhantes nos dentes superiores e inferiores para perda dentária, IPV, ISG e SS no grupo controle e grupo caso.

Tabela 8 - Comparação entre as quantidades de bactérias detectadas, não detectadas para a perda dentária, IPV, ISG e SS em cada grupo

		Não detectado		Detectado		
			Valor p*		Valor p*	
		Média dos postos		Média dos postos		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Perda dentária dentes superiores	Controle	10.3		23.7	
		Caso	14.8	0.120	35.9	0.017
	Perda dentária dentes inferiores	Controle	10.7		24.8	
		Caso	14.3	0.208	35.5	0.036
	IPV dentes superiores	Controle	12.3		28.8	
		Caso	12.7	0.899	34.0	0.310
	IPV dentes inferiores	Controle	13.0		30.2	
		Caso	12.0	0.765	32.7	0.620
	ISG dentes superiores	Controle	13.0		34.1	
		Caso	12.0	0.763	31.9	0.646

<i>Treponema denticola</i>	ISG dentes inferiores	Controle	12.4	0.967	27.8	0.288
		Caso	12.6		33.0	
	SS dentes superiores	Controle	15.3	0.051	38.5	0.106
		Caso	9.7		30.1	
	SS dentes inferiores	Controle	12.8	0.854	35.1	0.333
		Caso	12.2		30.1	
	Perda dentária dentes superiores	Controle	6.14	0.417	27.2	0.003
		Caso	8.00		42.8	
	Perda dentária dentes inferiores	Controle	6.71	0.804	28.1	0.008
		Caso	7.33		42.4	
	IPV dentes superiores	Controle	6.50	0.654	34.3	0.322
		Caso	7.58		39.6	
	IPV dentes inferiores	Controle	6.57	0.706	35.7	0.639
		Caso	7.50		38.3	
	ISG dentes superiores	Controle	6.29	0.502	41.9	0.286
		Caso	7.83		36.3	
ISG dentes inferiores	Controle	6.36	0.537	35.3	0.639	
	Caso	7.75		37.8		
SS dentes superiores	Controle	8.21	0.252	47.2	0.014	
	Caso	5.58		33.9		
SS dentes inferiores	Controle	6.64	0.912	42.0	0.240	
	Caso	6.30		35.6		

*. Teste de Mann-Whitney.

(Conclusão)						
		Não detectado		Detectado		
		Média dos postos	Valor p*	Média dos postos	Valor p*	
<i>Treponema denticola</i>	Perda dentária dentes superiores	Controle	12.4	0.029	20.94	0.026
		Caso	19.7		31.53	
	Perda dentária dentes inferiores	Controle	12.3	0.025	22.91	0.102
		Caso	19.7		30.74	
	IPV dentes superiores	Controle	16.3	0.901	25.38	0.353
		Caso	16.7		29.75	
	IPV dentes inferiores	Controle	17.0	0.602	26.38	0.543
		Caso	15.2		29.35	
	ISG dentes superiores	Controle	16.0	0.793	32.56	0.221
		Caso	16.9		26.88	

ISG dentes inferiores	Controle	15.4	0.725	25.72	0.492
	Caso	16.5		28.94	
SS dentes superiores	Controle	22.5	0.001	33.47	0.151
	Caso	11.8		26.51	
SS dentes inferiores	Controle	18.7	0.246	29.83	0.506
	Caso	14.8		26.60	

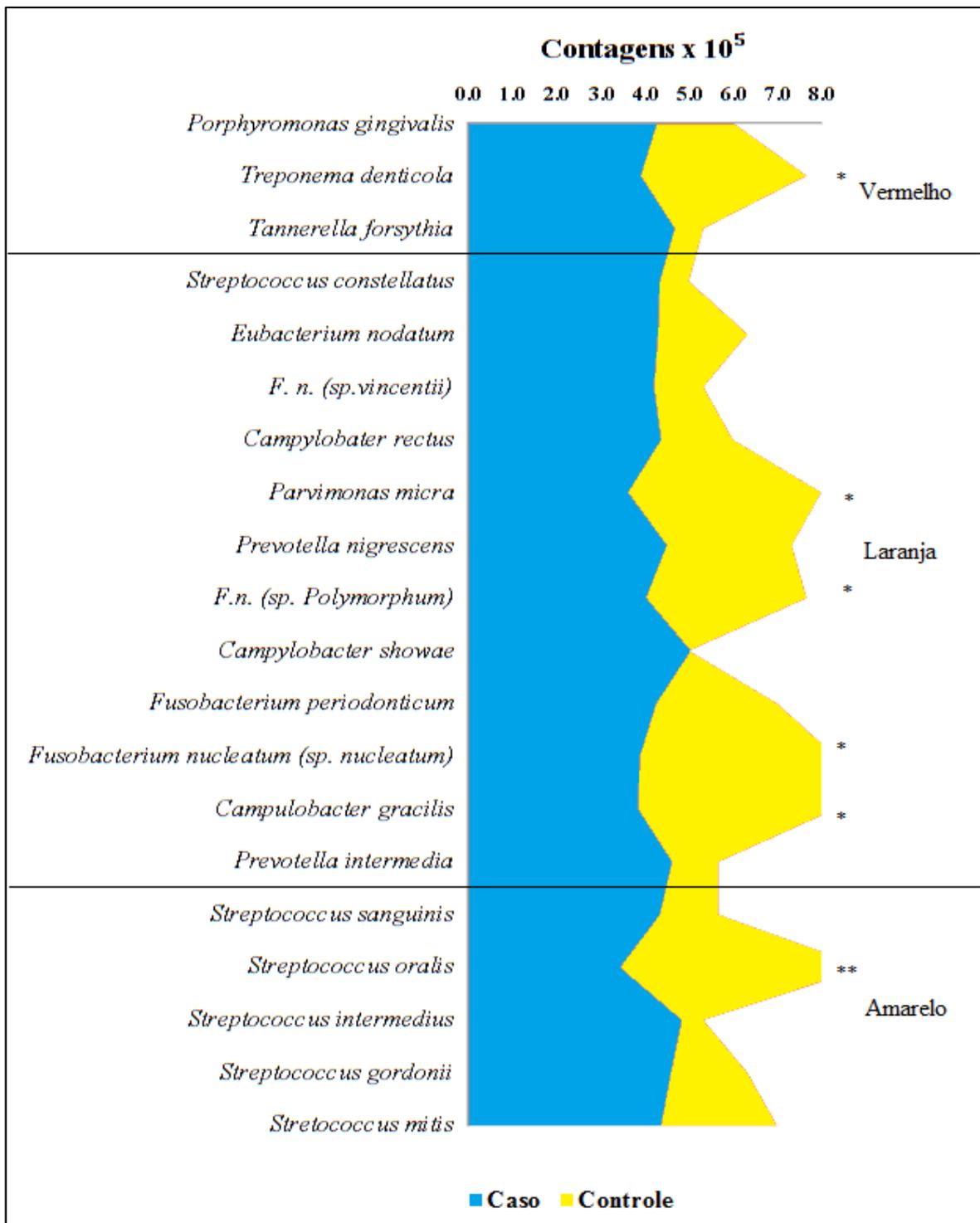
*. Teste de Mann-Whitney.

