UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de CTBMF e Periodontia

FELIPE TORRES DANTAS

**Perfil de citocinas no fluido crevicular gengival de pacientes
portadoras de câncer de mama com periodontite crônica**

Ribeirão Preto/SP
2016

FELIPE TORRES DANTAS

**Perfil de citocinas no fluido crevicular gengival de pacientes
portadoras de câncer de mama com periodontite crônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção de título de Mestre em Periodontia.

Orientadora: Prof. Dra. Daniela Bazan Palioto

Ribeirão Preto/SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dantas, FelipeTorres

Perfil de citocinas no fluido crevicular de pacientes portadora de câncer de mama com periodontite crônica, 2016.

110 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Palioto, Daniela Bazan.

1. Periodontite crônica. 2. Câncer de mama. 3. Inflamação. 4. Sistema imunológico. 5. Citocinas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANTAS, F. T. Administração tópica do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 reduz a destruição tecidual periodontal em ratos com periodontite experimental: estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico. 2016. 110f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia). Área de concentração: Periodontia

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

À minha mãe **Moema**,

Por ser exemplo único de amor incondicional, honestidade, humildade e perseverança na minha vida. Por nunca ter sido oposta às minhas escolhas e ter acreditado no meu potencial, vibrado comigo a cada conquista e lutado ao meu lado nas piores batalhas da vida. O homem que eu sou hoje é fruto de uma educação repleta de ética e moral vindos da senhora. Serei grato eternamente à essa guerreira que nunca mediu esforços para me ver bem e feliz. Você foi capaz de de abrir mão dos próprios sonhos para que eu realizasse os meus. MUITO OBRIGADO!

Ao meu irmão **Fredy**,

Pela amizade e torcida. Muito obrigado por ver, em mim, exemplo a ser seguido e por ter me representado diante da nossa família durante a minha ausência. Tudo isso foi fundamental na minha motivação para concretização desse sonho.

À minha avó **Mira** (*in memoriam*) e **Tia Badinha**,

Meus maiores tesouros, minha fortaleza e grandes exemplos de fé. Durante o tempo que estive longe da família e dos amigos, todos os ensinamentos passados por elas foram a linha de frente nas batalhas diárias. “Lutar sempre e nunca desistir. Tenha fé em Deus”. Eu amo muito vocês! Obrigado por tudo!

À minha namorada **Ana Tereza (Teka)**,

Por ser o meu porto seguro e fonte inesgotável de inspiração, carinho, amor e compreensão. Muito obrigado por ter caminhado ao meu lado durante esses anos, mesmo longe fisicamente. Foram muitos momentos difíceis mas eu nunca me senti sozinho porque eu tinha você comigo. Que toda a minha ausência seja revertida em um futuro promissor ao seu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, que sempre esteve presente na minha vida guiando os meus passos e mostrando qual o melhor caminho para seguir. Foi através da minha fé que eu consegui forças para enfrentar os obstáculos dessa jornada.

Às minhas **famílias, Torres e Dantas**, por compreenderem a minha ausência e por me mandarem, sempre, energias positivas.

Ao meu pai, **Genário**, que mesmo longe, sempre, acreditou no meu potencial e vibrou comigo a cada conquista.

Ao meu padrinho, **Alfredo**, que assumiu comigo um grande compromisso e tem ajudado muito na minha caminhada educacional.

À **família de Teka** por todo carinho, respeito e confiança. Obrigado por proporcionar que a gente se encontrasse em Ribeirão Preto ou em Salvador.

Aos meus amigos **Fernanda e Victor** por terem me acolhido em Ribeirão Preto, assumindo o papel de família.

Em especial, à minha orientadora **Professora Daniela Bazan Palioto** por participar de forma ativa do meu crescimento pessoal e profissional. Muitas vezes me questioneei sobre o “Se vira! Eu quero a solução do problema!” que ouvia sempre dela, mas hoje eu entendo que isso foi fundamental para o meu amadurecimento, uma vez que as respostas prontas encurtam o caminho mas não preparam o homem para o futuro. Desde o início confiou no meu trabalho e aceitou minhas idéias, sendo peça fundamental na realização deste trabalho. Além de ter lutado por mim quando precisei. Muito Obrigado!

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Periodontia da FORP-USP, **Prof. Arthur Belém Novaes Júnior, Prof. Sérgio Luiz Scombatti de Souza, Prof. Mário Taba Júnior e Prof. Michel Messor** por todo conhecimento passado durante nossas incansáveis discussões no campo da Periodontia e Implantodontia. Foi uma grande experiência conviver com mestres que são referências nacionais e internacionais da área.

Ao **Prof. Márcio Grisi** pela inúmeras oportunidades oferecidas tanto na FORP-USP quanto na sua Clínica particular. Aprender novas abordagens e

tecnologias para tratamento das doenças periodontais, ao seu lado, foi uma experiência única.

Aos docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, **Prof. Hélio Humberto Angotti Carrara** e **Prof. Francisco José Candido dos Reis** por me acolherem no HC e assumirem o compromisso, juntamente com nossa equipe, para a realização deste trabalho. Obrigado pelas grandes trocas de conhecimentos.

À minha turma do mestrado, **Sérgio Lago**, **Carla Oliveira**, **Milena Irie**, **Jéssica Carvalho**, **Gabriel Bastos**, **Luiz Fernando** e **Camila Costa** pela amizade e companheirismo durante essa jornada. Tenho muito orgulho de ter feito parte dessa turma, a qual sempre carregou consigo o lema “a união faz a força.” Obrigado por tudo, galera!

Em especial, ao irmão que o mestrado me deu, **Sérgio Lago**, por esses quase três anos de uma grande amizade verdadeira. Você foi parte fundamental para esta conquista. Compartilhamos momentos bons e ruins, durante esta trajetória, e sempre que eu precisei pude contar com seu apoio. Assim como, as minhas grande amigas **Carla e Milena** por todo carinho, companhia e pelos inúmeros momentos que me diverti com vocês. Levarei, para sempre comigo, essa amizade.

À minha companheira de trabalho, **Kelly Vargas** por toda ajuda durante esses anos. Posso dizer com orgulho que esse trabalho é nosso. Muito Obrigado. Nossa luta continua!

Aos amigos do doutorado em Periodontia da FORP-USP, **Marcos Invernici**, **Paula Pessôa**, **Mariana Sales**, **Cristine Borges**, **Felipe Santos**, **Nicole Frota**, **Gustavo Vieira**, **Umberto Ramos**, **Carolina Rego** e **Carolina Delmondes** por todo apoio e amizade durante esta trajetória.

A todos os funcionários da FORP-USP, em especial à **Dani**, **Dona Joana** e **Dona Su**, funcionárias da Clínica de Pós-graduação, e a **Tati**, **Dulce** e **Dani**, secretárias do departamento de CTBMF e Periodontia, por todo carinho e ajuda. Sem vocês o nosso trabalho diário seria muito mais difícil. Obrigado!

À amiga **Dra. Rose Franco** pela grande parceria na consolidação da Clínica PerioMed e nos atendimentos aos pacientes com comprometimento sistêmico.

À técnica do laboratório de biologia molecular da FORP-USP, **Milla Tavares** e à colega **Camila Costa** pelo grande aprendizado laboratorial, durante o processamento das amostras.

À técnica do Laboratório de Inflamação e Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, **Caroline Fontanari**, pela ajuda no processamento das amostras e dosagem das citocinas do estudo.

À **Professora Fabiani Gai Frantz**, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pela coparticipação na dosagem das citocinas e interpretação dos resultados.

À toda equipe da **Unidade de Pesquisa Clínica (UPC)** e da **Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (FAEPA)** pela atenção e respeito com que nos acolheram e realizaram os exames hematológicos dos nossos pacientes.

A **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pela minha bolsa de mestrado, e a **FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo)** pelo suporte financeiro ao projeto.

À **equipe de enfermagem** do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, pelo respeito e atenção com que abraçaram o nosso projeto. Em especial à **Luci, Rose e Alaíde** que demonstraram um carinho imenso por nossa equipe e nossas pacientes.

A **todos os meus amigos** que acompanharam a minha caminhada, compartilharam comigo todas as conquistas e me ajudaram nas situações difíceis.

A todas nossas **pacientes** pela confiança, por terem aceitado participar do estudo e contribuído para o desenvolvimento científico. Em especial àquelas mulheres que aceitaram participar mesmo após o diagnóstico do câncer. Nós sabemos o quanto é difícil um momento como esses, mas elas encararam com fé e perseverança a nossa proposta... hoje eu só tenho a dizer: **MUITO OBRIGADO!**

“O que vale na vida não é o ponto de partida e, sim, a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

DANTAS, Felipe Torres. **Perfil de citocinas no fluido crevicular de pacientes portadora de câncer de mama com periodontite crônica**. 110 f. il. 2016. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Departamento de CTBMF e Periodontia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2016.

RESUMO

A doença periodontal é uma doença infecciosa na qual em resposta à microbiota subgengival, o hospedeiro libera uma série de citocinas inflamatórias que levam à degradação dos tecidos periodontais. Esses mediadores não se restringem ao nível gengival e disseminam-se pelo organismo, causando impacto na saúde sistêmica. Atualmente, tem sido sugerido que a inflamação associada ao câncer é similar àquela vista em inflamações crônicas. Citocinas dentro de processos neoplásicos podem atuar na resposta imune antitumoral ou estimular o desenvolvimento do câncer. Desta forma, este trabalho objetivou caracterizar o perfil inflamatório apresentado por pacientes portadoras de câncer de mama com e sem periodontite crônica, avaliando os parâmetros clínicos periodontais (índice de placa – IP, sangramento à sondagem – SS, profundidade de sondagem – PS, nível clínico de inserção – NCI) e ao dosar as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-1 β em fluido crevicular gengival (FCG). Para isso, foram selecionadas 90 mulheres voluntárias, alocadas em 4 grupos: saudáveis (SAU) (n=20), doença periodontal (DP) (n=20), câncer de mama (CAN) (n=25) e câncer de mama com DP (CAN-DP) (n=25). As concentrações das citocinas foram determinadas pela metodologia LUMINEX. Além disso, foram realizados exames laboratoriais como proteína C-reativa, glicemia em jejum, triglicérides, colesterol total, colesterol LDL e HDL e leucograma em amostras de sangue periférico. Todos dados foram estatisticamente analisados. Os grupos DP e CAN-DP apresentaram maiores valores de IP, SS, PS e NCI ($p < 0,05$). Entre os quatro grupos, não houve diferença significativa nos exames hematológicos ($p > 0,05$), exceto o grupo DP que apresentou níveis de neutrófilos mais elevados que os grupos SAU, CAN e CAN-DP ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística nos níveis de IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ e IL-10 entre os quatro grupos ($p > 0,05$). O grupo DP apresentou significantes níveis de IL-17 e TGF- β , IL-6 e IL-1 β em relação ao grupo SAU ($p < 0,05$). No grupo CAN-DP, níveis IL-17 e TGF- β foram estatisticamente maiores do que no grupo CAN ($p < 0,05$). As citocinas IL-6 e IL-1 β também estavam mais elevado no CAN-DP, porém sem diferença em relação ao grupo CAN ($p > 0,05$). Mulheres com câncer de mama e doença periodontal apresentaram um perfil de citocinas com características pró-inflamatórias, evidenciado pela significativa expressão do perfil Th17/IL-17. Além disso, o perfil Treg (TGF- β) também estava aumentado. A combinação Th17/IL-17 e Treg (TGF- β) pode ter impacto nas atividades pró-tumorigênicas no microambiente tumoral. Diante disso, a doença periodontal comportou-se como um fonte de mediadores inflamatórios relacionados com imunopatogênese do câncer de mama.

Palavras-chave: Periodontite crônica; Câncer de mama; Inflamação; Sistema imunológico; Citocinas.

DANTAS, Felipe Torres. **Cytokines profile in gingival crevicular fluid of breast cancer patients with chronic periodontitis**. 110 pp. ill. 2016. Master Dissertation – School of Dentistry of Ribeirão Preto, Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2016.

ABSTRACT

Periodontal disease is an infectious disease which in response to subgingival microbiota, the host releases a number of inflammatory cytokines that lead to degradation of periodontal tissues. These mediators are not restricted to the gingival level, and spread on blood, causing systemic health impact. Currently, it has been suggested that inflammation associated with cancer is similar to those seen in chronic inflammation. Cytokines in neoplastic processes may act in anti-tumor immune response or stimulate cancer development. Thus, this study aimed to characterize the inflammatory profile presented by patients with breast cancer with and without chronic periodontitis, evaluating the clinical periodontal parameters (plaque index - PI, bleeding on probing - BOP, probing depth - PD, clinical attachment level - CAL) and dose cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β and IL-1 β in gingival crevicular fluid (GCF). Ninety volunteers women were selected, divided into 4 groups: healthy (H) (n=20), chronic periodontitis (CP) (n=20), breast cancer (BC) (n=25) and breast cancer with CP (BC-CP) (n=25). Concentrations of cytokines were determined by Luminex method. In addition, laboratory tests were performed as C-reactive protein, fasting blood glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol and white blood cell count in peripheral blood samples. All data were statistically analyzed. CP and BC-CP groups had higher values PI, BOP, PD, and CAL ($p < 0.05$). Among four groups, there was no significant difference in blood tests ($p > 0.05$), except the PC group that showed higher levels of neutrophils than H, BC, BC-CP groups ($p < 0.05$). There was no statistical difference in IL-2 levels, IL-4, TNF- α , IFN- γ and IL-10 among the four groups ($p > 0.05$). CP group showed significant levels of IL-17 and TGF- β , IL-6 and IL-1 β compared to H group ($p < 0.05$). In CAN-PD group, IL-17 and TGF- β levels were significantly higher than the CAN group ($p < 0.05$). IL-6 and IL-1 β cytokines were also higher in CAN-DP, but without difference compared to the CAN group ($p > 0.05$). Women with breast cancer and periodontal disease showed a pro-inflammatory profile of cytokines, as evidenced by significant expression profile Th17/IL-17. Furthermore, Treg profile (TGF- β) was also increased. Th17/Treg and IL-17 (TGF- β) in combination may have an impact on pro-tumorigenic activities in the tumor microenvironment. Therefore, periodontal disease behaved as a source of inflammatory mediators related to breast cancer immunopathogenesis.

Keywords: Chronic periodontitis; Breast cancer; Inflammation; Immune system; Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Coleta do fluido crevicular gengival. A) Remoção da placa supragengival. B) Coleta de FCG com tiras de Periopaper® (Oralflow Inc., Amityville, NY, EUA). C) Corte das tiras de Periopaper®. D) Tiras de Periopaper® armazenadas em frascos esterilizados tipo eppendorf..... 46
- Figura 2 -** Concentração das citocinas pró-inflamatórias em fluido crevicular gengival, em pg/mg. Dot Plot mostra as medianas. A) IL-2; B) IFN- γ ; C) TNF- α , D) IL-6, E) IL-17, F) IL-1 β 57
- Figura 3 -** Concentração das citocinas antiinflamatórias em fluido crevicular gengival, em pg/mg. Dot Plot mostra as medianas e percentis (25 e 75). A) IL-4; B) IL-10; C) TGF- β 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas e histológicas do câncer de mama nos grupos CAN e CAN-DP.....	53
Tabela 2 -	Dados demográficos e clínicos (médias e desvio padrão).....	54
Tabela 3 -	Exames hematológicos (médias e desvio padrão).....	55
Tabela 4 -	Medianas e percentis das citocinas pró-inflamatórias.....	59
Tabela 5 -	Medianas e percentis das citocinas antiinflamatórias.....	60

LISTA DE ANEXOS

Anexo A –	Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética.....	83
Anexo B –	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	85
Anexo C –	Artigo Científico Submetido para Publicação no Periódico <i>Journal of Periodontology</i>	87
Anexo D –	Comprovante De Submissão Do Artigo Científico Ao Periódico <i>Journal of Periodontology</i>	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Periodontia
CO	Câncer oral
COX-2	Ciclooxigenase-2
DP	Doença periodontal
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAEPA	Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FCG	Fluido crevicular gengival
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Fn	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FN-κB	Fator nuclear kappa-beta
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês, <i>high-density lipoprotein</i>
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-17	Interleucina-17
IL-1α	Interleucina-1 alfa
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IP	Índice de placa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês, <i>low-density lipoprotein</i>
mg/dL	Miligramas por decilitro

MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinase de matriz, do inglês, <i>matrix metalloproteinase</i>
NCI	Nível clínico de inserção
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
°C	Grau <i>Celsius</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Periodontite crônica
PCR	Proteína C-reativa
Pg	<i>Porphyromonas gingivallis</i>
pg/mg	Picograma por miligrama
pg/mL	Picograma por mililitro
PS	Profundidade de sondagem
SS	Sangramento à sondagem
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator de crescimento tumoral-beta
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> -1
Th17	Linfócitos T <i>helper</i> -17
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> -2
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
Treg	Linfócitos T-regulatórios
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
≤	Menor ou igual a (símbolo matemático)
≥	Maior ou igual a (símbolo matemático)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 Inflamação e Periodontite Crônica.....	26
2.2 Inflamação e Câncer de Mama.....	30
2.3 Associação entre Doença Periodontal e Câncer.....	33
3 PROPOSIÇÃO.....	38
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Aspectos éticos.....	41
4.2 Cálculo do tamanho da amostra.....	41
4.3 Seleção dos pacientes.....	42
4.4 Delineamento do estudo.....	43
4.5 Calibração do examinador.....	44
4.6 Coleta dos parâmetros clínicos.....	44
4.7 Coleta das amostras.....	45
4.7.1 Fluido Crevicular Gengival.....	45
4.7.2 Sangue Periférico.....	46
4.8 Processamento das amostras.....	47
4.8.1 Fluido Crevicular Gengival.....	47
4.8.2 Sangue Periférico.....	48
4.9 Análises estatísticas.....	49
4.9.1 Parâmetros Clínicos.....	49
4.9.2 Parâmetros Imunológicos.....	49
4.9.3 Parâmetros Hematológicos.....	50
5 RESULTADOS.....	51
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais (DP) são comumente relacionadas à perda dentária e caracterizam-se por um conjunto de condições inflamatórias que têm, como fator etiológico primário, o biofilme subgengival, formado, principalmente, por bactérias anaeróbicas gram-negativas produtoras de uma série de fatores de virulência. Estes fatores atuam diretamente na destruição dos tecidos do periodonto, assim como interferem na resposta imunológica do hospedeiro. No entanto, é na resposta inflamatória em que são ativados leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, que produzem e secretam mediadores inflamatórios, caracterizando a imunopatogênese da DP (HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2012).

Segundo a Academia Americana de Periodontia – AAP (2001), a gengivite induzida por biofilme é a forma mais comum de doença periodontal, sem perda de inserção clínica, definida como uma inflamação gengival resultante do biofilme dentário. Já a periodontite é definida como uma alteração inflamatória e destrutiva dos tecidos de suporte do dente (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar), levando à perda progressiva destas estruturas (ARMITAGE, 2000).

Dentre as formas mais comuns de periodontite, está a periodontite crônica (PC). Estudos têm demonstrado que as DP, especialmente a PC, não afetam indivíduos de uma população da mesma maneira. Embora as bactérias estejam bem estabelecidas como os principais agentes etiológicos, na maioria dos casos, a sua presença, por si só, não é capaz de desencadear o início e a progressão da doença, estando envolvidas em uma etiologia multifatorial que associa predisposição genética, condição sistêmica e fatores ambientais (OPPERMANN *et al.*, 2015).

Fatores de risco como tabagismo e diabetes *mellitus* modificam a resposta imune do hospedeiro e, portanto, interferem no curso da doença, sua gravidade e resposta ao tratamento. Além disso, existe um grande número de evidências relevantes da associação entre periodontite e outras condições sistêmicas como, por exemplo, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares e intercorrências gestacionais (LINDEN, LYONS, SCANNAPIECO, 2013). Isso pode ser explicado pelo fato de as bactérias periodontais apresentarem uma infinidade de fatores de virulência que induzem células a produzirem mediadores inflamatórios, os quais não se restringem ao nível gengival e, ao entrarem na corrente sanguínea, disseminam-

se pelo organismo, causando impacto mensurável na inflamação sistêmica (VAN DYKE & VAN WINKELHOFF, 2013).

Dentre as condições sistêmicas associadas à periodontite, ainda é desconhecida a possível ligação entre o câncer e as DP, fato que estudos científicos têm tentado elucidar, uma vez que essa doença representa um grave e contínuo problema de saúde pública, sendo uma causa importante de morbimortalidade. O câncer gera uma resposta imunoinflamatória no organismo, com expressiva produção de mediadores inflamatórios e caracteriza-se como um processo desordenado que se inicia quando uma célula normal sofre mutação genética, podendo invadir, por metástase, outras partes do corpo (PENDYALA *et al.*, 2013). Segundo o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (BRASIL, 2016), o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres, contemplando 25% dos novos casos de câncer a cada ano. Esta neoplasia tem baixa incidência antes dos 35 anos de idade e, após esta faixa etária, este índice cresce rápida e progressivamente, especialmente, após os 50 anos.

A imunopatogênese do câncer é compreendida a partir do momento em que o organismo perde o controle dos processos celulares vitais, levando as células tumorais a expressarem antígenos alterados, em relação às células normais, ou específicos de tumores, na sua superfície. Dessa forma, os antígenos desencadeiam uma resposta imunoinflamatória, envolvendo uma variedade de células e marcadores inflamatórios, integrando, assim, os sistemas imunes inato e adaptativo para eliminação das células malignas. Para Pendyala *et al.* (2013), a inter-relação entre inflamação e câncer pode ser explicada por duas vias consistentes. A primeira, é a via extrínseca, na qual um estado inflamatório constante (inflamação crônica) contribui para o aumento do risco de câncer, e a segunda é a via intrínseca, em que alterações genéticas adquiridas levam ao desenvolvimento da neoplasia maligna.

Atualmente, tem sido sugerido que a inflamação associada ao câncer é similar àquela vista em inflamações crônicas. Em tecidos neoplásicos são encontrados macrófagos ativados, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células *natural killers* (NK), linfócitos TCD4⁺ (LTCD4⁺) e TCD8⁺ (LTCD8⁺) específicos e imunoglobulinas, citocinas, proteases extracelulares, fatores pró-angiogênicos e quimiocinas. Esses fatores-chave da inflamação podem ter papel na supressão do tumor por estímulo da resposta imune antitumoral, porém, mais frequentemente, sob

certas condições, parecem estimular o desenvolvimento do câncer. A intensidade e a natureza do processo inflamatório poderiam explicar essa aparente contradição (PENDYALA *et al.*, 2013).

Existem vários mecanismos potenciais que tentam explicar a possível associação entre doença periodontal e câncer de mama. Uma dessas explicações é que patógenos periodontais tenham impacto diretamente na carcinogênese pelo acúmulo nos tecidos mamários após bacteremia, causada por atividades do cotidiano como escovação dentária, uso do fio dental e mastigação, especialmente entre aqueles com doença periodontal, ou pelos metabólitos bacterianos, como nitrosaminas e acetaldeído, os quais poderiam ter um efeito sobre a gênese do câncer. Outro mecanismo potencial é que a inflamação resultante da periodontite crônica está associada com inflamação sistêmica, incluindo o aumento da proteína C-reativa, citocinas e quimiocinas no sangue, os quais podem participar da carcinogênese mamária (FREUDENHEIM *et al.*, 2016).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Inflamação e Periodontite Crônica

A periodontite crônica é reconhecida como a forma mais prevalente das periodontites, acometendo, principalmente, adultos (acima dos 35 anos), embora possa surgir em qualquer idade. Esta é uma doença infecciosa na qual, em resposta à microbiota subgengival, o hospedeiro libera citocinas inflamatórias e enzimas, que são responsáveis pela maior parte da degradação dos tecidos periodontais, levando à perda de inserção clínica e osso alveolar (SILVA *et al.*, 2015).

O biofilme bacteriano relacionado à periodontite crônica é representado por bactérias anaeróbicas gram-negativas, dentre as quais se destacam *Tannerella forsythia* (Tf), *Treponema denticola* (Td), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), agrupados em complexos. Tais microrganismos induzem um desequilíbrio nas respostas inflamatória e imunológica do hospedeiro, levando à gênese da PC (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Investigações no campo da periodontia atual têm proposto um novo modelo de patogênese no qual a periodontite é iniciada por uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica ao invés de patógenos periodontais específicos, como o "complexo vermelho". Nesta sinergia polimicrobiana, diferentes membros ou combinações de genes específicos dentro da comunidade desempenham papéis distintos que convergem para formar e estabilizar uma microbiota provocadora de doença. Um dos requisitos fundamentais para uma comunidade potencialmente patogênica envolve a capacidade de certas espécies, denominadas "patógenos-chave", para modular a resposta do hospedeiro de maneira que prejudica a vigilância imunológica e pende a balança da homeostase para disbiose (HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2012).

A imunopatogênese da periodontite crônica é decorrente do constante influxo de leucócitos em direção ao sulco gengival (KORNMAN, PAGE, TONETTI, 1997), sendo o caminho migratório orientado pela ação de inúmeros mediadores inflamatórios (MUKAIDA *et al.*, 1992), dentre esses, uma variedade de citocinas

produzidas por diferentes tipos celulares. As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que orquestram as respostas imunes e inflamatórias. Essas proteínas envolvem as interleucinas (IL), os interferons (IFN), fatores de necrose tumoral (TNF), fatores estimuladores de colônia e fatores de crescimento. Tem sido postulado que um perfil de citocinas características de uma resposta linfocitária Th1/Th2, individualmente ou em combinação, pode modular a resposta do hospedeiro frente à infecção periodontal. O balanço Th1/Th2, além de depender do estágio da DP, pode estar relacionado a uma resposta imune com características destrutivas ou de homeostasia tecidual (protetora) (TENG, 2002).

A principal função das células T auxiliares é amplificar a resposta imune. Em geral, as citocinas Th1 favorecem o desenvolvimento de uma resposta imune celular, promovendo inflamação excessiva e dano tecidual, enquanto citocinas Th2 favorecem uma resposta imune humoral, mediada por anticorpos e relacionada a reparo tecidual. As principais citocinas produzidas pelas células Th1, participantes na dinâmica das DP, são IL-2, INF- γ e TNF, sendo consideradas citocinas pró-inflamatórias. Sob as mesmas condições, as células Th2 produzem, principalmente, a IL-4, IL-10 e TGF- β , citocinas antiinflamatórias e a IL-6, pró-inflamatória. Além dessas, existem citocinas pró-inflamatórias originadas de outras células como a IL-1 β , produzida por linfócitos B, macrófagos, monócitos, células NK e células dendríticas (KINANE, 2000; EBERSOLE *et al.*, 2013).

A IL-2 é uma citocina produzida, em sua maioria, por linfócitos LTCD4⁺, e está relacionada ao crescimento de células T e células NK. Além disso, aumenta a produção de outras citocinas como IFN- γ e IL-4 e potencializa a morte apoptótica das células T antígeno-ativadas. Com característica pró-inflamatória, tem ação na regulação de células B e atua na reabsorção óssea na doença periodontal (SEYMOUR *et al.*, 1985).

Produzido por células NK, LTCD8⁺ e LTCD4⁺ do subtipo Th1, o IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos, os quais ativados produzem metabólitos tóxicos para os microrganismos e, uma vez mantida a agressão bacteriana e a consequente liberação do IFN- γ , há persistência do quadro inflamatório (MACCALLI, SCARAMUZZA, PARMIANI, 2009). Esta citocina exerce um papel importante na imunidade mediada por células, uma vez que, promove diferenciação dos LTCD4⁺ virgens para subpopulação Th1 e interfere na diferenciação e proliferação das

células Th2 através da inibição da IL-4 (JOHNSON & SERIO, 2007; TSAI *et al.*, 2007; DUTZAN *et al.*, 2009).

O TNF- α é uma citocina que se encontra presente em altos níveis no fluido crevicular gengival e nos tecidos periodontais doentes, sendo o principal sinal para apoptose celular e produção de IL-6 (IACOPINO & CUTLER, 2000), relacionada a uma potente resposta inflamatória, reabsorção óssea alveolar e perda de inserção conjuntiva. Sua produção é, principalmente, por macrófagos e monócitos, porém outras células participam da sua síntese como linfócitos T e B, células NK e células não-imunes, a exemplo dos fibroblastos, osteoblastos e células tumorais (MACCALLI, SCARAMUZZA, PARMIANI, 2009). Esta citocina age na ativação de células endoteliais vasculares permitindo a adesão de linfócitos e extravasamento para o sítio da infecção. O TNF- α , juntamente com outras citocinas, como IL-1 β , induz produção de metaloproteinases de matriz (MMP), havendo maior evidência da ação destas citocinas na destruição tecidual e na resposta imune ligadas à inflamação periodontal (BEKLEN *et al.*, 2007).