O teste de Mann-Whitney apresentou diferenças entre os grupos controle e caso (Tabela 9) nas seguintes bactérias: *Treponema denticola* (complexo vermelho), *Parvimonas micra* (complexo laranja), *F.n. (sp. polymorphum)* (complexo laranja), *Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)* (complexo laranja), *Campylobacter gracilis* (complexo laranja) e a *Streptococcus oralis* (complexo amarelo) e estas apresentaram o grupo controle com maiores quantidades médias de bactérias (Gráfico 1). As demais apresentaram quantidades médias semelhantes entre os grupos.

Tabela 9 – Quantidade das espécies bacterianas nos grupo caso e controle - Teste de Mann-Whitney

		Média dos postos	Valor p*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Caso	45.05	0.807
	Controle	46.40	
<i>Treponema denticola</i>	Caso	41.56	0.028
	Controle	53.38	
<i>Tannerella forsythia</i>	Caso	46.13	0.720
	Controle	44.23	
<i>Streptococcus constellatus</i>	Caso	46.63	0.534
	Controle	43.25	
<i>Eubacterium nodatum</i>	Caso	44.54	0.600
	Controle	47.42	
<i>F. n. (sp.vincentii)</i>	Caso	46.08	0.750
	Controle	44.33	
<i>Campylobacter rectus</i>	Caso	44.80	0.698
	Controle	46.90	
<i>Parvimonas micra</i>	Caso	40.10	0.003
	Controle	56.30	
<i>Prevotella nigrescens</i>	Caso	42.93	0.142
	Controle	50.63	
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. polymorphum)</i>	Caso	41.85	0.042
	Controle	52.80	
<i>Campylobacter showae</i>	Caso	48.50	0.098
	Controle	39.50	
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	Caso	43.43	0.253
	Controle	49.65	
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)</i>	Caso	39.92	0.002
	Controle	56.67	
<i>Campylobacter gracilis</i>	Caso	39.83	0.001
	Controle	56.83	
<i>Prevotella intermedia</i>	Caso	45.81	0.869
	Controle	44.88	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Caso	45.23	0.896
	Controle	46.03	
<i>Streptococcus oralis</i>	Caso	37.93	<0.001
	Controle	60.65	
<i>Streptococcus intermedius</i>	Caso	46.97	0.420
	Controle	42.57	
<i>Streptococcus gordonii</i>	Caso	45.50	0.999
	Controle	45.50	
<i>Streptococcus mitis</i>	Caso	43.45	0.255
	Controle	49.60	

Gráfico 1 - Quantidade média de células bacterianas (DNA) encontradas nas bolsas periodontais nos grupos caso e controle



Há diferenças entre as quantidades de perda dentária nos dentes inferiores tendo o grupo caso com mais perdas e o mesmo grupo apresentou haver mais perdas para o total (todos os molares juntos). As perdas dentárias dos molares superiores foram semelhantes para o teste (Tabela 10).

Tabela 10 - Perda dentária dos molares superiores e inferiores no grupo caso e controle.

		Média dos postos	Valor p*
Perda dentária dentes molares superiores	Controle	38.95	0.085
	Caso	48.78	
Perda dentária dentes molares inferiores	Controle	36.03	0.012
	Caso	50.23	
Perda dentária dentes molares (total)	Controle	36.73	0.023
	Caso	49.88	

*. Teste de Mann-Whitney.

A regressão logística apresentou significância estatística para a bactéria *S. intermedius*. Assim, o grupo caso tem 2,1 vezes mais chances de ter perda no molar inferior quando não há detecção desta bactéria em comparação ao grupo controle. Já a perda no molar superior quando há detecção desta bactéria aumentam estas chances em 1,2 vezes. As demais comparações não demonstraram serem fatores de risco ou proteção (Tabela 11).

Tabela 11 - Associação das perdas dentárias nos molares inferiores e superiores de cada bactéria entre os grupos

		Perda dentária	Valor p	OR	Intervalo de confiança de 95%	
					Limite inferior	Limite superior
<i>Streptococcus intermedius</i>	Não detectado	Molar superior	0.586	1.086	0.807	1.461
		Molar inferior	0.026	2.101	1.091	4.044
	Detectado	Molar superior	0.040	1.217	1.009	1.467
		Molar inferior	0.264	0.837	0.613	1.144

6 DISCUSSÃO

Existem associações entre câncer, de uma forma geral, com a inflamação sistêmica, ou seja, a resposta imunológica diante da presença da doença periodontal (MICHAUD, 2008) e seus efeitos sobre o organismo diante da resposta imunológica é considerada um marcador para a carcinogênese. De acordo com o CANCER RESEARCH UK (2015), cerca de 8 em cada 10 cânceres de mama são diagnosticados em mulheres com 50 anos ou mais.

Os resultados deste estudo em relação à idade das pacientes com câncer de mama e portadoras de doença periodontal são semelhantes, correspondendo a 36,2%, na faixa entre 52 a 58 anos e 29,7% acima de 59 anos e com predomínio do número de pacientes no grupo caso (33) em relação ao grupo controle (11), mas ligeiramente diferente do observado por Villafuerte (2014) cuja idade das pacientes esteve entre $47,65 \pm 1,83$ anos.

O consumo de bebida alcoólica tem sido considerado um agente carcinogênico com evidências suficientes na literatura relacionada ao aumento da chance de desenvolver câncer de mama, câncer colorretal, fígado, laringe, esôfago e cavidade bucal (COGLIANO et al., 2011; INUMARU SILVEIRA; NAVES, 2011). Neste estudo foi constatada certa homogeneidade entre os grupos, ou seja, apenas 11,7% nas mulheres com câncer de mama contra 12,5% das mulheres sem câncer de mama, contrastando com os resultados de Lages (2011), que encontrou 87,5% fazendo uso de álcool.

Outro fator de predisposição ao câncer e à doença periodontal é o tabagismo. No estudo de Soder et al. (2012), 17,1 % tinham doença periodontal, e dos indivíduos com câncer de mama (41), 12 eram fumantes (42,8%), 5 eram ex-fumantes (17,9%) e 11 nunca fumaram (39,3%). No nosso estudo, a amostra teve uma baixa prevalência do tabagismo, seja no grupo controle, seja no grupo caso com apenas três indivíduos (12,%; 5,0%).

Evidências de estudos epidemiológicos recentes sugerem uma ligação entre infecções periodontais, aumento do risco de aterosclerose e relatos de eventos cerebrovasculares em humanos (PADILLA et al., 2006). Em nossa amostra, a hipertensão foi relativamente alta nos grupos – 48% no controle e 45% no grupo

caso – diferentemente do relato de Genco (1996), em que a prevalência foi de 60% a 70% na idade de 45 anos ou acima desta nos indivíduos com doença periodontal, mas sem câncer de mama.

É necessário ressaltar sempre o monitoramento profissional da doença periodontal, para manter o nível mínimo da inflamação na doença e sublinhar a importância de manter visitas regulares ao dentista e meticulosa higiene oral (FITZPATRICK; KATZ, 2010). Há evidências de que condições periodontais pré-existentes podem se agravar durante o tratamento antineoplásico (VILLAFUERTE, 2014) em relação aos parâmetros do estadiamento que dependem da origem do tumor, da classificação histopatológica, da extensão do tumor primário, dos locais das metástases, das dosagens dos marcadores tumorais e do estado funcional do paciente (MOORE, 2004). O estadiamento segue o Sistema TNM de classificação dos tumores: para os estadiamentos I e II, classificou-se como “inicial” e os estadiamentos III e IV como “tardio” (GEBRIM,2009).

No entanto, neste estudo, não se pode comparar o tempo de diagnóstico com o tempo de terapia antineoplásica. Infecções periodontais podem ser facilmente negligenciadas, principalmente porque os sintomas de inflamação gengival podem ser mínimos e a infecção estar localizada na região subgengival (RABER-DURLACHER et al., 2002).

Söder et al. (2011), abordou a questão das infecções dentárias crônicas e a doença periodontal em particular como um dos fatores de risco para câncer de mama em um estudo prospectivo de 3.273 pacientes selecionados aleatoriamente com idade entre 30 a 40 anos. Os números de incidência de câncer de mama mostraram que 1,75% das pessoas com qualquer molar ausente tinha câncer de mama. Considerando que apenas 0% dos indivíduos sem câncer tinham molar desaparecido e a diferença na prevalência de câncer de mama para pacientes com doença periodontal e com ou sem qualquer molar ausente na mandíbula foi significativa ($p < 0,02$), foi observada claramente a relação doença periodontal e com a perda de molares da mandíbula como um preditor independente para o câncer de mama. No entanto, neste estudo corrente houve semelhança nesta prerrogativa, pois observou grande significância na perda de molares ($p=0,023$), especialmente nos molares inferiores ($p=0,012$) no grupo caso.

Neste estudo, observamos que as profundidades de sondagem (PS) nos dentes superiores e inferiores, bem como o nível de inserção clínico, não houve significância entre os grupos, concordando com Soder et al. (2011), que não encontraram significância entre os grupos com periodontite e câncer de mama e sem câncer de mama, ou seja, um pequeno número de bolsas periodontais $\geq 5,0$ mm foi encontrado nos indivíduos com periodontite e câncer de mama ($5,1 \pm 5,1$) e com periodontite e sem câncer de mama ($8,6 \pm 3,0$). Com relação à perda dentária encontrada nos maxilares superiores e inferiores, este estudo mostrou haver significância entre os grupos ($p=0,002$ /Caso; $p=0,012$ /Controle), da mesma forma que o sangramento à sondagem, porém com significância para o grupo-controle ($p=0,003$). Em relação à perda dentária, os resultados desta pesquisa mostram semelhanças com os de Soder et al. (2011) para o número de dentes remanescentes ($26,5 \pm 2,3$ /Caso; $23,6 \pm 5,6$ /Controle; $p=0,01$), número de molares perdidos ($0,7 \pm 1,4$ /Caso; $2,4 \pm 2,6$ /Controle; $p= 0,01$), número de dentes molares inferiores perdidos ($0,4 \pm 0,9$ /Caso; $1,6 \pm 1,5$ /Controle; $p= 0,003$) e para o número de perdas dentárias ($0,7 \pm 1,4$ /Caso; $2,4 \pm 2,6$ /Controle; $p= 0,01$). Além disso, tanto o índice de placa (IPV) quanto a inflamação gengival mensurada pelo índice de sangramento gengival (ISG) não foram significantes, concordando também com SODER et al. (2011).

Com relação à detecção dos complexos microbianos nos grupos, verificamos, neste estudo, que *T. denticola* foi a mais prevalente (90,0%) espécie do complexo vermelho nas amostras de biofilme subgengival dos casos, seguido por *P. gingivalis* (80%), *T. forsythia* (70,0%), contrastando com os resultados de Padilla et al. (2006), em que *P. gingivalis* foi o microrganismo mais comum isolado por meio de PCR em 7 casos de 12 indivíduos portadores de placas ateromatosas e com periodontite, seguida por *T. forsythia* em apenas dois casos e *P. intermedia* em quatro casos. A prevalência de *P. gingivalis* foi avaliada em quatro estudos caso-controle e mostrou que esta espécie aumentou a chance de desenvolver câncer e doença periodontal, sendo este patógeno considerado um fator de risco em potencial (SAYEHMIRI et al., 2015). Já no complexo laranja, este estudo mostrou que *Fusobacterium nucleatum* (*sp. polymorphum*), *Fusobacterium nucleatum* (*sp.nucleatum*) e *Prevotella nigrescens* foram as mais prevalentes (98,3%; 91,7% e 90,0%), enquanto no complexo amarelo, *S. gordonii* e *S. oralis* foram as mais

prevalentes (95,0%; 95,0%), porém com baixos níveis para *S. mitis* (86,7%) no grupo caso. Por sua vez, Bastos et al. (2011) encontraram uma prevalência de bactérias do complexo vermelho por meio de PCR em 25 pacientes com doença renal crônica com *P. gingivalis*, alcançando a maior prevalência (94,7%), e com menores concentrações, *T. denticola* (44%) e *T. forsythia* (39,1%). Já no complexo laranja, *P. nigrescens* foi a mais prevalente com 39,1%, também concordando com Farrel et al. (2012), depois *F. nucleatum* com 16% e *P. intermedia* com 13,6% respectivamente.

Um aspecto que cabe aqui ressaltar foi a ausência de significância estatística entre os parâmetros clínicos periodontais, como profundidade de bolsa (PB) e nível de inserção clínico (NIC), com a presença das espécies bacterianas entre os grupos, havendo consonância com os resultados do estudo de Villafuerte (2014), apesar da maior prevalência de todas as bactérias no grupo-caso, inferindo que o câncer de mama não foi um fator que prejudicava ainda mais o estado periodontal dessas pacientes, ou seja, as pacientes exibiram os mesmos níveis de problemas periodontais. Por sua vez, quando *P. gingivalis* foi comparada com sua presença e ausência no biofilme subgengival, verificou-se uma relação positiva com a perda dentária nos dentes superiores e inferiores no grupo com câncer de mama ($p=0,017$; $p=0,038$), o mesmo ocorrendo para *T. denticola* ($p=0,003$; $p=0,008$). Quanto à atividade da doença periodontal mensurada pelo sangramento à sondagem (SS), notou-se uma relação positiva e estatisticamente significativa ($p=0,014$) para os dentes superiores nas mulheres sem câncer de mama e com doença periodontal. Nesse caso, houve concordância com o estudo de Villafuerte (2014) e também com Socransky et al. (1998) e Socransky e Haffajee (2002), os quais afirmam que as bactérias do complexo vermelho mostram relação estatisticamente significativa com bolsas profundas e sangramento gengival.