A IL-4 é uma citocina produzida, principalmente, por linfócitos TCD4⁺ da subpopulação Th2. Atua como fator de crescimento autócrino para as próprias células T, induzindo diferenciação Th2 e regula negativamente a resposta Th1. É também o principal fator de crescimento para células B, aumentando a secreção de IgG e IgE. Esta citocina inibe a produção de IL-1 β e IFN- γ pelos monócitos, com isso, na sua ausência há aumento da secreção desses mediadores inflamatórios, a qual é relacionada à atividade e à progressão de doença periodontal (KAMMA *et al.*, 2009).

A IL-6 é uma citocina com múltiplas funções, produzida por monócitos, macrófagos, queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos, e atua tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa. Na doença periodontal é relatada como participante da formação e ativação osteoclástica e consequente reabsorção óssea. Entre suas outras funções estão: diferenciação de células B, diferenciação e crescimento das células T, estímulo na secreção de IgA e IgG, indução na síntese de proteínas de fase aguda (proteína C-reativa) pelos hepatócitos, angiogênese, hematopoese, alteração da permeabilidade vascular e ativação do sistema complemento. Seu comportamento na inflamação é considerado duplo, uma vez que age como citocina antiinflamatória diminuindo o recrutamento de neutrófilos e a expressão de citocinas pró-inflamatórias e, também, tem atividade pró-inflamatória

ao induzir reações de fase aguda pelo fígado em doenças crônicas (SHIMADA *et al.*, 2010; NIBALI *et al.*, 2012).

Produzida por células T, células B, monócitos e queratinócitos, a IL-10 é uma citocina Th2 que possui um importante papel na supressão da resposta inflamatória, inibindo a síntese das citocinas IL-6 e TNF, suprimindo inúmeras atividades de células apresentadoras de antígenos, inibindo macrófagos (*feedback* negativo) e a ativação de células T (GAMONAL *et al.*, 2000; LLANES-FERNANDEZ *et al.*, 2006).

TGF- β é uma citocina pleiotrópica pertencente ao grupo das células T reguladoras (Treg), a qual regula a indução e a atividade das células T efetoras controlando respostas imunes exacerbadas (DUTZAN *et al.*, 2009), sendo também importante no metabolismo do tecido conjuntivo durante a PC (BABEL *et al.*, 2006). Apresenta papel modulador, aumenta o reparo cicatricial, acelera a remodelação de tecido conjuntivo e promove angiogênese. A ausência de TGF- β provavelmente contribui para a destruição periodontal (BABEL *et al.*, 2006). Portanto, maiores níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC estariam ocorrendo não somente como forma de modular a resposta inflamatória frente à persistente agressão bacteriana, mas também para minimizar a extensão do tecido lesado durante a evolução da PC (CARDOSO *et al.*, 2008).

A IL-1 β é expressa na inflamação periodontal, principalmente, por macrófagos e células dendríticas, porém fibroblastos gengivais, células do ligamento periodontal e osteoblastos também podem secretá-la. Essa citocina recruta células inflamatórias, facilita a degranulação de leucócitos polimorfonucleares, aumenta a síntese de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e MMP, inibe a síntese de colágeno e ativa linfócitos B e T (IACOPINO & CUTLER, 2000; GRAVES & COCHRAN, 2003; SANCHEZ *et al.*, 2013).

Nesse contexto, as células Th17 ativadas produzem a IL-17, uma citocina pró-inflamatória que induz um perfil distinto de citocinas efetoras relacionadas à exacerbação da inflamação e danos teciduais. A IL-17 é relatada como potente indutora de reabsorção óssea e inibidora da osteogênese. A presença de células produtoras dessa citocina tem sido vista em tecidos gengivais de pacientes com periodontite quando comparado com controles saudáveis (CHENG, HUGHES, TAAMS, 2014).

2.2 Inflamação e Câncer de Mama

A neoplasia mamária é uma doença crônica, de evolução imprevisível, resultante da interação de fatores genéticos e ambientais como, por exemplo, o estilo de vida, obesidade, tabagismo, etilismo. Esta interação pode gerar mutações hereditárias, nas células germinativas, ou esporádicas, nas células somáticas, que podem tornar as células capazes de proliferar e migrar, escapando dos controles de morte celular programada (apoptose). Ao acumularem mutações, as células podem sofrer transformação maligna e metastatizar (PENDYALA *et al.*, 2013). Devido à alta incidência e mortalidade do câncer de mama, há necessidade de esforços para identificar e compreender o comportamento biológico desta neoplasia, assim como sua influência em outras patologias.

As células inflamatórias são recrutadas para dentro dos processos neoplásicos e, inicialmente, são potentes promotores tumorais por criar um ambiente favorável para o crescimento do tumor, facilitando a instabilidade genômica e promovendo a angiogênese. Mais tarde, nesse processo, as células malignas redirecionam mecanismos inflamatórios em favor da expansão neoplásica e metástase. Os LTCD8⁺ e as células NK são as principais células efetoras envolvidas na imunidade antitumoral, as quais atuam na eliminação das células alteradas, principalmente, por ativação de mecanismos apoptóticos e/ou lise por citotoxicidade. Além disso, os LTCD4⁺ são ativados por reconhecimento de antígenos na superfície de fagócitos e liberam muitas citocinas e mediadores inflamatórios. Essa produção dessas biomoléculas estabelece uma estreita comunicação entre a imunidade inata e adaptativa. Dentre os principais mediadores solúveis na inflamação relacionada ao câncer de mama estão: IL-2, IFN- γ , interleucinas da família IL-1 (IL-1 α e IL-1 β), TNF, IL-6 e TGF- β (NICOLINI, CARPI, ROSSI, 2006).

A IL-2 é uma citocina que participa da resposta antitumoral. Em combinação com a IL-12, favorece a apoptose dentro dos tumores por mecanismos dependentes de IFN- γ . Essa combinação inibe angiogênese e a destruição de células endoteliais associadas ao tumor e regressão tumoral. Esse tipo de resposta conta com o auxílio do IFN- γ , que ativa macrófagos e aumenta seu poder de fagocitose e produção de IL-12 (PENDYALA *et al.*, 2013).

Os macrófagos ocupam papel central no combate as células neoplásicas por produzir diversas citocinas e espécies reativas de oxigênio (óxido nítrico - NO) e liberar enzimas lisossomiais e sintetizar TNF- α em grandes quantidades. Em contrapartida, o TNF- α é uma citocina produzida por células imunes, malignas e estromais que tem como mecanismos diretos a expansão e sobrevivência tumoral, aumento da angiogênese, da liberação de quimiocinas e enzimas da degradação da matriz extracelular. Muitos carcinomas são associados com altas concentrações de TNF- α , o qual inibe a atividade da tirosina fosfatase que, por sua vez, resulta na diminuição da expressão de MHC de classe I na superfície celular, permitindo, dessa forma, que as células escapem da vigilância do sistema imune (GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010).

Nesse contexto, a IL-1, IL-6, TNF- α são conhecidas por aumentar a capacidade de metástase, devido ao pontencial de afetar vários pontos da cascata de inflamação e disseminação. A IL-6 é uma citocina anti-apoptótica e reguladora do crescimento celular, induzindo proliferação de células malignas e estromais por aumentar a produção de proteínas anti-apoptóticas e angiogênicas. Em linhagens de células de câncer de mama e em amostras desses tumores, altas concentrações dessa citocina têm sido relacionadas com pior resposta às terapias do câncer e redução da sobrevivência (SNOUSSI *et al.*, 2005; GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010). Contudo, a IL-6 também apresenta atividade antitumoral por induzir diferenciação das células T e B, estimular células T citotóxicas e aumentar a síntese de proteína C reativa, a qual liga-se a fosfolipídios das células tumorais e ativam o sistema complemento, levando à lise celular (BARTON, 2005; NISHIMOTO, 2010).

Da mesma forma, interleucinas da família IL-1 (IL-1 α e IL-1 β) são frequentemente expressas em linhagens de células do câncer de mama e no microambiente tumoral. Estas citocinas agem por mecanismos autócrinos e parácrinos que contribuem para atividades pró-tumorigênicas como, por exemplo, angiogênese, proliferação e invasão tumoral local. Além disso, provém crescimento do tumor e metástase por induzir vários genes pró-metastáticos, como metaloproteinases, quimiocinas, fatores de crescimento e TGF- β . A associação das interleucinas IL-1 β e IL-6 também estimula a proliferação das células malignas da mama por ativação de enzimas catalisadoras no tecido, que levam a produção de

estrógeno. Esse tipo de câncer é hormônio-dependente e isso favorece o seu desenvolvimento (SNOUSSI *et al.*, 2005; NICOLINI, CARPI, ROSSI, 2006).

O TGF- β tem papel importante nos mecanismos de evasão da vigilância imunológica pelo câncer. Essas proteínas são expressas por células tumorais e agem inibindo linfócitos e modificando a expressão de moléculas de adesão endoteliais, o que diminui o influxo de células inflamatórias para o ambiente tumoral, diminuindo a inflamação e, conseqüentemente, a resposta imune local (PENDYALA *et al.*, 2013).

O padrão de citocinas Th2, representado pelas IL-4 e IL-10, está presente no microambiente tumoral. Estas citocinas podem mediar a imunossupressão. A IL-10, citocina pleiotrópica, tem efeito inibitório na função e proliferação de células T, bloqueia a apresentação de antígenos por macrófagos e células de Langerhans, assim como, a apresentação de antígenos associados ao tumor. A capacidade da IL-10 em inibir a resposta imune no sítio tumoral tem implicações importantes na imunoterapia do câncer. Além disso, essa citocina tem forte associação com outros marcadores envolvidos no câncer de mama (LLANES-FERNANDEZ *et al.*, 2006).

Estudos têm demonstrado que níveis elevados de células Th17 no microambiente do câncer de mama, e conseqüentemente da citocina pró-inflamatória IL-17, estão associados com aumento do risco de metástase e pior prognóstico. Entretanto, os autores destacam que novos estudos são necessários para investigar os verdadeiros mecanismos envolvidos nessa relação. Apesar disso, acredita-se que essa citocina apresenta diferentes funções a depender das condições ambientais do tumor, desempenhando um papel na resposta inflamatória antitumoral ou de promoção do tumor (CHEN *et al.*, 2013; COFFELT *et al.*, 2015).

Além disso, mediadores inflamatórios comuns, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), ciclooxigenase-2 (COX-2) e o fator nuclear Kappa (NF-kB), podem conduzir condições celulares favoráveis para a promoção do tumor. Michaud *et al.* (2007) relatam que no estado inflamatório, ocorre um aumento da proliferação celular e mutagenese, redução da adaptação ao estresse oxidativo, promoção da angiogênese e inibição da apoptose. Todos estes fatores podem atuar favorecendo a carcinogênese (SCHETTER, HEEGAARD, HARRIS, 2010).

2.3 Associação entre Doença Periodontal e Câncer

A doença periodontal tem um impacto direto sobre a resposta imune e tem sido associada a várias doenças crônicas, incluindo a aterosclerose e acidente vascular cerebral. Poucos estudos têm examinado a associação entre a doença periodontal e câncer. Há evidências de que inflamação crônica provocada por agentes bacterianos ou virais é um fator de risco para o câncer, uma vez que pode estimular transformações cancerígenas (HUSSAIN E HARRIS, 2007; LIN & KARIN, 2007; VOGTMANN & GOEDERT, 2016). Por exemplo, a infecção crônica pelo *Helicobacter pylori* tem sido associada ao câncer gástrico, doença inflamatória intestinal e câncer colorretal (MANTOVANI, 2010). Cirrose hepática alcoólica, infecções por hepatite B e C levam à inflamação crônica do fígado e são responsáveis pela maioria dos carcinomas hepatocelulares em todo o mundo. Outras doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, são associadas ao aumento das taxas de adenocarcinoma de cólon (SCHETTER, HEEGAARD, HARRIS, 2010).

O *Fusobacterium nucleatum* (Fn), um microrganismo prevalente em sítios subgingivais, associado à doença periodontal, tem sido encontrado como espécie predominante associada ao câncer colorretal (HAN, 2014). Mitsuhashi *et al.* (2015) detectaram espécies de Fn em tecidos de câncer de pâncreas e associaram a um pior prognóstico dessa neoplasia. Outro periodontopatógeno, a *Porphyromonas gingivallis* (Pg), tem sido associada à carcinogênese do pâncreas (MICHAUD, 2013) e esôfago (GAO *et al.*, 2016). Isso demonstra que os microrganismos não ficam restritos aos tecidos periodontais e têm acesso à corrente sanguínea e tecidos adjacentes, estimulando a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios que afetam vias metabólicas complexas e podem, assim, estar envolvidos na carcinogênese (MEURMAN, 2010; RAJEEV *et al.*, 2012). Em modelo animal, Binder Gallimidi *et al.* (2015) também mostraram que Fn e Pg estimulam a carcinogênese oral via alterações diretas com células epiteliais. Além disso, a DP pode contribuir para o estabelecimento de uma condição inflamatória sistêmica em indivíduos geneticamente suscetíveis, conhecidos como "fenótipo hiper-inflamatório", potencializando o aumento da produção de marcadores inflamatórios relacionados

ao sistema imunológico (VAN KEMPEN, DE VISSER, COUSSENS, 2006; PENDYALA *et al.*, 2013).

Em revisão sistemática atual, Javed e Warnakulasuriya (2016) analisaram 12 estudos de caso-controle com objetivo de investigar a associação entre doença periodontal e câncer oral (CO), além de discutir o papel da inflamação crônica do periodonto na causa do câncer. Os autores relataram um aumento de 2,5 vezes no risco de CO entre pacientes com DP quando comparados a controles saudáveis. Associado a isso, a perda de dentes, perda óssea alveolar, perda do nível clínico de inserção e pobre higiene oral também foram correlacionados com aumento do risco de câncer em alguns estudos. Entretanto, quando fatores de confundimento, como álcool e tabaco, foram ajustados esse risco foi atenuado. Narayan *et al.* (2014) também mostraram que doença periodontal, tabagismo, falta de visitas ao dentista e escovação dental inadequada são associados significativamente com aumento do risco de câncer oral.

Resultados semelhantes foram observados em estudo de coorte, no qual 19.933 homens nunca fumantes foram acompanhados durante 26 anos para investigação da doença periodontal e risco de vários cânceres. Foi observado que periodontite avançada e menos de 17 dentes remanescentes estavam associados a um aumento de 2,5 vezes em cânceres relacionados com o tabagismo entre os que nunca fumaram, como por exemplo, câncer de pulmão, bexiga, cabeça e pescoço, orofaringe, esôfago, rim, estômago e fígado, quando comparados aos sem DP e com mais de 17 dentes. Por outro lado, a periodontite não foi associada com o câncer de próstata, câncer colorretal ou melanoma, o que era esperado por serem cânceres comuns em uma coorte de pessoas que nunca fumaram. Os autores discutem que a periodontite pode afetar o risco de câncer através de desregulação do sistema imunológico e alterações nas vias de sinalização do câncer por patógenos orais. Nesse contexto, mais estudos para examinar o impacto imunológico e microbiológico da periodontite avançada sobre câncer são necessários (MICHAUD *et al.*, 2016).

Hujoel *et al.* (2003) avaliaram 11.328 pacientes com idade entre 25 e 74 anos, por meio de um estudo longitudinal prospectivo, e concluíram que indivíduos com periodontite apresentavam uma forte associação com a ocorrência de câncer de pulmão quando comparados a indivíduos periodontalmente saudáveis. Além disso, a ausência de dentes também foi correlacionada com risco de câncer. Todavia, foi

relatada a necessidade de estudos futuros para controlar fatores de confundimento, a exemplo do tabagismo que é fator de risco para o câncer de pulmão. Os autores explicam que a plausibilidade biológica dessa relação pode ser suportada pelo fato de os indivíduos aspirarem biofilme bacteriano, o qual pode causar doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer. Nessa investigação, outros cânceres, como de próstata, mama e pâncreas, mostraram uma leve associação com a DP. Entretanto, para Chang *et al.* (2016), a DP apresenta uma associação significativa com o aumento do risco de câncer de pâncreas.

Uma revisão de literatura demonstrou que há forte grau de evidência da associação da doença periodontal com câncer oral, além de associações positivas com outros cânceres, como de mama, esôfago, gástrico, de pulmão, de próstata e hematológico. A plausibilidade biológica que suporta estes achados é o fato de a inflamação crônica ser o fator principal em ambas as doenças e poder influenciar na carcinogênese. Entretanto, são necessários novos estudos, principalmente para ajuste de fatores confundidores, como álcool e tabaco, e padronização dos parâmetros clínicos periodontais para diagnóstico da doença periodontal (FITZPATRICK & KATZ, 2010).

Tanwir, Sadia e Duashaukat (2012), ainda na linha de investigação de que a infecção crônica e a inflamação persistente são ligadas ao aumento do risco de câncer, mostraram, em uma revisão de literatura, que existe associação entre doença periodontal e perda de dentes na progressão de vários tipos de câncer, independente dos fatores de risco conhecidos, como álcool e tabaco. Para esses autores existe um componente genético significativo que aumenta o risco de DP e câncer. Este trabalho reforça outros achados de uma pesquisa anterior, realizada em uma população japonesa, que investigou a relação entre perda dental e risco de câncer em 15.720 pacientes. Os resultados mostraram que a diminuição do número de dentes foi associada ao aumento do risco de câncer de cabeça e pescoço, seguido pelos cânceres de pulmão, próstata e mama (HIRAKI *et al.*, 2008).

Michaud *et al.* (2008), através de um estudo de coorte prospectivo, acompanharam 48.375 profissionais de saúde do gênero masculino, por aproximadamente 17,7 anos, e observaram que a doença periodontal auto-relatada e a ausência de dentes (0-16 dentes remanescentes) foram associados significativamente com cânceres de pulmão, rim, pâncreas e hematológicos. Além disso, a DP foi associada com um pequeno, mas significativo, aumento do risco de

câncer geral. Dessa forma, os autores sugerem que a DP pode ser um marcador de sistema imune susceptível ou pode afetar diretamente o risco de câncer. Em um revisão sistemática sobre doença periodontal, perda de dentes e risco de câncer, Sadighi Shamami e Amini (2011) mostraram que existe uma possível ligação entre esses fatores. Foi discutido que a DP pode ser considerada um fator de risco para câncer geral, bem como para câncer oral, gástrico, de esôfago.

Apesar de estudos relacionados às condições periodontais e os diferentes tipos de câncer, são encontrados na literatura poucos trabalhos que investigaram a associação direta entre o câncer de mama e DP. Uma pesquisa avaliou a associação entre doença periodontal e a incidência de câncer de mama, através de um estudo longitudinal prospectivo com 3.273 indivíduos entre 30 e 40 anos de idade, acompanhados durante 16 anos, e encontrou maior incidência do câncer de mama nos pacientes que tinham doença periodontal e algum dente molar perdido na mandíbula (5,5%) quando comparados com indivíduos com DP mas sem dente molar perdido (0,5%), sendo essa associação estatisticamente significativa ($p < 0,02$). Os pesquisadores destacaram que a perda de algum molar na mandíbula pode ser preditor independente para câncer de mama. Entretanto, vale ressaltar que essa perda pode ocorrer por outros fatores além da DP, os quais, geralmente, também envolvem infecções crônicas, como cáries e abscessos endodônticos. Assim, esse estudo foi baseado no paradigma infecção/inflamação crônica *versus* câncer e futuras investigações são necessárias (SÖDER *et al.*, 2011).

Em um estudo transversal do tipo caso-controle, Amódio *et al.* (2014) avaliaram o efeito do câncer de mama e de seu tratamento na saúde oral, em 48 mulheres pós-menopausa com câncer de mama (casos – idade média: 62 anos) comparadas com 48 mulheres sem histórico de câncer (controles – idade média: 61 anos). Observou-se que o tratamento oncológico associado às mudanças orais durante a menopausa e a condição de higiene oral das pacientes pode ser responsável pelo agravamento da condição periodontal das mesmas. Além disso, as pacientes com câncer e DP apresentaram maior número de dentes ausentes (média de 16 dentes remanescentes), maiores índice de placa e índice gengival quando comparadas com as pacientes que apresentavam DP sem o câncer.

Mais recentemente, um estudo de coorte prospectivo que acompanhou 73.737 mulheres pós-menopausa, com idades entre 50 e 79 anos, por um período de 6,7 anos mostrou um significativo aumento do risco de câncer de mama invasivo

entre mulheres que reportaram história de doença periodontal, particularmente entre ex-fumantes que pararam de fumar nos últimos 20 anos (aproximadamente 26,1%). Os autores discutem que a presença de periodontopatógenos na região do tumor mamário e mediadores da inflamação crônica tem papel ativo na carcinogênese e poderiam explicar essa associação. Além disso, destacam a necessidade de novas pesquisas, incluindo estudos em animais e com controle dos fatores de confundimento, como tabaco, para investigar o possível papel da microbiota oral na gênese do tumor mamário (FREUDENHEIM *et al.*, 2016).

Por outro lado, tem sido reportado na literatura que tumores de mama podem metastizar para mandíbula, tecidos moles orais e glândulas salivares, apesar de ser considerado um evento raro. Relatos de casos clínicos têm descrito a participação de células malignas, originadas de tumor mamário, em lesões gengivais na mandíbula mimetizando lesões periodontais, com presença de edema, mobilidade dentária, supuração, sangramento e perda óssea radiográfica. Para esses autores existem diferentes teorias para explicar a predileção das células malignas pelos tecidos gengivais, uma delas é que a inflamação pode direcionar eventos para atrair essas células, como também a expressão de moléculas de adesão vascular e enzimas tumorais que interferem na patogênese da metástase (OGUTCEN-TOLLER, METIN, YILDIZ, 2002; POULIAS, MELAKOPOULOS, TOSIOS, 2011; KECHAGIAS *et al.*, 2012). Em uma análise mais atual da literatura, Allon *et al.* (2014) mostraram que a gengiva é o local mais comum de metástase dos tecidos moles orais, com forte associação com a presença de dentes, e que a inflamação gengival tem papel fundamental na atração de células metastáticas.

Em busca de uma associação entre periodontite crônica e neoplasia maligna da mama, o presente trabalho objetivou caracterizar o perfil inflamatório apresentado por pacientes portadoras de câncer de mama com e sem periodontite crônica, avaliando os parâmetros clínicos periodontais e a resposta linfocitária em fluido crevicular gengival, bem como analisar as condições sistêmicas por meio de exames laboratoriais complementares.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 *Objetivo geral*

Avaliar o perfil de citocinas no fluido crevicular gengival de pacientes portadoras de câncer de mama com periodontite crônica.

3.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar parâmetros clínicos periodontais (índice de placa – IP, sangramento à sondagem - SS, profundidade de sondagem – PS, nível clínico de inserção – NCI) em pacientes com câncer de mama e/ou periodontite crônica.
- Analisar os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-1 β) e antiinflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β), no fluido crevicular gengival, em pacientes com câncer de mama e/ou periodontite crônica.
- Dosar proteína C-reativa (PCR), glicemia em jejum, triglicérides, colesterol total, colesterol LDL e HDL e realizar leucograma (neutrófilos) em sangue periférico de pacientes com câncer de mama e/ou periodontite crônica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) – Universidade de São Paulo (USP) e aprovado sob o protocolo nº 37030514.7.0000.5419 (**Anexo A**). Após a aprovação, as pacientes foram convidadas a participar, como voluntárias, da pesquisa e, ao concordarem, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo B**), o qual possuía informações detalhadas a respeito da pesquisa (objetivos, benefícios, riscos e desconfortos). As informações coletadas foram mantidas sob sigilo, assim como as identidades foram preservadas. Apesar de não ser o objetivo principal desta pesquisa, as pacientes foram encaminhadas para tratamento periodontal na Clínica de Periodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FORP-USP antes do início da quimioterapia.

4.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo de tamanho amostral foi realizado pelo programa *Power test*. O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos, neste estudo, foi calculado considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrão entre os grupos com e sem câncer, e entre os grupos com e sem periodontite crônica, com nível de significância de 5%, sendo necessários 20 indivíduos em cada grupo, totalizando 80 pacientes. Além disso, foram usados como referências dados do estudo de Becerik *et al.* (2012), o qual investigou citocinas em fluido crevicular gengival e proteínas de fase aguda no plasma de pacientes com diferentes doenças periodontais.

4.3 Seleção dos pacientes

Foram selecionadas 90 pacientes do gênero feminino, voluntárias, com idades entre 35 e 70 anos, sendo 50 diagnosticadas com câncer de mama pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), das quais 25 apresentavam periodontite crônica e 25 não apresentavam. As outras 40 participantes, provenientes da Clínica de Periodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FORP-USP, não tinham câncer de mama e também foram divididas em grupos com (n=20) e sem (n=20) periodontite crônica.

Os grupos foram divididos da seguinte forma:

- a) **G1**: 20 pacientes **sem** câncer e **sem** doença periodontal (SAU);
- b) **G2**: 20 pacientes **sem** câncer e **com** doença periodontal (DP);
- c) **G3**: 25 pacientes **com** câncer de mama e **sem** doença periodontal (CAN);
- d) **G4**: 25 pacientes **com** câncer de mama e **com** doença periodontal (CAN-DP).

Como critérios de inclusão, todas as pacientes deveriam apresentar no mínimo 15 dentes, excluindo-se terceiros molares e dentes indicados para exodontia. Foram consideradas pacientes com doença periodontal aquelas que apresentarem um sítio com profundidade de sondagem ≥ 5 mm e dois dentes com perda de inserção ≥ 6 mm (MACHTEI *et al.*, 1992).

Os critérios de exclusão para o presente estudo foram: tabagismo, diabetes *mellitus*, gravidez, história positiva de antibioticoterapia e/ou tratamento periodontal básico nos últimos seis meses, uso de medicamentos que poderiam interferir nos aspectos periodontais e envolvimento protéticos extensos. Foram excluídas, também, pacientes que desistiram de participar do estudo ou que tiveram impossibilidade de comparecer aos agendamentos.

4.4 Delineamento do estudo

Após a assinatura do TCLE, todos os participantes receberam instruções específicas de higiene oral e, na sequência, foi realizada avaliação clínica periodontal para sua alocação nos grupos do estudo e coleta dos fluidos biológicos (FCG e sangue periférico). Os parâmetros clínicos periodontais e marcadores

imunoinflamatórios foram avaliados apenas no *baseline*, que corresponde à coleta inicial, a qual para as portadoras de câncer de mama foi no período após diagnóstico do câncer (antes do tratamento quimioterápico); e para as participantes sem câncer de mama, foi no momento do convite para entrar no estudo.

Os exames clínicos periodontais (IP, SS, PS, NCI) e as coletas de FCG foram realizados por um único examinador devidamente treinado e calibrado. O sangue periférico foi coletado e processado pela equipe da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

4.5 Calibração do examinador

O índice Kappa foi utilizado para avaliar a calibração do examinador para coleta dos parâmetros clínicos periodontais, a fim de mensurar a concordância diagnóstica intra-examinador. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para critérios de diagnóstico, o índice aceitável de concordância de Kappa deve ser maior ou igual a 0,85 (OMS, 1997). Este nível de concordância foi utilizado para a calibração do examinador no presente projeto. Para isso, foram selecionadas 10 pacientes, com pelo menos 1 par de dentes com profundidade de sondagem ≥ 5 mm. Cada paciente foi examinada duas vezes por meio de sonda periodontal computadorizada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA), com um intervalo de 48 horas entre o primeiro e segundo exame, a fim de se obter a confiabilidade diagnóstica intra-examinador.

4.6 Coleta dos parâmetros clínicos

Os parâmetros clínicos foram avaliados utilizando a sonda eletrônica computadorizada de pressão controlada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA).

O Índice de Placa (IP) foi avaliado de forma dicotômica e, de acordo com a presença ou ausência de biofilme visível na margem gengival das quatro faces do

dente (vestibular, lingual/palatina, mesial e distal), expressa em porcentagem (O'LEARY, DRAKE, NAYLOR, 1972). Também de maneira dicotômica, o Sangramento à Sondagem (SS) foi expresso em porcentagem e representou presença ou ausência de sangramento em seis sítios por dente, três por vestibular (mesio-vestibular, vestibular e disto-vestibular) e três por lingual/palatina (mesio-lingual/palatina, lingual/palatina e disto-lingual/palatina), até 15 segundos após a realização da profundidade de sondagem (AINAMO & BAY, 1975).