Atualmente, cerca de um quarto das doenças malignas em todo o mundo é atribuído à contribuição microbiana. *P. gingivalis* e *F. nucleatum* têm chamado a atenção por suas capacidades de modularem o equilíbrio da microbiota e as subsequentes interações com a mucosa do hospedeiro e a imunidade (ATASANOVA; YILMAZ, 2015). A alta carga bacteriana nas superfícies dos dentes e nas bolsas gengivais durante um tempo prolongado pode, de fato, desempenhar um papel na carcinogênese (SÖDER, 2012). A espécie *P. gingivalis* é cancerígena

porque ativa uma série de respostas imunológicas inflamatórias no hospedeiro. Entre as espécies microbianas conhecidas da cavidade oral, *P. gingivalis* teve maior correlação com carcinoma epidermoide de boca (ATASANOVA; YILMAZ, 2014; INABA et al., 2014 e foi um importante fator de risco independente na associação com câncer orodigestivo (AHN; SEGERS; HAYE, 2012). Ao contrário do que tem sido relatado na literatura, neste estudo observamos que a presença de *P. gingivalis* entre os grupos não mostrou significância estatística ($p=0,075$), bem como *T. denticola* ($p=0,115$) e *T. forsythia* ($0,161$) quando se buscou associar as bactérias nos grupos. Portanto, as bactérias que mostraram associações estatisticamente significativas nos grupos foram *P. nigrescens* ($p=0,028$), corroborando com Farrel et al. (2012); *F. nucleatum* (*sp. polymorphum*) ($p=0,002$), *C. showae* ($p<0,001$), *F. periodonticum*, *S. intermedius* ($p=0,013$) e *S. gordonii* ($p<0,001$). Nas análises constatamos uma condição periodontal similar entre o grupo caso e controle, mas com maior perda dentária para o grupo caso e menor para o grupo controle, concernente com a hipótese disbiose, pois a alteração do sistema imunológico pelo estado de saúde (diagnóstico do câncer) influenciou nesse equilíbrio propiciando um ambiente adequado para as espécies patogênicas, ressaltando a necessidade de um acompanhamento periodontal dessas pacientes em especial.

A espécie *F. nucleatum* tem sido relatada em tecidos tumorais colorretais e, além disso, a carga bacteriana deste microrganismo aumenta com a progressão deste tipo de câncer (FLANAGAN, 2014; TAHARA et al., 2014). Em nossos resultados verificamos que as espécies de *Fusobacterium* apresentaram diferença estatisticamente significativa nas mulheres sem câncer de mama e com doença periodontal.

De acordo com evidências atuais, a doença periodontal está fortemente associada às bactérias do complexo vermelho, *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. gingivalis* (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002). A perda de inserção óssea está associada a um aumento na proporção de microrganismos gram negativos patogênicos e virulentos no biofilme da placa subgingival (CARRANZA JR, NEWMAN, 2007). O descuido de hábitos saudáveis de alimentação e de higiene bucal está relacionado com o desenvolvimento de infecções, a instalação do complexo vermelho e o desenvolvimento da doença periodontal (RAMOS, 2012). Nossos achados, de certa maneira, e com certas limitações (tamanho da amostra,

tipo de desenho de estudo, medidas de higiene oral pelas pacientes etc.) discordam da literatura, que afirma que o patógeno *P. gingivalis* pode ter um papel relevante em indivíduos com câncer de mama, conforme descrito. O que se observou em neste estudo foi um perfil bacteriológico predominante para bactérias (contagem média das cópias de DNA) nas mulheres sem câncer de mama e com doença periodontal (controle), com destaque para seis espécies com significância estatística, a saber, *T. denticola*, *P. micras*, *F. nucleatum (sp.polimorphum)*, *F. nucleatum (sp.nucleatum)* e *S. oralis*. Ressalta aqui que certas espécies não destacadas na literatura como a *P. gingivalis* exercem papel de patógeno chave, por uma alteração da microbiota subgengival como foi revelado nas pacientes do grupo-controle com doença periodontal, que mostrou significância com o sangramento à sondagem (SS) de $p=0,003$, levando até mesmo a perda dentária expressiva, devido em grande parte a uma precária higiene bucal, ou o não acompanhamento as sessões de profilaxia e raspagem incluídas no protocolo deste trabalho.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo e considerando as limitações pode-se concluir que:

1. As características sociodemográficas, de saúde sistêmica, comportamentais e preocupação com o tratamento odontológico da amostra demonstram semelhanças com as escassas publicações do tema na literatura;

2. Com relação aos parâmetros clínicos periodontais, as mulheres com câncer de mama e com doença periodontal apresentam mais bolsas periodontais nos dentes superiores e inferiores, porém sem significância estatística. Porém, o nível de inserção clínico e a profundidade de bolsa não evidenciam haver relação ($p < 0,05$) significativa entre os grupos, ou seja, a profundidade e o nível de inserção clínico são semelhantes entre os grupos;

3. Existem mais mulheres com bolsas periodontais profundas ($\geq 6,0\text{mm}$) no grupo controle, entretanto sem nenhuma significância estatística. A perda dentária é maior nos dentes superiores e inferiores e estatisticamente significativa nas mulheres com câncer de mama e com doença periodontal. A quantidade de placa dento-bacteriana e de inflamação gengival é semelhante nos grupos e sem significância estatística.

4. O perfil microbiológico do biofilme subgengival apresentado pelos complexos microbianos demonstra predominância de todas as bactérias no grupo-caso, mas sem significância estatística. Individualmente, as bactérias que mostram significância estatística entre os grupos são *P. nigrescens*, *F. nucleatum* (*sp. polymorphum*), *C. showae*, *F. periodonticum*, *S. intermedius* e *S. gordoni*.

5. As proporções de bactérias em relação à profundidade de bolsa e nível de inserção clínico mostram nenhuma relação de significância estatística nos grupos, apesar de maior prevalência no grupo-caso. As mulheres com câncer de mama mostram mais perda dos dentes superiores e inferiores com as presenças das bactérias *P. gingivalis* e *T. denticola* e estatisticamente significativa. Porém, a presença de *T. denticola* também é estatisticamente significativa com o sangramento à sondagem nas mulheres sem câncer de mama. A espécie *S. intermedius* teve

expressão significativa de 80% no grupo-caso. A contagem média das cópias de DNA bacteriano mostra que há um predomínio estatisticamente significativo para as bactérias *T. denticola*, *P. micras*, *F.nucleatum (sp.polymorphum)*, *F. nucleatum (sp.nucleatum)*, *C. gracilis* e *S. oralis* no grupo-controle.

REFERÊNCIAS

- AAS JA, PASTER BJ, STOKES LN, OLSEN I, DEWHIRST FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**. 2005;43 (11):5721-32.
- AINAMO J, BAY I. Problems and Proposals for Recording Gingivitis and Plaque. **Int J Dent**. v. 25, p. 229-235, 1975.
- ALI, R.W. et al. Comparative Detection Frequency of 6 Putative Periodontal Pathogens in Sudanese and Norwegian Adult periodontitis patients. **J Periodontol**. V.65. 1046-1052, 1994.
- ALMEIDA, P.F, et al. Microbiota Estreptocócica Associada com a Formação Inicial da Placa Dental. **Rev Ciênc Méd Biol**, v.1, n.1, p.33-41, 2002.
- AHN, J.; SEGERS, S.; HAYE, R. B. Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. **Carcinogenesis**. v. 33, n. 5, p. 1055-1058, 2012.
- ARO, A. R. et al. Psychological risk factors of incidence of breast cancer: a prospective cohort study in Finland. **Psychological Medicine**. v. 35, n. 10, p. 1515-1521, out. 2005.
- ARCHAMBAUD, C. et al. The Intestinal Microbiota Interferes with the microRNA Response upon Oral Listeria Infection. **Amer Soc Microbiol**. v. 4. nov-dec, 2013
- ARMITAGE, G. C. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, dez. 1999.
- ARMITAGE, G. C. Periodontal Diagnoses and Classification of Periodontal Diseases. **Periodontol 2000**, v. 34, n. 1, p. 9-21, fev. 2004.
- 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.
- ATASANOVA, K. R.; YILMAZ, Ö. Looking in the Porphyromonas gingivalis cabinet of curiosities: the microbium, the host and cancer association. **Mol Oral Microbiol**. v. 29, n. 2, p. 55-66, abr. 2014.
- ATASANOVA, K. R.; YILMAZ, Ö. Prelude to oral microbes and chronic diseases: past, present and future. **Microb Infect**. v. 17, n. 7, p. 473-483, jul. 2015.
- BERNHARD, V.R. **Condição Clínica Periodontal e Microbiológica do Biofilme Subgingival em Mulheres Portadoras de Câncer de Mama**. 79f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica - UFES, Vitória. 2015.
- CARRANZA JR, F., NEWMAN, M. G. **Periodontia Clínica**, São Paulo, Elsevier, 10ed. 2007. 1328p

CARRANZA, JR., NEWMAN, M. G., TAKEI, H. H. Periodontia Clínica, Rio de Janeiro, **Guanabara Googan**, 9 ed. 2004. 86p.