A Profundidade de Sondagem (PS) e o Nível Clínico de Inserção (NCI) foram mensurados em milímetros (mm), em seis sítios por dente, três por vestibular (mesio-vestibular, vestibular e disto-vestibular) e três por lingual/palatina (mesio-lingual/palatina, lingual/palatina e disto-lingual/palatina). A PS compreendeu a medida entre a margem gengival e o fundo do sulco gengival ou bolsa periodontal enquanto o NCI foi a medida da distância entre a junção cimento-esmalte até a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal.

4.7 Coleta das amostras

4.7.1 Fluido crevicular gengival (FCG)

A placa supragengival nos sítios da coleta foi removida (**Figura 1A**) e estes, cuidadosamente secos com jatos de ar, posteriormente, isolados com roletes de algodão estéreis, para que não houvesse interferência da saliva. As amostras do FCG foram obtidas a partir de 4 sítios interproximais específicos (dois dentes anteriores e dois dentes posteriores), sendo coletadas 3 amostras de cada sítio, em cada paciente, com a utilização de tiras de Periopaper® (Oralflow Inc., Amityville, NY, EUA). Nas pacientes com periodontite, os sítios de coleta tiveram a profundidade de sondagem ≥ 5 mm, enquanto nas mulheres sem doença periodontal $PS \leq 3$ mm. As tiras foram cuidadosamente inseridas junto à margem do sulco gengival, permanecendo por um período de 30 segundos (**Figura 1B**), em seguida colocadas em frascos esterilizados tipo *ependorf* e encaminhadas para armazenamento a

uma temperatura de -80°C , assim permanecendo até o momento da quantificação das citocinas em laboratório (**Figuras 1C e 1D**).

Figura 1: A) Remoção da placa supragengival. B) Coleta de FCG com tiras de Periopaper® (Oralflow Inc., Amityville, NY, EUA). C) Corte das tiras de Periopaper®. D) Tiras de Periopaper® armazenadas em frascos esterilizados tipo *eppendorf*.

4.7.2 Sangue periférico

Foram coletados, a vácuo, 5mL de sangue periférico, por punção venosa, em tubos de coleta a vácuo com EDTA (BD Vacutainer), respeitando as normas de biossegurança do HCFMRP-USP. As coletas foram realizadas por profissionais de enfermagem capacitados na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC), vinculada à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA).

4.8 Processamento das amostras

4.8.1 Fluido crevicular gengival (FCG)

Inicialmente, foi feito o preparo da curva de concentração. Para isso, diluições seriadas foram feitas a partir da proteína *Albumin from Bovine Serum* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 1,5 mg/mL, até atingir 5 pontos da curva (1,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,375 mg/mL, 0,187 mg/mL, 0,09 mg/mL). Como diluidor e branco foi utilizada água deionizada.

Para preparo das amostras, as mesmas foram descongeladas e adicionados 2 µL de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em uma solução com 0,01% de *Tween* 20 em 200 µL de solução salina tamponada (PBS – Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). Os *ependorffs* foram, então, deixados por 30 minutos em agitador orbital de placa. Duas centrifugações foram realizadas, subsequentemente, a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C, com a troca de tubos entre as centrifugações, para coleta do sobrenadante. Para análise, 5 µL de cada ponto da curva padrão, do branco e de cada amostra, foram pipetados em placas de 96 poços - Costar 3595 (Corning Incorporated, NY, EUA), em duplicata. Em seguida, foi utilizado um kit comercial para marcação das proteínas presentes nos poços (Bio-Rad, California, EUA). Resumidamente, 25 µL do reagente A (Bio-Rad DCTM Protein Assay), foram adicionados em todos os poços, seguido de 200 µL do reagente B (Bio-Rad Reagent B). A placa foi deixada por 15 minutos no escuro, em temperatura ambiente, para posterior leitura em leitor de placa µQuant (BioTek, Winooski, VT). Os dados foram lidos em um comprimento de onda de 750 nm e os resultados apresentados como uma média da duplicata, em mg/mL.

Para quantificação de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-1 β), foram utilizados kits disponíveis comercialmente (HSCYTMAG-28SK e TGFBMAG-64K-01 – MilliplexTM map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em um analisador MAGPIX[®] (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a placa filtro foi umedecida com o *washing buffer* e, em

seguida, a solução foi aspirada dos poços. *Beads* magnéticas revestidas com os anticorpos monoclonais para os nove analitos (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-1 β) foram adicionadas aos poços. As amostras e padrões foram transferidas para os poços e incubadas *overnight* (16-18 horas), a 4°C. Os poços foram lavados novamente e uma mistura de anticorpos secundários biotinilados foi adicionada. Após a incubação por uma hora, adicionou-se, aos poços, a Estreptavidina R-ficoeritrina, sendo este conjunto incubado por mais uma hora. Após lavagem para a remoção de reagentes não-ligados, foi acionado *sheath fluid* (Luminexs, MiraiBio, Alameda, CA, USA) aos poços. As placas foram, então, analisadas pelo MAGPIX[®], obtendo-se a intensidade de fluorescência média. Amostras abaixo do limite de detecção foram registradas como zero. Todas as amostras foram analisadas individualmente e os níveis de citocinas foram estimados a partir de uma curva polinomial de quinto grau utilizando-se o *software* xPONENT[®] (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). Um total de 180 amostras foi analisado.

Após essas análises, os valores encontrados para cada uma das nove citocinas (pg/mL) foram normalizados dividindo-os pela média da proteína total (mg/mL). Assim, os resultados para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-1 β estão expressos em pg/mg.

4.8.2 Sangue periférico

As amostras do sangue periférico foram processadas seguindo os protocolos específicos do Laboratório de Análises Clínicas do HCFMRP-USP. A proteína C-reativa (PCR) foi dosada através do método da turbidimetria, expressa em mg/dL e com valor de referência normal até 0,50 mg/dL. Os demais exames hematológicos tiveram como valores de referência, adotados pelo Laboratório de Análises Clínicas do HCFMRP-USP, os seguintes valores: glicemia em jejum 70-100mg/dL, triglicérides <150mg/dL, colesterol total <200mg/dL, colesterol LDL <130mg/dL e HDL >35mg/dL e neutrófilos 40-60%.

4.9 Análise estatística

As análises foram realizadas com *software* SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) e os gráficos foram obtidos no *software* GraphPad Prism 5.0 para Windows). O paciente foi considerado como a unidade estatística (SAU n=20, DP n=20, CAN n=25 e CAN-DP n=25) e o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi adotado. A distribuição dos dados clínicos, imunológicos e hematológicos foi verificada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Teste paramétricos para análises das diferenças intergrupos foram adotados quando os dados apresentaram distribuição normal. Por outro lado, quando os dados apresentaram distribuição não normal foram adotados testes não-paramétricos.

4.9.1 Parâmetros Clínicos

Em cada grupo, foi calculada a média e desvio padrão de PS, NCI, IP, SS e o número de dentes. Os dados referentes a esses parâmetro mostraram distribuição não normal e o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post hoc* de Dumm foram adotados para avaliação das diferenças intergrupos.

Para a idade dos pacientes, também foi calculada a média e desvio padrão de cada grupo e observou-se distribuição normal dos dados. Diante disso, Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey foram utilizados nas comparações intergrupos.

4.9.2 Parâmetros Imunológicos

Foram calculadas as medidas de dispersão e tendência central dos níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-1 β (pg/mg) nos diferentes grupo do estudo. As diferenças intergrupos para cada citocina foram analisadas pelo

teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. Dessa forma, para representação dos dados usados medianas e intervalos interquartis.

4.9.3 Parâmetros Hematológicos

Foram calculadas as medidas de dispersão e tendência central da proteína C-reativa (PCR), glicemia em jejum, triglicérides, colesterol total, colesterol LDL e HDL e níveis de neutrófilos em sangue periférico para os quatro grupos . Esse dados apresentaram distribuição não normal e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn foram escolhidos para análise das diferenças intergrupos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

No total, 193 mulheres foram triadas no HCFMRP-USP e na Clínica da Pós-graduação da FORP-USP. Entretanto, apenas 90 se encaixaram nos critérios de inclusão: 20 saudáveis (SAU), 20 com doença periodontal (DP), 25 com câncer de mama (CAN) e 25 com câncer de mama e DP (CAN-DP). As demais mulheres foram excluídas das avaliações pelos seguintes motivos: não apresentavam a quantidade mínima de dentes para o estudo (15 dentes), uso de prótese total ou envoltórios protéticos extensos, diabetes *mellitus*, tabagismo ou impossibilidade de comparecer aos agendamentos. Muitas pacientes se recusaram a participar do estudo pois encontravam-se psicologicamente abaladas após diagnóstico do câncer.

No momento do diagnóstico, dentre as pacientes alocadas nos grupos CAN e CAN-DP, 26 estavam no período pré-menopausa e 24, na pós-menopausa. Todas estas mulheres tiveram diagnóstico de carcinoma ductal invasivo e, dentre elas, a maioria (n=40) tinha estágio do tumor grau 2 no momento do diagnóstico, assim como tinha receptores para estrógeno e progesterona (ER/PR) positivos (n=36) e o gene HER2 negativo (n=35) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Características clínicas e histológicas do câncer de mama nos grupos CAN e CAN-DP.

	CAN (n=25)	CAN-DP (n=25)	Total (n=50)
Período fisiológico ao diagnóstico			
Pré-menopausa	15 (60%)	11 (44%)	26 (52%)
Pós-menopausa	10 (40%)	14 (56%)	24 (48%)
Histologia (Diagnóstico)			
Carcinoma ductal invasivo	25 (100%)	25 (100%)	50 (100%)
Carcinoma lobular invasivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Grau			
G1	4 (16%)	1 (4%)	5 (10%)
G2	19 (76%)	21 (84%)	40 (80%)
G3	2 (8%)	3 (12%)	5 (10%)
ER/PR			
Negativo	7 (28%)	7 (28%)	14 (28%)
Positivo	18 (72%)	18 (72%)	36 (72%)
HER2			
Negativo	18 (72%)	17 (68%)	35 (70%)
Positivo	7 (28%)	8 (32%)	15 (30%)

As 90 participantes passaram por avaliação clínica periodontal (IP, SS, PS e NCI), coleta de FCG e exames hematológicos de forma padronizada, sem necessidade de adaptação metodológica. Não foram observadas reações adversas a esses procedimentos. Os dados demográficos e clínicos estão presentes na **Tabela 2**. A média e desvio padrão da idade das pacientes foi de 45,4±2,3 anos e não houve diferença estatística intergrupos ($p>0,05$). O número de dentes foi menor no grupo CAN-DP, com diferença significativa em relação ao grupo DP ($p<0,05$) (**Tabela 2**).

Na análise dos parâmetros clínicos IP, SS, PS e NCI, entre os grupos DP e CAN-DP e grupos SAU e CAN não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$). Todavia, na comparação do grupo DP com SAU e CAN, bem como do CAN-DP com SAU e CAN, houve diferença significativa ($p<0,05$). Os maiores valores destes parâmetros foram observados nos grupos DP e CAN-DP. (**Tabela 2**).

Tabela 2: Dados demográficos e clínicos (médias e desvio padrão).

	SAU (n=20)	DP (n=20)	CAN (n=25)	CAN-DP (n=25)	Valor de p
Idade (anos) (média±dp)	44,3±9,1	44,6±6,1	44±5,3	48,8±9,4	p > 0,05 (NS)
Número de dentes (média±dp)	24,9±4,6	26,4±4,5	25,2±3,6	21,6±6,7*	p < 0,05
IP (%) (média±dp)	15,8±15,8	62,3±27,6**	19,5±4,5	56,3±27,3**	p < 0,05
SS (%) (média±dp)	22,05±17,2	63±29,4**	37,2±33,05	58,1±28,9**	p < 0,05
PS (mm) (média±dp)	1,9±0,37	2,8±0,76**	2,02±0,30	2,8±0,83**	p < 0,05
NCI (mm) (média±dp)	2,1±0,47	3,2±0,74**	2,2±0,45	3,4±1,07**	p < 0,05

NS: estatisticamente não significativa (ANOVA, $p>0,05$).

*Diferença estatística quando comparado o grupo CAN-DP *versus* DP (Kruskal-Wallis seguido por *post hoc* de Dunn, $p<0,05$).

**Diferença estatística quando comparado o grupo DP *versus* SAU e CAN e o grupo CAN-DP *versus* SAU e CAN (Kruskal-Wallis seguido por *post hoc* de Dunn, $p<0,05$).

Nos exames hematológicos, não foram observadas diferenças nas comparações intergrupos para a proteína C-reativa, glicemia em jejum, colesterol total e frações (HDL e LDL) e triglicérides ($p>0,05$). Apesar disso, a proteína C-reativa estava maior nos grupos DP e CAN ($p>0,05$), as médias do colesterol total e do LDL foram maiores nos grupos CAN e CAN-DP ($p>0,05$) e o triglicérides

levemente elevado no grupo CAN ($p>0,05$). Os dados referentes aos exames hematológicos estão representados na **Tabela 3**.

Na análise dos níveis de neutrófilos, observou-se que a média dessas células estava maior no grupo DP ($66,6\pm 7,1$) quando comparada aos grupos SAU, CAN e CAN-DP, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) (**Tabela 3**).

Tabela 3: Exames hematológicos (médias e desvio padrão).

	SAU n= 20	DP n=20	CAN n=25	CAN-DP n= 25	Valor de Referência ^a	Valor de p
PCR (média±dp)	0,57 ±0,72	0,73 ±1,19	0,76 ±0,87	0,57 ±0,35	Até 0,50 mg/dL	$p > 0,05$ (NS)
Neutrófilos (média±dp)	56,3 ±4,8	66,6 ±7,1*	56,7 ±11,4	55 ±15,6	40-60%	$p < 0,05$
Glicemia em jejum (média±dp)	89,1 ±7,5	87,6 ±9,1	89,8 ±7,9	91,1 ±8,3	70-100 mg/dL	$p > 0,05$ (NS)
Colesterol Total (média±dp)	190,2 ±29,7	191,5 ±30,2	206,8 ±37,8	214,8 ±34,5	< 200 mg/dL	$p > 0,05$ (NS)
Colesterol HDL (média±dp)	46,2 ±9,8	47,3 ±12,0	49,3 ±12,1	51,9 ±12,4	> 35 mg/dL	$p > 0,05$ (NS)
Colesterol LDL (média±dp)	122,8 ±27,1	136,1 ±31,5	148,6 ±29,8	138,3 ±32,9	< 130 mg/dL	$p > 0,05$ (NS)
Triglicérides (média±dp)	114,4 ±50,7	113,8 ±58,4	158,4 ±100	137,5 ±93,3	< 150 mg/dL	$p > 0,05$ (NS)

NS: estatisticamente não significativa (Kruskal-Wallis, $p>0,05$).

*Diferença estatística quando comparado o grupo DP *versus* SAU, CAN e CAN-DP (Kruskal-Wallis seguido por *post hoc* de Dunn, $p<0,05$).

^aValores de referência utilizados pelo Laboratório de Análises do HCFMRP-USP.

O perfil de citocinas inflamatórias, em fluido crevicular gengival, apresentou variações nos grupos estudados. As concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN- γ e TNF- α não apresentaram diferença estatística significativa entre os quatro grupos ($p>0,05$) (**Figura 2 A, B e C**). Entretanto, ainda nessa família de

citocinas, a concentração de IL-6 estava significativamente aumentada no grupo DP em relação ao grupo SAU ($p < 0,05$) (**Figura 2 D**). Os níveis de IL-17 não apresentaram diferença entre DP e CAN-DP e entre SAU e CAN ($p > 0,05$), porém foi encontrada diferença quando DP e CAN-DP foram comparados aos SAU e CAN ($p < 0,05$) (**Figura 2 E**). Além disso, a IL-1 β estava significativamente aumentada no grupo DP em relação aos grupos SAU e CAN ($p < 0,05$), sem diferença com o grupo CAN-DP ($p > 0,05$) (**Figura 2 F**).

Figura 2: Concentração das citocinas pró-inflamatórias, em fluido crevicular gengival, em pg/mg. Dot Plot mostra as medianas e percentis (25 e 75). A) IL-2; B) IFN- γ ; C) TNF- α ; D) IL-6; E) IL-17; F) IL-1 β . * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis seguido por *post hoc* de Dunn).

Quando as citocinas antiinflamatórias foram analisadas, as concentrações de IL-4 e IL-10 não apresentaram diferença significativa entre os quatro grupos ($p > 0,05$)

(Figura 3 A e B). Por outro lado, o TGF- β estava aumentado nos grupos DP e CAN-DP quando comparados aos SAU e CAN ($p < 0,05$). Todavia, não houve significância estatística nas comparações entre o grupo DP com CAN-DP e entre SAU com CAN ($p > 0,05$) (Figura 3 C). Todos os valores das medianas e intervalos interquartis estão expressos na Tabela 4 e Tabela 5.

Figura 3: Concentração das citocinas antiinflamatórias em fluido crevicular gengival, em pg/mg. Dot Plot mostra as medianas e percentis (25 e 75). A) IL-4; B) IL-10; C) TGF- β . * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis seguido por *post hoc* de Dunn).

Tabela 4: Medianas e percentis das citocinas pró-inflamatórias.

	Mediana	Percentis	
	(pg/mg)	25	75
IL-2			
SAU	0.1485	0.0767	0.2872
DP	0.1565	0.0893	0.2253
CAN	0.2146	0.1149	0.2808
CAN-DP	0.1452	0.0552	0.1931
IFN-γ			
SAU	0.1351	0.0566	0.2122
DP	0.2484	0.1361	0.425
CAN	0.195	0.0774	0.2577
CAN-DP	0.2001	0.0794	0.4046
TNF-α			
SAU	16.2589	8.6282	23.7978
DP	8.9133	5.119	13.9446
CAN	10.5255	8.2214	20.4235
CAN-DP	10.1869	2.4238	22.0652
IL-6			
SAU	1.3742	0.9165	4.653
DP	11.9458	3.0478	25.718
CAN	1.707	0.8011	10.5993
CAN-DP	6.6118	1.7279	22.8729
IL-17			
SAU	0.5614	0.2486	1.0929
DP	3.2732	1.2841	7.6666
CAN	0.5287	0.3261	1.0698
CAN-DP	3.0542	0.6318	4.4941
IL-1β			
SAU	49.1263	6.8728	158.7614
DP	1061.716	148.979	2269.78
CAN	31.6279	15.5155	78.2609
CAN-DP	132.6782	31.6279	635.7326

Tabela 5: Medianas e percentis das citocinas antiinflamatórias.

	Mediana	Percentis	
	(pg/mg)	25	75
IL-4			
SAU	9.4398	6.1525	14.8831
DP	9.2453	4.1128	15.1008
CAN	13.1142	8.71	20.5959
CAN-DP	7.9193	4.5792	14.3133
IL-10			
SAU	1.8304	1.0711	2.902
DP	1.9255	1.3315	3.0694
CAN	1.9759	1.1975	2.94
CAN-DP	1.4988	0.7402	2.6761
TGF-β			
SAU	32.8439	19.3768	60.7488
DP	109.9624	53.3074	213.0479
CAN	32.2938	15.587	49.5954
CAN-DP	77.6628	49.1548	124.3188

6 DISCUSSÃO

Este estudo fornece informações preliminares sobre o perfil inflamatório, em FCG, de pacientes com câncer de mama e/ou doença periodontal. Os perfis linfocitários Th1 (IL-2, INF- γ e TNF) e Th2 (IL-4, IL-10, TGF- β e IL-6) são bem documentados como principais responsáveis da modulação da resposta do hospedeiro frente a infecções periodontais (TENG, 2002; EBERSOLE *et al.*, 2013; YUCEL-LINDBERG & BAGE, 2013). Além disso, tem sido sugerido que as células Th17, uma terceira população de células T CD4⁺ efetoras, e a citocina IL-17, também desempenham papel crucial na imunopatogênese da doença periodontal. A ativação de células Th17, produtoras de IL-17, é associada à inflamação gengival, destruição óssea e à maior gravidade da DP, tanto em pacientes com periodontite quanto em modelos animais (AWANG *et al.*, 2014; CHENG, HUGHES, TAAMS, 2014; LIN *et al.*, 2014; CHITRAPRIYA, RAO, LAVU, 2015). Moutsopoulos *et al.* (2012) relataram que a *Porphyromonas gingivalis*, importante patógeno periodontal, é capaz de ativar o eixo Th17/IL-17, através de mecanismos que envolvem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6. Nas amostras de FCG do presente estudo, os níveis de IL-17, IL-1 β e IL-6 estavam significativamente aumentados no grupo DP ($p < 0,05$) quando comparados aos controles saudáveis (SAU), reafirmando a relevância do perfil Th17/IL-17 na gênese da DP.

Yang *et al.* (2012) avaliaram a expressão de células Th17 e Células T reguladoras (Treg) em tecidos de câncer de mama comparados a tecidos normais. Foram observadas elevadas concentrações das células Th17 nos tecidos com a neoplasia maligna, correlacionadas positivamente com a expressão de IL-17, IL-6 e IL-1 β , embora estas células não tenham sido associadas com Treg. Para os autores, células Th17 (IL-17) estão envolvidas na resposta antitumoral e favorecem um melhor prognóstico do câncer. Entretanto, para Benevides *et al.* (2013) as células Th17 (IL-17) e Treg (TGF- β e IL-10) estão sincronicamente aumentadas no microambiente do carcinoma ductal invasivo, sendo associadas com agressividade do tumor e pior prognóstico. A plausibilidade biológica que suporta esses achados é o fato de a IL-17 ser capaz de induzir fatores angiogênicos e fator de crescimento endotelial vascular, favorecendo a expansão tumoral. Associado a isso, células Treg através das suas citocinas TGF- β e IL-10 podem mediar imunossupressão e inibir

respostas imunes efetoras, estimulando a proliferação e invasão do câncer. O TGF- β , em conjunto com IL-6, induz células TCD8⁺ a produzirem IL-17, e quando IL-1 β entra nesse contexto, estas citocinas amplificam a diferenciação de células Th17 e criam um estado inflamatório crônico que favorece a progressão tumor. Resultados da pesquisa de Chen *et al.* (2013) corroboram com esses achados ao afirmar que altos níveis de células produtoras de IL-17, no microambiente tumoral, são um fator de pior prognóstico, por terem sido correlacionados com maiores graus histológicos do tumor e ausência da expressão de receptores celulares para hormônios.

No presente estudo, os perfis Th17 (IL-17) e Treg (TGF- β) estavam bem evidentes nas pacientes do grupo DP e CAN-DP. Quando comparados os grupos CAN-DP e CAN, foi observado um aumento significativo da IL-17 e TGF- β nas mulheres do grupo CAN-DP ($p < 0,05$). Além disso, a IL-1 β e a IL-6 também estavam aumentadas no grupo CAN-DP em relação ao grupo CAN ($p > 0,05$). Isso sugere que a doença periodontal pode favorecer um aumento de citocinas relacionadas com progressão do câncer de mama. Todavia, nos presentes dados não foram observadas associações significantes destas citocinas com o grau histológico do tumor, ausência de receptores para estrógeno e progesterona e expressão aumentada do gene HER2. Porém, houve tendência do grupo CAN-DP apresentar mais mulheres com câncer de graus 2 (84%) e 3 (12%), em comparação às pacientes do grupo CAN (76% e 8%, respectivamente). Diante disso, uma atenção especial deve ser dada às pacientes com doença periodontal e câncer de mama, uma vez que a IL-17 tem sido amplamente associada com o risco desta neoplasia, crescimento tumoral por aumento da angiogênese, agressividade e metástase (DU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; COFFELT *et al.*, 2015).

Na dinâmica da DP, o perfil Th2 (IL-4, IL-10, TGF- β e IL-6) favorece uma resposta imune humoral, mediada por anticorpos e relacionada ao reparo tecidual (KINANE, 2000; EBERSOLE *et al.*, 2013). Nesse contexto, o TGF- β tem um papel benéfico na modulação da inflamação, pois controla a exacerbação da resposta imune e aumenta o reparo dos tecidos periodontais, por meio da angiogênese (GARLET, 2010). Por outro lado, tem sido visto, no microambiente tumoral, como um fator que favorece a evasão do sistema imunológico pelas células malignas, diminuindo a resposta antitumoral, possibilitando o crescimento e proliferação tumorais, além de ativar respostas Th17 com características pró-angiogênicas (ESQUIVEL-VELAZQUEZ *et al.*, 2015). Os níveis de TGF- β , neste estudo, foram

maiores no grupo DP. No grupo CAN-DP, esses valores também estavam significativamente aumentados em relação ao grupo CAN ($p < 0,05$), sugerindo que a presença da doença periodontal em pacientes com câncer de mama aumentou os níveis creviculares desta citocina, cuja qual poderia atuar sistemicamente e contribuir para o desenvolvimento tumoral.

Associada ao TGF- β , a IL-10 participa da resposta Treg e contribui para a supressão da resposta imune, tanto nos sítios com comprometimento periodontal quanto nos tecidos mamários acometidos pela neoplasia, ao inibir IL-6, TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-12, suprimir células apresentadoras de antígenos, inibir macrófagos e ativar células T. Nos tecidos periodontais, a IL-10 age para atenuar a inflamação e perda óssea alveolar, que poderiam ser prejudiciais ao hospedeiro (GARLET *et al.*, 2012), enquanto que, no câncer de mama, essa imunossupressão pode favorecer a progressão do tumor (HAMIDULLAH, CHANGKIJA, KONWAR, 2012). Nas amostras de FCG, neste estudo, não foram observadas diferenças significantes nos níveis de IL-10 dos quatro grupos, apesar de níveis mais baixos no grupo CAN-DP. O fato de essa citocina ser pleotrópica e desempenhar funções pró-inflamatórias (destrutivas) e antiinflamatórias (protetoras) poderia explicar essa possível contradição (HAMIDULLAH, CHANGKIJA, KONWAR, 2012).

A citocinas IL-1 β e IL-6 têm sido encontradas em grandes quantidades no FCG de pacientes com doença periodontal, sendo fortemente associada à destruição dos tecidos periodontais, inibição da síntese de colágeno e reabsorção óssea alveolar (YUCEL-LINDBERG & BAGE, 2013). No presente estudo, foi observado um aumento significativo destas citocinas nas pacientes do grupo DP em relação aos grupos SAU ($p < 0,05$). Quando o grupo CAN-DP foi comparado com o CAN, os níveis de IL-1 β e IL-6 estavam elevados ($p > 0,05$), sugerindo que a doença periodontal está aumentando, nas pacientes com câncer, os níveis locais destas citocinas, as quais poderiam se disseminar sistemicamente e causar impacto desfavorável na resposta antitumoral. Estas citocinas são relacionadas a uma potente atividade pró-tumorigênica mamária por ativar genes pró-metastáticos, estimular a angiogênese e favorecer a proliferação e invasão tumoral (EIRO *et al.*, 2012). Além disso, estimulam a resposta Th17/IL-17 (BENEVIDES *et al.*, 2013) e a produção de estrógeno, hormônio que favorece crescimento de células do câncer de mama (PUROHIT, NEWMAN, REED, 2002).

Na periodontite crônica e no câncer de mama o recrutamento de células imunes e a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas, são fundamentais no combate a essas doenças (PENDYALA *et al.*, 2013). Contudo, em condições clínicas saudáveis, o periodonto também expressa, continuamente, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão vascular, associadas com nível basal de inflamação, uma vez que esse tecido é exposto diretamente ao desafio microbiano (BOSSHARDT & LANG, 2005). Esse aspecto poderia explicar porque foi possível detectar níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-1 β no FCG dos pacientes controles (SAU).

As citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN- γ e TNF- α participam da resposta imune Th1 e têm sido relacionadas à inflamação excessiva e dano aos tecidos periodontais doentes (GARLET, 2010; YUCEL-LINDBERG & BAGE, 2013). Dados do presente estudo evidenciaram maiores níveis da IL-2 e IFN- γ no grupo DP em relação aos controles saudáveis (SAU) ($p>0,05$). Todavia, foram observados níveis levemente diminuídos destas citocinas no grupo CAN-DP em relação ao DP ($p>0,05$). Os níveis locais de TNF- α também estavam diminuídos no grupo CAN-DP em relação ao grupo CAN ($p>0,05$). Mesmo sem significância estatística, isso sugere que nas pacientes do grupo CAN-DP o perfil Th1 encontra-se diminuído, provavelmente em função da maior expressão dos perfis Treg (TGF- β /IL-10) e Th17/IL-17. Caso essa diminuição também ocorresse na circulação sistêmica, poderia favorecer a expansão do câncer de mama, por comprometer as funções da IL-2, IFN- γ e TNF- α , uma vez que estas citocinas têm sido associadas a uma eficiente atividade antitumoral, diminuição de oncogenes, aumento de genes supressores do tumor e aumento da apoptose (KAMALI-SARVESTANI, MERAT, TALEI, 2005; NICOLINI, CARPI, ROSSI, 2006; ESQUIVEL-VELAZQUEZ *et al.*, 2015).

Outra possível explicação para diminuição local destas citocinas Th1 é o fato de o tumor de mama estar em progressão e isso modular a produção de citocinas sistêmicas (regular negativamente) (ESQUIVEL-VELAZQUEZ *et al.*, 2015), com consequente impacto nos tecidos periodontais, mostrando que pode existir uma relação bidirecional entre o câncer de mama e a doença periodontal. Entretanto, novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos através dos quais a doença periodontal e o carcinoma de mama afetam uma à outra. No presente trabalho, a tendência à diminuição dos níveis locais de IL-4 no grupo CAN-DP,

poderiam ser entendidos pelas mesmos argumentos, mostrando também uma possível interferência no perfil Th2.

Atualmente, existe um grande número de evidências relevantes da associação entre periodontite crônica e diversas condições sistêmicas (IGARI *et al.*, 2014; SCHMIDT *et al.*, 2014). Todavia, a comunidade científica tem tentado elucidar os verdadeiros mecanismos envolvidos na interrelação entre as doenças periodontais e os diferentes tipos de câncer. De maneira geral, acredita-se que a resposta imune na infecção periodontal, associada à bacteremia, tenha impacto sobre a inflamação sistêmica e, conseqüentemente, aumente o risco de câncer geral (MICHAUD *et al.*, 2008). A escassez de estudos que investigam o papel da DP na carcinogênese de mama e o fato dessas condições, por vezes concomitantes, serem problemas prevalentes na saúde pública justificam a necessidade de maiores explorações nesse campo.

Tanto a periodontite crônica quanto o câncer de mama são doenças prevalentes em adultos acima dos 35 anos (OPPERMANN *et al.*, 2015; BRASIL, 2016). No presente trabalho, a média de idade geral das mulheres foi 45,4 anos, sem diferença significativa entre os quatro grupos. Optou-se por manter o mesmo padrão de idade na seleção das pacientes para evitar interferência deste fator nos resultados.

Um aspecto relevante foi o menor número de dentes no grupo CAN-DP quando comparado ao grupo DP ($p < 0,05$). Muitos estudos que investigam a associação da DP e câncer têm correlacionado a perda de dentes com o aumento do risco de neoplasias malignas (HUJOEL *et al.*, 2003; SADIGHI SHAMAMI, AMINI, 2011; TANWIR, SADIA, DUASHAUKAT, 2012; JAVED & WARNAKULASURIYA, 2016; MICHAUD *et al.*, 2016). Amódio *et al.* (2014) também encontraram menos unidades dentárias remanescentes em uma população com as mesmas características deste estudo. Nesse contexto, Michaud *et al.* (2008) sugerem que a DP pode ser um marcador de susceptibilidade do sistema imune e/ou pode afetar diretamente o risco de câncer. Entretanto, Söder *et al.* (2011) destacaram que a perda dentária pode ocorrer por outros motivos além da DP, como cáries e abscessos endodônticos, os quais também se caracterizam por infecção/inflamação crônica.

Os parâmetros clínicos periodontais, tais como PS, NCI, IP e SS auxiliam o periodontista na avaliação da destruição dos tecidos periodontais, bem como no

grau de inflamação que acomete estes tecidos, sendo fundamentais para um correto diagnóstico e tratamento das DP (O'LEARY, DRAKE, NAYLOR, 1972; AINAMO & BAY, 1975; COBB, 2002). Observou-se, neste trabalho, que estes parâmetros estavam maiores nos grupos DP e CAN-DP ($p>0,05$), representando, assim, um padrão similar da periodontite crônica, essencial para estabelecer comparações intergrupos mais padronizadas. Houve similaridade, também, nos parâmetros dos grupos SAU e CAN, os quais mostraram menores médias ($p>0,05$). A significância estatística observada ($p<0,05$) entre os grupos DP e CAN-DP e os grupos SAU e CAN era esperada, uma vez que os grupos com doença periodontal tendem a ter maiores valores de PS, NCI, PS e SS (COBB, 2002).

Ainda nesse contexto, é importante ressaltar que todas as pacientes com periodontite crônica foram examinadas por um periodontista devidamente calibrado, que respeitou os critérios de Machtei *et al.* (1992). Também foram considerados os critérios estabelecidos pelo *Workshop Internacional para Classificação da Doença Periodontal*, de 1999 (ARMITAGE, 2000). Dessa forma, as pacientes com comprometimento periodontal apresentaram diagnóstico de periodontite crônica generalizada avançada.

Os dados relacionados ao diagnóstico do câncer de mama mostraram que as pacientes dos grupos CAN e CAN-DP tinham padrão semelhante da neoplasia, uma vez que 100% ($n=50$) das pacientes foram diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo, das quais 80% ($n=40$) apresentavam grau histológico 2 e não havia presença de metástase no momento das coletas.

Nesta pesquisa, optou-se por recrutar mulheres quem tinham sido diagnosticadas pela primeira vez com câncer de mama e que não haviam sido submetidas a nenhum tratamento, como quimioterapia, radioterapia ou mastectomia, para evitar a interferência dessas terapias nas condições periodontais e sistêmicas, diminuindo o número de vieses e comprometimento dos resultados. O tratamento antineoplásico induz vários efeitos colaterais tanto na cavidade bucal quanto na condição sistêmica dos indivíduos. Por exemplo, durante a quimioterapia, a gengiva pode ser afetada devido à estomatotoxicidade direta da droga quimioterápica, a qual pode induzir gengivite marginal e periodontite ou agravar condições periodontais pré-existentes, além do risco de complicações sistêmicas resultantes da imunossupressão (HESPANHOL *et al.*, 2010).

O câncer de mama pode ser classificado como *in situ* (não invasivo) ou invasivo, sendo este último subdividido, especificamente, em carcinoma ductal invasivo ou lobular invasivo, formas mais comuns. Em relação ao grau histológico, o mesmo pode assumir grau 1, 2 ou 3, baseado na diferenciação em relação às células mamárias normais, no qual o grau 1 (bem diferenciado) representa células com aparência normal e sem crescimento rápido, grau 2 (moderadamente diferenciado) com características mistas e o grau 3 (pouco diferenciado) com células anormais de crescimento rápido e agressivo. Estas células podem apresentar ou não receptores para estrógeno (RE+/RE-) e progesterona (RP+/RP-), hormônios que estimulam o seu crescimento. A presença de receptores (R-positivos) relaciona-se ao crescimento lento do tumor e melhor resposta à terapia hormonal quando comparada a ausência de receptores (R-negativos). Além disso, cânceres de mama podem ter uma proteína em excesso que promove seu crescimento, denominada HER2. Mulheres com câncer de mama HER2-positivo têm muitas cópias do gene HER2, resultando em maior quantidade dessa proteína e crescimento mais rápido e agressivo do tumor (AGUIAR *et al.*, 2013; BRASIL, 2016). Das 50 pacientes diagnosticadas com câncer de mama, neste estudo, a maioria apresentou RE/RP positivos (n=36, 72%) e HER2 negativo (n=35, 70%), o que sugere curso mais favorável desta neoplasia.

Tanto na avaliação de pacientes com doença periodontal quanto dos acometidos por câncer de mama, uma análise da condição de saúde geral é importante, e exames hematológicos complementares podem auxiliar nesse processo. A DP tem sido associada a muitas condições sistêmicas, tais como, doença pulmonar, complicações na gravidez, baixo peso ao nascimento, diabetes, doença cardiovascular, doença renal crônica e artrite reumatoide (LINDEN, LYONS, SCANNAPIECO, 2013). Entre os quatro grupos estudados, não foram observadas diferenças estatísticas significantes nos resultados hematológicos, como proteína C-reativa, glicemia em jejum, colesterol total e frações (HDL e LDL) e triglicérides. Esses achados mostram que, apesar da presença do câncer de mama e de doença periodontal, a condição sistêmica das pacientes era similar.

Entretanto, alguns aspectos devem ser levados em consideração, como as médias do colesterol total e do LDL maiores nos grupos CAN e CAN-DP ($p>0,05$) e o triglicérides levemente elevado no grupo CAN ($p>0,05$). Essas alterações podem ser compreendidas pelos achados de Baek e Nelson (2016), os quais apresentam

relevantes evidências científicas sobre o papel do colesterol e seus metabólitos como fatores de risco para o câncer de mama. Para esses autores, o colesterol pode exercer efeitos diretos no sistema imune e no microambiente tumoral, através de processos de sinalização celular específicos, favorecendo o crescimento do tumor e a metástase. Observou-se, também, valores mais elevados da proteína C-reativa ($p>0,05$) nos grupos DP e CAN do presente estudo. Os níveis dessa proteína estão aumentados na circulação sanguínea em resposta à inflamação aguda, infecção e dano tecidual, como nos casos de periodontite crônica e câncer de mama (DEMME *et al.*, 2013; ASEGAONKAR *et al.*, 2015; DE SOUZA *et al.*, 2016). Em uma revisão sistemática, Guo *et al.* (2015) indicaram que níveis elevados de proteína C-reativa estão associados ao aumento do risco de câncer de mama. Essa proteína de fase aguda é sintetizada por hepatócitos em resposta às citocinas, principalmente IL-6, provenientes do microambiente tumoral e, por isso, pode estar elevada nesses indivíduos.

Nesse contexto, as médias da glicemia em jejum demonstraram que as pacientes estavam dentro dos valores de referência aceitáveis, comprovando a ausência de diabetes *mellitus*, um importante fator de risco para a doença periodontal. O diabetes e o tabagismo são fatores que modificam a resposta imune do hospedeiro e, portanto, interferem no curso da DP, sua gravidade e resposta ao tratamento (VAN DYKE & VAN WINKELHOFF, 2013). Para Söder *et al.* (2011), o tabagismo é um relevante fator de risco para muitos tumores malignos e merece atenção especial. Nesta amostra, também, não houve indivíduos fumantes, uma vez que o tabagismo foi critério de exclusão.

O número de neutrófilos foi estatisticamente maior no grupo DP quando comparado aos grupos SAU, CAN e CAN-DP. Esses achados podem ser justificados pelo fato de os neutrófilos serem a primeira linha de defesa diante de uma infecção periodontal e serem encontrados em grande quantidade na circulação sanguínea devido à disseminação sistêmica dos mediadores inflamatórios e microorganismos da DP (LOOS, 2005; 2006; LING, CHAPPLE, MATTHEWS, 2015).

Em relação aos grupos CAN-DP e CAN, os valores de neutrófilos foram semelhantes aos do grupo SAU ($p>0,05$). Uma possível explicação para esse achado é que, apesar de os neutrófilos participarem dos mecanismos envolvidos na resposta antitumoral, sua função é mais evidente em estágios tardios da doença, com níveis geralmente normais nas fases iniciais do tumor (COFFELT *et al.*, 2015).

Para Fridlender & Albelda (2012), os neutrófilos são constantemente recrutados para o microambiente tumoral e a neutrofilia é observada quando os cânceres estão mais avançados. Na maioria das mulheres da presente amostra, houve maior frequência do grau histológico 2 e ausência de metástases, o que poderia justificar esses achados.

Estes resultados são pioneiros na caracterização do perfil inflamatório, em fluido crevicular gengival, de pacientes com câncer de mama e periodontite crônica. A maioria dos estudos na literatura correlaciona estas doenças partindo do pressuposto que a inflamação crônica é o fator chave para ambas as doenças. Entretanto, não foram observadas investigações mais específicas do papel inflamatório nestes casos. Apesar de resultados favoráveis sobre o possível impacto da doença periodontal na imunopatogênese do carcinoma de mama, novos estudos são necessários para esclarecer os verdadeiros mecanismos envolvidos nessa relação, principalmente, estudos longitudinais, ensaios clínicos controlados e experimentos em modelos animais, com avaliações desses marcadores inflamatórios tanto na circulação sistêmica quanto no microambiente tumoral. Além disso, seria interessante investigar o novo modelo de patogênese das doenças periodontais, defendido por Hajishengallis e Lamont (2012), no qual a sinergia polimicrobiana do biofilme modula a resposta do hospedeiro de maneira a prejudicar a vigilância imunológica e pender a balança da homeostasia para disbiose, bem como o perfil epigenético dessas pacientes que esclareça se elas compartilham um perfil inflamatório comum.