CASTELLARIN, M. et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. **Gen Res**, v. 22, n. 2, p. 299-306, 2012.

CASTRO, G. D. **Associação entre eventos de vida, ansiedade e depressão e a doença periodontal**. 2006. 118f. Dissertação. (Mestrado em Clínica Odontológica) - Programa de pós-graduação em odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

CHOCOLATEWALA, N; PANKAJ, C; DESALE, R. The role of bacteria in oral cancer. **Ind J Medical Paediatric Oncol**. v.31, nov. 2015.

COGLIANO, V. J. et al. Preventable Exposures Associated with Human Cancers. **J Natl Cancer Inst**. v. 103, n. 24, p. 1-13, dez. 2011.

COSTERTON, J. W., H. M. LAPPIN-SCOTT. 1995. Introduction to microbial biofilms, p. 1-11. In H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (ed.), Microbial biofilms. **Cambridge University Press**, Cambridge, United Kingdom.

Costerton J.W, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. 1999; 284 (5418): 1318-22.

DONLAN RM; COSTERTON JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, 2002; 15(2): 167-93.

FARRELL, J. et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. **Gut**. v. 61, p. 582-588, 2012.

FARRELL J et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. **Gut**, v. 61, p. 582-588, 2015.

FEINBERG, A.P & VOGELSTEIN, B. A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. **Anal Biochem**.v.1.p.6-13.jul, 1983

FITZPATRICK SG; KATZ J. The association between periodontal disease and cancer: A review of the literature. **J Dent**, v. 38, n. 2 , p. 83-95, fev. 2010..

FLANAGAN, L. et al. Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 33, p. 1381-1390, 2014.

FISCHER, D. J.; EPSTEIN, J. B. Management of patients who have undergone head and neck cancer therapy. **Dent Clin North Am**, v.52, n. 1, p.39-60, 2008.

FLEMING TF. Periodontitis. **An Periodontol** 4(1):32-7, 1999.

FREITAS, D. A. et al. Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. **Resv CEFAC**. v. 13, n. 6, p. 1103-1108, nov. 2011.

FREUDENHEIM LJ et al. Periodontal Disease and Breast Cancer: Prospective Cohort Study of Postmenopausal Women. **Cancer Epidemiol Biom Prevention**. University at Buffalo, dez. 2015.

GENCO, R. J. Current view of risk factors for periodontal diseases. **J. Periodontol.** v. 67, n. 10, p. 1041-1049, out. 1996.

GEBRIM, L. H. Rastreamento para câncer de mama e estadiamento. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 5, 2009.

GHIZONI, J. S. **Avaliação e correlação da doença periodontal com acidente vascular cerebral por meio da identificação e quantificação da Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans por PCR convencional e PCR em tempo real.** 2007. 116f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru.

GRIFFEN, A.L. et al. Prevalence of Porphyromonas gingivalis and Periodontal Health Status. **J Clin Microbiol.** v. 36. p.3239-3242, 1998.

HAFFAJEE A.D, SOCRANSKY SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000**; v.5:78-111, 1994.

HAFFAJEE A.D. et al. Subgingival microbiota of Chronic Periodontitis Subjects from Different Geographic Locations. **J Clin Periodontol.** v. 31.p. 996-1002, Copenhagen.nov, 2004

HAJISHENGALLIS, G; LAMONT, R.J. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Mol Oral Microbiol.** v. 27, p..409–419, 2012.

HAMLET, S. et al. Persistent Colonization with Tannerella Forsythensis and Loss of Attachment in adolescents. **J Dent Res**, v. 83, 232-235, 2004.

HAMLET, S. et al. Distribution of Actynoba actinomice, Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia in Australian Population. **J Clin Periodontol**, v.28. p. 1163-1171, 2001.

HUJOEL, P. P. et al. An Exploration of the Periodontitis–Cancer Association. **AEP.** v. 13, n. 5, p. 312-316, mai. 2003.

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

JENKINSON, H. F., LAPPIN-SCOTT, H. M. (2001). Biofilms adhere to stay. **Trends Microbiol.** v.9, p. 9–10, 201, 2001.

KAMMA, J.J. et al. Profile of Subgingival Microbiota in Children with Mixed Dentition. **Oral Microbiol Immunol.** v.15, p.103-111, 2000.

KERR, WJ. Et al. The areas of various surfaces in the human mouth from nine years to adulthood. **J Dent Res.**1991; v .70(12), p.1528-30.

KHAJURIA, N.D; METGUD, R. Role of bacteria in oral carcinogenesis. **Indian J Dent.** v.6, 2015.

KÖNÖNEM, E. Pigmented Prevotella Species in Periodontally Healthy Oral Cavity. **Immunol Medical Microbiol.** v.6, p. 201-205, 1993.

KULLER, N. The biofilm concept and its role in prevention of periodontal disease. **Rev. Clín. Pesq. Odontol**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 53-57, jan./abr. 2009.

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

LAGES, E. J. P. **Aspectos Epidemiológicos, Microbiológicos e Imunológicos da Associação entre Alcoolismo e Periodontite**. 2011. 108f. Tese. (Doutorado em Odontologia) - Colegiado de Pós-Graduação, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

LAMELL, C.W. et al. Acquisition and Colonization Stability of Actinomycetemcomitans and Porphyromonas Gingivalis in Children. **J Clin Microbiol**. v.38, p. 1196-1199, 2000.

LILLBERG, K. et al. Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. LIN, Y. et al. Striking life events associated with primary breast cancer susceptibility in women: a meta-analysis study. **J Exp Clin Res**. v. 32, p. 53, ago. 2013. **Am J Epidemiol**. v. 157, n. 5, p. 415-423, 2003.

LOPEZ, N.J. et al. Subgingival Microbiota of Chilean Patients with Chronic Periodontitis. **J Periodontol**, v.75, p. 717-725, 2004.

LY, M. et al. Altered oral viral ecology in association with periodontal disease. **Mbio**, v.5 (3), p.1133-14, 2014

LINDHE J, LILJENBERG B, ADIELSON B, BORJESSON I. Use of metronidazole as a probe in the study of human periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.10, p. 100–112, 1983.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LOESCHE, W. J. Chemotherapy of dental plaque infections. **Oral Sci Rev**, v.9, p. 65–107, 1976.

LÖE, H., THEILADE, E.; JENSEN, S. B. (1965). Experimental gingivitis in man. **J Periodontol**, v. 36, p.177–187, 1965.

MAIDEN, M.F. et al. Proposal to Conserve the Adjectival Form of Specific Epithet in the Reclassification of Bacteroides Forsythus Tanner et al. 1986 to the genus Tannerella Sakamoto et al. 2002 as Tannerella forsythia corrig., gen. nov., comb. nov. Request for an Opinion. **Int J Syst Evol Microbiol**. v.53, p.2111-2112, nov, 2003.

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

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res**, v. 8, p.263–271, 1994

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiol**, v. 149, p.279–294, 2003.

McCLELLAN, D.L. et al. Age and Prevalence of Porphyromonas Gengivallis in children. **J Clin Microbiol.**, v.34, p. 2017-2019, 1996.

MACHTEI, E.E. et al. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. **J Clin Periodontol**, v.26, p. 374-380, 1999.

MEURMAN, JH. Oral microbiota and cancer. **J Oral Microbiol.**v.2, p.5195, 2010.

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 Oncol.** v.9, n. 6, p. 550-558, jun. 2008.

MICHAUD, D. S. et al. Plasma antibodies to oral bacteria and risk of pancreatic cancer in a large European prospective cohort study. **Gut**, v. 62, n. 12, p. 1764–1770, 2013.

MOMBELLI, A. et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas Gengivallis in young Chinese adults. **Oral Microbiol Immunol.** v.13, p. 231-237, 1998.

MOORE, W. E. C. et al. Bacteriology of Moderate (chronic) Periodontitis in Mature Adult Humans. **Infect Immun**, v. 42, n. 2, p. 510-515, nov. 1983.

NORSKOV-LAURITSEN, N. and KILIAN, M. Reclassification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus paraphrophilus and Haemophilus sanguis as Aggregatibacter actinomycetemcomitans gen. nov. comb.nov., Aggregatibacter aphirophilus com.nov.and Aggregatibacter seguis comb.nov., emended description of Aggregatibacter aphirophilus to included V factor-dependent and V factor-independent isolates. **Int J Syst Evol Microbiol.** v.56, p. 2135-2146, 2006.

ÖHRN, K. E. O.; WAHLIN, Y.; SJÖDÉN, P. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. **Support Care Cancer**, v. 9, n. 4, p. 247-257, 2001

PADILLA, C. et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. **J Periodontal Res.** v. 41, p. 350-353, 2006.

PAPAPANOU, P.N., et al. Subgingival Microbiota in Adult Chinese. Prevalence and Relation to Periodontal Disease Progression. **J Periodontol.** v.68, p.651-666, 1997.

PAPAPANOU, P.N., et al. Periodontal Microbiota and Clinical Periodontal Status in a Rural Sample in Southern Thailand. **Euro J Oral Sci**, v.110, p.345-352, 2002.

PASTER, J.B; DEWHIRST, F.E. Molecular Microbial Diagnosis. **Periodontol 2000.** v 51, p. 38–44, 2009.

PETERSON, D. E. et al. Microbiology of Acute Periodontal Infection in Myelosuppressed Cancer Patients. **J Clin Oncol.** v. 5, n.9, p. 1461-1468, set. 1987.

RABER-DURLACHER, J. E. et al. Periodontal infection in cancer patients treated with high-dose chemotherapy. **Support Care Cancer**. v. 10, p. 466-473, 2002.

RAMOS, M. M. B. **Condições periodontais e presença de microrganismos do complexo vermelho de Socransky na boca de pacientes com e sem dependência química**. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP. São Paulo.

RAJEEV, R., et al. Role of bacteria in oral carcinogenesis. **South Asian J Cancer**. nov, 2015.

ROSIER, B.T. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.4, jul, 2014.

SAKAMOTO, M.; et al. Reclassification of bacteroides (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythii* corrig. gen. nov., comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**. v.52, p. 841-849, 2002.

SANTOS, M. C. et al. Association between stress and breast cancer in women: a meta-analysis. **Cad Saúde Pública**. v. 25, n. 3, p. S453-S463, 2009.

SANZ, M. et al. Differences in the Composition of the subgingival microbiota of two Periodontitis Population of Different Geographical Origin. A Comparison between Spain and the Netherlands. **Eur J Oral Science**. V.108. 363-392, 2000.

SAYEHMIRI, F. et al. The prevalence rate of *Porphyromonas gingivalis* and its association with cancer: A systematic review and meta-analysis. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 28, n. 2, p. 160-167, jun. 2015

SOCRANSKY et al. Checkboard DNA-DNA Hybridization. **Biotechniq**. v. 17, n. 4, p. 788-792, out. 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. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v.25, n. 2, p.134-144, 1998.

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

SÖDER, B. et al. The association of dental plaque with cancer mortality in Sweden. A longitudinal study. **BMJ Open**. v. 2, n. 3, jun. 2012.

TAHARA, T. et al. Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. **Cancer Res**. v. 74, n. 5, p. 1311-1318, 2014.

TANNER, A.C., et al. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. **J Dent Res**. v.81. p. 53-57, jan 2002.

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

THEILADE, E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. **J Clin Periodontol.** v.13, p.905–91, 1986

THEILADE, E., WRIGHT, W.H., JENSEN, S.B., and Löe, H. Experimental gingivitis in man. II. a longitudinal clinical and bacteriological investigation. **J Periodontal Res.** v.1, p.1–13, 1966.

TOTARO, M. C. et al. Porphyromonas gingivalis and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. **Arthritis Res The.** v. 15, n. R66, 2013.

TREVIZANI FILHO, E.; SANI NETO, J. **Manual de Periodontia.** Editora Atheneu. 2002, 74p. São Paulo.

TURNBAUGH PJ. et al. The human microbiome project. **Nature.** v.44, p.: 804–810, 2007.

TANNER, A.C., et al. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. **J Dent Res.** v.81. p. 53-57, jan, 2002.

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

THEILADE, E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. **J Clin Periodontol.** v.13, p.905–91, 1986

THEILADE, E., WRIGHT, W.H., JENSEN, S.B., and Löe, H. Experimental gingivitis in man. II. a longitudinal clinical and bacteriological investigation. **J. Periodontal Res.** v.1, p.1–13, 1966.

TIMMERMAN, M.F. et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Longitudinal clinical and microbiological baseline data. **J Clin Periodontol.** v.25, p.215-224, 1998.

TIMMERMAN, M.F. et al. Untreated Periodontal Disease in Indonesian Adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. **J Clin Periodontol.** v.28, p.617-627, 2001.

TREVIZANI FILHO, E.; SANI NETO, J. **Manual de Periodontia.** Editora Atheneu. 2002, 74p. São Paulo.

TOTARO, M. C. et al. Porphyromonas gingivalis and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. **Arthritis Res The.** v. 15, n. R66, 2013.

TURNBAUGH PJ. et al. The human microbiome project. **Nature.** v.449, p. 804–810, 2007

VAN DER VELDEN, U., et al. The natural development of periodontitis; risk factors, risk predictors and risk determinants. **J Clin Periodontol,** v.33, p.540-548, 2006.

VILLAFUERTE, K. R. V. **Avaliação das condições periodontais em mulheres portadoras de câncer de mama sob tratamento quimioterápico.** 2014. 96f.

Dissertação (Mestrado em Peridontia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

WHITMORE, S. E.; LAMONT, R. J. Oral bacteria and cancer. **PLOS Pathogen**. v. 10, n. 3, mar. 2014.

WIKOFF, W. R., et al. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v.106, p.3698–3703, 2009..

YANG, E.Y., et al. Periodontal pathogen detection in gingiva-tooth and tongue flora samples from 18 to 48 month old childrens and periodontal status of their mothers. **Oral Microbiol Immunol**. v. 17. p.1-64, Febr, 2002.

YANG, X., et al. More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: estimating gene numbers inside a human body, 2009. **Nature**.

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO ANAMNÉSICO MÉDICO-ODONTOLÓGICO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Clínica Odontológica
Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica
NUPET – Núcleo de Periodontia

QUESTIONÁRIO ANAMNÉSICO MÉDICO-ODONTOLÓGICO PARA CÂNCER DE MAMA

Data: ___/___/___

Dados pessoais:

Nome: _____

Idade: _____ Estado civil: _____

Endereço: _____ N° _____

Compl. _____

Bairro: _____ Município: _____ UF: _____

CEP: _____

Telefone: _____

Hábitos de Vida:

Tabagista:

sim somente no passado não

Se sim ou somente no passado, quantos por dia: _____

Idade que começou a fumar: _____ Idade que parou: _____

Etilista:

sim somente no passado não

Se sim ou somente no passado, Tipo de bebida: _____

quantos dias por semana: _____

quantidade de garrafas, latas ou doses aproximadamente: _____

Há quantos anos parou de beber: _____

Doenças já diagnosticadas:

Hipertensão sim não diabetes sim não depressão sim não

Ansiedade sim não cardiopatias sim não Especificar: _____

Neoplasias sim não Especificar: _____

Outra(s) _____

Medicações sim não

Descrever: _____

Histórico da doença atual

Data de diagnóstico: ___/___/___

Protocolo Terapêutico:Esvaziamento Linfático: sim nãoQuimioterapia: sim não

Tipo: _____ n° de ciclos: _____

Início: ____/____/____ término: ____/____/____

Quimioterápico(s): _____

Radioterapia: sim não

Início: ____/____/____ término: ____/____/____

N° de sessões: _____

Hormonioterapia com Tamoxifeno: sim não

Início: ____/____/____ término: ____/____/____

Histórico Odontológico:Já visitou o Dentista alguma vez? sim não

Se sim, com que frequência? _____ -

Já fez tratamento de gengiva alguma vez? sim não

Se sim, há quanto tempo? _____

Possui alergia a alguma substância? sim não

Se sim, qual(quais)? _____

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/CEP do CCS/UFES Tel: 3335-7211 Email:
cep.ufes@hotmail.com

ANEXOS

ANEXO A - CARTA DE ACEITE DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CASSIANO ANTONIO DE MORAES – HUCAM



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes - HUCAM

Vitória-ES, 22 de maio de 2014.

De: Prof.Dr.Luiz Alberto Sobral Jr.
Diretor-Superintendente do HUCAM

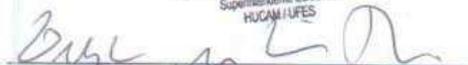
Para: Prof.Dr.Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa
Associado Periodontia/DCO-CCS-UFES

CARTA DE ACEITE

Informo a quem de direito que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITOS DAS TERAPIAS ANTIN-NEOPLÁSICAS DO CÂNCER DE MAMA SOBRE CONDIÇÕES CLÍNICAS PERIODONTAIS, NÍVEL ÓSSEO ALVEOLAR, MICROBIOTA SUBGENGIVAL E RESPOSTA INFLAMATÓRIA" sob Coordenação Geral do Prof.Dr.Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa, lotado no Departamento de Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo foi aceito para realizar tal investigação junto ao Serviço de Mastologia do HUCAM visando atender o CEP/CCS-UFES Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Luiz Alberto Sobral V. Junior
Superintendente EBSEPH
HUCAM/UFES


Prof.Dr. Luiz Alberto Sobral Vieira Jr.
Diretor do HUCAM

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, (nacionalidade) _____ residente e domiciliado à Rua _____, telefone _____, na cidade de _____, Estado de _____, fui convidada a participar da pesquisa intitulada: **EFEITOS DAS TERAPIAS ANTI-NEOPLÁSICAS DO CÂNCER DE MAMA SOBRE PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS, MICROBIOTA SUBGENGIVAL, NÍVEL ÓSSEO ALVEOLAR E RESPOSTA INFLAMATÓRIA**, sob responsabilidade de Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa.

1. **Justificativa:** A periodontite é a inflamação das gengivas e pode levar até a perda dos dentes. É causada pela presença da placa dentária, uma camada composta por bactérias localizada na superfície dos dentes (coroas dentárias ou raízes dentárias) que causam esta inflamação. A inflamação da gengiva é influenciada pela resposta imune do hospedeiro por meio de moléculas chamadas de citocinas. As citocinas que atuam nas doenças da gengiva são encontradas no fluido gengival e as principais são: IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α . Deste modo, uma resposta imune pronta para a infecção periodontal crônica tem sido proposta como um potencial fator etiológico carcinogênico. Estudos apontam que as mudanças das bactérias da boca frente aos anti-neoplásicos são inadequadas e pouco compreendidas até o presente, mas, durante a quimioterapia existe uma alteração no aumento de bactérias bastonetes gram-negativas em até 50% dos pacientes.
2. **Objetivo da Pesquisa:** O objetivo desta pesquisa é avaliar a presença de inflamação na gengiva, das bactérias da gengiva inflamada e a presença de substâncias responsáveis por essa inflamação gengival.
3. **Procedimentos:** Para participar desse estudo o indivíduo voluntário não pode ser fumante, deve ter a periodontite crônica ou agressiva, não ter sofrido tratamento nas gengivas, nem tomado antibióticos ou utilizado bochechos com antissépticos nos últimos 6 meses; e não estar grávida. Os participantes voluntários serão submetidos a exames completos dos dentes e das gengivas durante o período do estudo. Os atendimentos serão realizados no Ambulatório II do Instituto de Odontologia por profissionais formados em Odontologia sob a supervisão dos professores de Periodontia do Departamento de Clínica Odontológica da UFES. Os exames clínicos periodontais, questionário anamnésico odontológico e odontograma serão realizados em todas as pacientes selecionadas no projeto. As coroas dos dentes receberão profilaxia periodontal por meio da raspagem das superfícies dentárias e das coroas dentárias sem anestesia local para remover a placa dental para evitar contaminação no momento da coleta da placa dental subgengival. Espécimes de placa dentária serão coletados com curetas metálicas e o fluido gengival será coletado por meio de cones de papel esterilizados para a realização do exame das bactérias e das moléculas (citocinas) da inflamação gengival. Logo após as coletas, todos os dentes receberão raspagem e alisamento radicular manual e/ou com ultrassom, polimento das coroas dentárias, aplicação tópica de fluoreto de sódio (1,23%), orientação de higiene oral e uso de soluções para bochechos que ajudam no controle dos germes da boca para evitar a formação da placa dentária causadora das inflamações nas gengivas. Os espécimes de placa dental subgengival e do fluido gengival ano serão armazenados em freezer com temperatura de -80°C em ambiente de sala fria do Núcleo de Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Estes espécimes serão utilizados somente e tão somente para esta pesquisa e ao final do período de realização da pesquisa, os espécimes residuais ou remanescentes serão descartados por meio de esterilização em autoclave. A consulta odontológica neste estudo terá uma duração de aproximadamente 40 minutos. Os indivíduos que necessitarem de outros tratamentos serão encaminhados às diferentes especialidades nas Clínicas do Instituto de Odontologia.
4. **Duração e Local da Pesquisa:** Os atendimentos serão realizados no Ambulatório II do IOUFES sob a orientação dos Professores de Periodontia (Gengiva) da UFES durante o período do estudo.
5. **Riscos, Desconfortos e Benefícios:** Existem riscos mínimos durante a realização do exame da gengiva e dos dentes, tais como, um leve desconforto durante o ato de introdução da sonda periodontal metálica ou da cureta dentro da bolsa periodontal, e leve dor ao toque da sonda exploradora metálica para a verificação de cárie. Estes procedimentos são simples, na maioria das vezes, indolores, uma vez que são de rotina na prática médica odontológica. As coletas da placa dental para análise das bactérias e do fluido gengival são feitas por meio de curetas e cones de papel esterilizados dentro da bolsa periodontal mantidos por 60 segundos e são indolores. O risco é sangramento da gengiva após a introdução dos cones durante segundos. Caso haja sensibilidade dolorosa acentuada, a alternativa clínica é o uso da anestesia local apropriada da região. Nos casos clínicos de maior complexidade, o paciente receberá o tratamento por fase, ou seja, com intervalos maiores entre os procedimentos clínicos e a nova consulta odontológica.
6. **Acompanhamento e Assistência:** Todos os que receberem tratamentos nas gengivas serão posteriormente acompanhados na Clínica de Periodontia para permanecerem no programa de manutenção ou de suporte do controle de placa dental para evitar efeitos e condições adversas oriundas do não controle adequado de higiene bucal ou ainda, se por ventura, de algum dano reversível durante a realização do ato operatório não cirúrgico. O participante que apresentar algum dano comprovadamente inspecionado pela equipe de pesquisadores terá garantia da realização de procedimentos gengivais visando restabelecer a condição de saúde clínica gengival e será mantido em programa de revisão na Clínica de Periodontia da UFES.
7. **Direito de Recusa em participar da Pesquisa:** A participação na pesquisa não é obrigatória e caso algum dos participantes selecionados se recuse em participar, isso não resultará em nenhum tipo de penalidade ou prejuízo

para os mesmos, podendo a qualquer momento se retirar da pesquisa. Todos os voluntários participantes da pesquisa receberão uma via (cópia) do termo de consentimento livre e esclarecido.

8. **Garantia de Manutenção do Sigilo e Privacidade:** Nenhum resultado será relatado com identificação pessoal do participante. Todos os cuidados serão tomados para manutenção do sigilo de sua identidade. Ao conceder o direito de retenção e uso de quaisquer documentos para fins de ensino e divulgação (dentro das normas vigentes) em jornais e revistas científicas do país e estrangeiras, será mantida a devida preservação do segredo profissional, a menos que a quebra seja por uma exigência judicial.
9. **Ressarcimento Financeiro:** Nenhuma ajuda financeira será concedida aos participantes, pela Instituição ou pela equipe de pesquisadores, relativa à participação na pesquisa, uma vez que nesta pesquisa não há recebimento financeiro de nenhum órgão ou entidade para pagar a participação de cada voluntário na pesquisa.
10. **Esclarecimento de Dúvidas:** Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou perante a necessidade de reportar qualquer injúria ou dano relacionado com o estudo, eu devo contatar o pesquisador Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa, nos telefones (27) 3335-7273/3335-7276/3335-7237 ou (27) 9999-4793 ou no endereço: Av. Marechal Campos, 1468 - Maruípe, Vitória-ES. Caso não consiga contatar o pesquisador ou para relatar algum problema, posso contatar o Comitê de Ética e Pesquisa do CCS/UFES pelo telefone (27) 3335-7211 ou correio, através do seguinte endereço: Universidade Federal do Espírito Santo, Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Prédio da Administração do CCS, CEP: 29040-090, Vitória-ES, Brasil.

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o teor do presente documento entendendo todos os termos acima expostos, como também, os meus direitos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelo pesquisador.

Na qualidade de pesquisador responsável pela pesquisa **EFEITOS DAS TERAPIAS ANTI-NEOPLÁSICAS DO CÂNCER DE MAMA SOBRE PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS, MICROBIOTA SUBGENGIVAL, NÍVEL ÓSSEO ALVEOLAR E RESPOSTA INFLAMATÓRIA**, Eu, Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa, declaro ter cumprido as exigências da Resolução CNS 466/12, a qual estabelece diretriz e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

VITÓRIA-ES, ____ de _____ de 201_.

Voluntário Participante da Pesquisa

Nome do Pesquisador Responsável pelo Projeto

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/CEP do CCS/UFES Tel: 3335-7211 Email:
cep.ufes@hotmail.com

ANEXO C - APROVAÇÃO PELO CEP/CCS-UFES/PLATAFORMA BRASIL

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DE TERAPIAS ANTI-NEOPLÁSICAS DO CANCER DE MAMA SOBRE A DOENÇA PERIODONTAL.

Pesquisador: ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 21597313.2.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 862.952

Data da Relatoria: 25/11/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo epidemiológico com desenho observacional descritivo. Esta pesquisa possui um delineamentos epidemiológico e terapêutico periodontal.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar parâmetros clínicos, radiográficos, microbiológicos e imunológicos dos efeitos das terapias antineoplásicas sobre as condições clínicas da doença periodontal em pacientes com câncer de mama.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Existem riscos mínimos durante a realização do exame da gengiva e dos dentes, tais como, um leve desconforto durante o ato de introdução da sonda periodontal metálica ou da cureta dentro da bolsa periodontal, e leve dor ao toque da sonda exploradora metálica para a verificação de cárie. Estes procedimentos são simples, na maioria das vezes, indolores, uma vez que são de rotina na prática médica odontológica. As coletas da placa dental para análise das bactérias e do fluido gengival são feitas por meio de curetas e cones de papel esterilizados dentro da bolsa periodontal mantidos por 60 segundos e são indolores. O risco é sangramento da gengiva após a introdução dos cones durante segundos. Caso haja sensibilidade dolorosa acentuada, a alternativa clínica é o

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 862.952

uso da anestesia local apropriada da região. Nos casos clínicos de maior complexidade, o paciente receberá o tratamento por fase, ou seja, com intervalos maiores entre os procedimentos clínicos e a nova consulta odontológica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este estudo tem por finalidade conhecer os possíveis patógenos periodontais, a natureza da inflamação, por meio da identificação de citocinas anti-inflamatórias, e avaliar a resposta do hospedeiro frente às terapêuticas periodontais adotadas no sentido de eliminar as inflamações periodontais ou pelo menos reduzir a carga bacteriana presente nas bolsas periodontais das pacientes com câncer de mama.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O regulamento do biorrepositório foi aprovado pelo departamento de Clínica Odontológica, de acordo com o extrato de ata apresentado.

Riscos detalhados na Plataforma Brasil.

Participação apenas do Hospital HUCAM na pesquisa constando na Plataforma Brasil

Recomendações:

Sem

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Cronograma adequado com datas após aprovação pelo Comitê de Ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Telefone: (27)3335-7211

Município: VITORIA

CEP: 29.040-031

E-mail: cep@ccs.ufes.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 862.952

VITORIA, 07 de Novembro de 2014

Assinado por:
Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni
(Coordenador)

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br