Diante disso, vale ressaltar algumas limitações encontradas neste trabalho, como o pequeno tamanho da amostra que pode ter contribuído para aparentes variações nos resultados, bem como o período em que se iniciou a periodontite e o câncer. Não foi possível identificar qual das doenças aconteceu primeiro, apesar de uma tendência para a periodontite ter sido a primeira, devido à extensão e gravidade da doença periodontal e à perda de dentes, relacionada à infecções periodontais, a qual foi autorelatada como algo que aconteceu anos antes desta avaliação, embora o estabelecimento de uma relação de causa-efeito da doença periodontal sobre o câncer de mama não tenha sido o objetivo deste estudo.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Mulheres com câncer de mama e doença periodontal apresentaram um perfil de citocinas com características pró-inflamatórias em relação às pacientes apenas com o câncer, evidenciada pela significativa expressão do perfil Th17/IL-17 em fluido crevicular gengival. Além disso, o perfil Treg (TGF- β) também estava aumentado nas pacientes com câncer e DP. A combinação entre Th17/IL-17 e Treg (TGF- β) pode favorecer atividades pró-tumorigênicas no microambiente tumoral. Diante disso, a doença periodontal comportou-se como um fonte de mediadores inflamatórios que podem ter impacto na imunopatogênese do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F. N. et al. Comparison of nuclear grade and immunohistochemical features in situ and invasive components of ductal carcinoma of breast. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 35, n. 3, p. 97-102, Mar 2013.
- AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**, v. 25, n. 4, p. 229-35, Dec 1975.
- ALLON, I. et al. Metastatic tumors to the gingiva and the presence of teeth as a contributing factor: a literature analysis. **J Periodontol**, v. 85, n. 1, p. 132-9, Jan 2014.
- AMÓDIO, J. et al. Oral health after breast cancer treatment in postmenopausal women. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 69, n. 10, p. 706-8, Dec 2014.
- ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Northwest Dent**, v. 79, n. 6, p. 31-5, 2000 Nov-Dec 2000.
- ASEGAONKAR, S. B. et al. C-Reactive Protein and Breast Cancer: New Insights from Old Molecule. **Int J Breast Cancer**, v. 2015, p. 145647, 2015.
- AWANG, R. A. et al. Clinical associations between IL-17 family cytokines and periodontitis and potential differential roles for IL-17A and IL-17E in periodontal immunity. **Inflamm Res**, v. 63, n. 12, p. 1001-12, Dec 2014.
- BABEL, N. et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 77, n. 12, p. 1978-83, Dec 2006.
- BAEK, A. E.; NELSON, E. R. The Contribution of Cholesterol and Its Metabolites to the Pathophysiology of Breast Cancer. **Horm Cancer**, Mar 28 2016.
- BARTON, B. E. Interleukin-6 and new strategies for the treatment of cancer, hyperproliferative diseases and paraneoplastic syndromes. **Expert Opin Ther Targets**, v. 9, n. 4, p. 737-52, Aug 2005.
- BECERIK, S. et al. Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 83, n. 10, p. 1304-13, Oct 2012.
- BEKLEN, A. et al. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. **J Dent Res**, v. 86, n. 4, p. 347-51, Apr 2007.
- BENEVIDES, L. et al. Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 6, p. 1518-28, Jun 2013.

- BINDER GALLIMIDI, A. et al. Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22613-23, Sep 8 2015.
- BOSSHARDT, D. D.; LANG, N. P. The junctional epithelium: from health to disease. **J Dent Res**, v. 84, n. 1, p. 9-20, Jan 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional do Controle do Câncer de Mama**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/conceito_magnitude> Acesso em: 25 abr. 2016.
- CARDOSO, C. R. et al. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 1, p. 311-8, Jul 2008.
- CHANG, J. S. et al. Investigating the Association Between Periodontal Disease and Risk of Pancreatic Cancer. **Pancreas**, v. 45, n. 1, p. 134-41, Jan 2016.
- CHEN, W. C. et al. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. **Histopathology**, v. 63, n. 2, p. 225-33, Aug 2013.
- CHENG, W. C.; HUGHES, F. J.; TAAMS, L. S. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 6, p. 541-9, Jun 2014.
- CHITRAPRIYA, M. N.; RAO, S. R.; LAVU, V. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. **J Indian Soc Periodontol**, v. 19, n. 1, p. 14-7, Jan-Feb 2015.
- COBB, C. M. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. **J Clin Periodontol**, v. 29 Suppl 2, p. 6-16, May 2002.
- COFFELT, S. B. et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 345-8, Jun 18 2015.
- DE SOUZA, A. B. et al. Short-term changes on C-reactive protein (CRP) levels after non-surgical periodontal treatment in systemically healthy individuals. **Clin Oral Investig**, Apr 12 2016.
- DEMMER, R. T. et al. The influence of anti-infective periodontal treatment on C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77441, 2013.
- DU, J. W. et al. Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer. **Mol Med Rep**, v. 6, n. 5, p. 1099-102, Nov 2012.

DUTZAN, N. et al. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 5, p. 396-403, May 2009.

EBERSOLE, J. L. et al. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. **Periodontol 2000**, v. 62, n. 1, p. 163-202, Jun 2013.

EIRO, N. et al. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49047, 2012.

ESQUIVEL-VELAZQUEZ, M. et al. The role of cytokines in breast cancer development and progression. **J Interferon Cytokine Res**, v. 35, n. 1, p. 1-16, Jan 2015.

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

FREUDENHEIM, J. L. et al. Periodontal Disease and Breast Cancer: Prospective Cohort Study of Postmenopausal Women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 25, n. 1, p. 43-50, Jan 2016.

FRIDLENDER, Z. G.; ALBELDA, S. M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? **Carcinogenesis**, v. 33, n. 5, p. 949-55, May 2012.

GAMONAL, J. et al. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. **J Periodontol**, v. 71, n. 10, p. 1535-45, Oct 2000.

GAO, S. et al. Presence of Porphyromonas gingivalis in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer. **Infect Agent Cancer**, v. 11, p. 3, 2016.

GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **J Dent Res**, v. 89, n. 12, p. 1349-63, Dec 2010.

_____. The Role of Chemokines and Cytokines in the Pathogenesis of Periodontal and Periapical Lesions: Current Concepts. In: KHATAMI, Mahin (Ed.). **Inflammation, Chronic Diseases and Cancer - Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases**. Rijeka: Intech, 2012. Cap. 10. p. 219-264.

GOLDBERG, J. E.; SCHWERTFEGER, K. L. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. **Curr Drug Targets**, v. 11, n. 9, p. 1133-46, Sep 2010.

GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 74, n. 3, p. 391-401, Mar 2003.

GUO, L. et al. C-reactive protein and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, v. 5, p. 10508, 2015.

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, n. 6, p. 409-19, Dec 2012.

HAMIDULLAH; CHANGKIJA, B.; KONWAR, R. Role of interleukin-10 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 133, n. 1, p. 11-21, May 2012.

HAN, Y. W. Commentary: Oral bacteria as drivers for colorectal cancer. **J Periodontol**, v. 85, n. 9, p. 1155-7, Sep 2014.

HESPANHOL, F. L. et al. [Buccal manifestations in patients submitted to chemotherapy]. **Cien Saude Colet**, v. 15 Suppl 1, p. 1085-94, Jun 2010.

HIRAKI, A. et al. Teeth loss and risk of cancer at 14 common sites in Japanese. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 5, p. 1222-7, May 2008.

HUJOEL, P. P. et al. An exploration of the periodontitis-cancer association. **Ann Epidemiol**, v. 13, n. 5, p. 312-6, May 2003.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. **Int J Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2373-80, Dec 2007.

IACOPINO, A. M.; CUTLER, C. W. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. **J Periodontol**, v. 71, n. 8, p. 1375-84, Aug 2000.

IGARI, K. et al. Association between periodontitis and the development of systemic diseases. **Oral Biology and Dentistry**, v. 2, n. 1, p. 4, 2014-04-19 2014.

JAVED, F.; WARNAKULASURIYA, S. Is there a relationship between periodontal disease and oral cancer? A systematic review of currently available evidence. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 97, p. 197-205, Jan 2016.

JOHNSON, R. B.; SERIO, F. G. The contribution of interleukin-13 and -15 to the cytokine network within normal and diseased gingiva. **J Periodontol**, v. 78, n. 4, p. 691-5, Apr 2007.

KAMALI-SARVESTANI, E.; MERAT, A.; TALEI, A. R. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN-gamma) among Iranian women with breast cancer. **Cancer Lett**, v. 223, n. 1, p. 113-9, Jun 1 2005.

KAMMA, J. et al. Cytokines in gingival crevicular fluid of adolescents and young adults. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 1, p. 7-10, Feb 2009.

KECHAGIAS, N. et al. Metastasis of a ductal breast carcinoma to the buccal mucosa of the mandible with tooth involvement. **Oral Maxillofac Surg**, v. 16, n. 4, p. 377-81, Dec 2012.

KINANE, D. F. Aetiology and pathogenesis of periodontal disease. **Ann R Australas Coll Dent Surg**, v. 15, p. 42-50, Oct 2000.

KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 33-53, Jun 1997.

LIN, D. et al. IL-17 regulates the expressions of RANKL and OPG in human periodontal ligament cells via TRAF6/TBK1-JNK/NF-kappaB pathways. **Immunology**, Sep 29 2014.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest**, v. 117, n. 5, p. 1175-83, May 2007.

LINDEN, G. J.; LYONS, A.; SCANNAPIECO, F. A. Periodontal systemic associations: review of the evidence. **J Periodontol**, v. 84, n. 4 Suppl, p. S8-s19, Apr 2013.

LING, M. R.; CHAPPLE, I. L.; MATTHEWS, J. B. Peripheral blood neutrophil cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis. **Innate Immun**, v. 21, n. 7, p. 714-25, Oct 2015.

LLANES-FERNANDEZ, L. et al. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. **Breast**, v. 15, n. 4, p. 482-9, Aug 2006.

LOOS, B. G. Systemic markers of inflammation in periodontitis. **J Periodontol**, v. 76, n. 11 Suppl, p. 2106-15, Nov 2005.

_____. Systemic effects of periodontitis. **Ann R Australas Coll Dent Surg**, v. 18, p. 27-9, Sep 2006.

MACCALLI, C.; SCARAMUZZA, S.; PARMIANI, G. TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+ T lymphocytes) in the control of human tumors. **Cancer Immunol Immunother**, v. 58, n. 5, p. 801-8, May 2009.

MACHTEI, E. E. et al. Clinical criteria for the definition of "established periodontitis". **J Periodontol**, v. 63, n. 3, p. 206-14, Mar 1992.

MANTOVANI, A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. **Curr Mol Med**, v. 10, n. 4, p. 369-73, Jun 2010.

MEURMAN, J. H. Oral microbiota and cancer. **J Oral Microbiol**, v. 2, 2010.

MICHAUD, D. S. Role of bacterial infections in pancreatic cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 10, p. 2193-7, Oct 2013.

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. 171-5, Jan 2007.

_____. Periodontal disease and risk of all cancers among male never smokers: an updated analysis of the Health Professionals Follow-up Study. **Ann Oncol**, Jan 24 2016.

_____. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. **Lancet Oncol**, v. 9, n. 6, p. 550-8, Jun 2008.

MITSUHASHI, K. et al. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 7209-20, Mar 30 2015.

MOUTSOPOULOS, N. M. et al. Porphyromonas gingivalis promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. **J Autoimmun**, v. 39, n. 4, p. 294-303, Dec 2012.

MUKAIDA, N. et al. Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). **Microbiol Immunol**, v. 36, n. 8, p. 773-89, 1992.

NARAYAN, T. V. et al. Dental Caries and Periodontal Disease Status in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma: A Screening Study in Urban and Semiurban Population of Karnataka. **J Maxillofac Oral Surg**, v. 13, n. 4, p. 435-43, Dec 2014.

NIBALI, L. et al. Interleukin-6 in oral diseases: a review. **Oral Dis**, v. 18, n. 3, p. 236-43, Apr 2012.

NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 5, p. 325-37, Oct 2006.

NISHIMOTO, N. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. **Clin Pharmacol Ther**, v. 87, n. 4, p. 483-7, Apr 2010.

O'LEARY, T. J.; DRAKE, R. B.; NAYLOR, J. E. The plaque control record. **J Periodontol**, v. 43, n. 1, p. 38, Jan 1972.

OGUTCEN-TOLLER, M.; METIN, M.; YILDIZ, L. Metastatic breast carcinoma mimicking periodontal disease on radiographs. **J Clin Periodontol**, v. 29, n. 3, p. 269-71, Mar 2002.

OPPERMANN, R. V. et al. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. **Periodontol 2000**, v. 67, n. 1, p. 13-33, Feb 2015.

PENDYALA, G. et al. Links demystified: Periodontitis and cancer. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 10, n. 6, p. 704-12, Nov 2013.

- POULIAS, E.; MELAKOPOULOS, I.; TOSIOS, K. Metastatic breast carcinoma in the mandible presenting as a periodontal abscess: a case report. **J Med Case Rep**, v. 5, p. 265, 2011.
- PUROHIT, A.; NEWMAN, S. P.; REED, M. J. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 4, n. 2, p. 65-9, 2002.
- RAJEEV, R. et al. Role of bacteria in oral carcinogenesis. **South Asian J Cancer**, v. 1, n. 2, p. 78-83, Oct 2012.
- SADIGHI SHAMAMI, M.; AMINI, S. Periodontal Disease and Tooth Loss as Risks for Cancer: A Systematic Review of the Literature. **Iran J Cancer Prev**, v. 4, n. 4, p. 189-98, 2011.
- SANCHEZ, G. A. et al. Salivary IL-1beta and PGE2 as biomarkers of periodontal status, before and after periodontal treatment. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 12, p. 1112-7, Dec 2013.
- SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 37-49, Jan 2010.
- SCHMIDT, J. et al. General immune status and oral microbiology in patients with different forms of periodontitis and healthy control subjects. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109187, 2014.
- SEYMOUR, G. J. et al. Interleukin-2 production and bone-resorption activity in vitro by unstimulated lymphocytes extracted from chronically-inflamed human periodontal tissues. **Arch Oral Biol**, v. 30, n. 6, p. 481-4, 1985.
- SHIMADA, Y. et al. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. **J Periodontol**, v. 81, n. 8, p. 1118-23, Aug 2010.
- SILVA, N. et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. **J Appl Oral Sci**, v. 23, n. 3, p. 329-55, May-Jun 2015.
- SNOUSSI, K. et al. Genetic variation in pro-inflammatory cytokines (interleukin-1beta, interleukin-1alpha and interleukin-6) associated with the aggressive forms, survival, and relapse prediction of breast carcinoma. **Eur Cytokine Netw**, v. 16, n. 4, p. 253-60, Dec 2005.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000**, v. 38, p. 135-87, 2005.
- SÖDER, B. et al. Periodontal disease may associate with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 127, n. 2, p. 497-502, Jun 2011.
- TANWIR, F.; SADIA, B.; DUASHAUKAT, B. Relationship between periodontal disease, tooth loss and cancer. **Pakistan Oral & Dental Journal**. 32 2012.

- TENG, Y. T. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 5269-73, Sep 2002.
- TSAI, C. C. et al. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 23, n. 1, p. 1-7, Jan 2007.
- VAN DYKE, T. E.; VAN WINKELHOFF, A. J. Infection and inflammatory mechanisms. **J Periodontol**, v. 84, n. 4 Suppl, p. S1-7, Apr 2013.
- VAN KEMPEN, L. C.; DE VISSER, K. E.; COUSSENS, L. M. Inflammation, proteases and cancer. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 6, p. 728-34, Apr 2006.
- VOGTMANN, E.; GOEDERT, J. J. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. **Br J Cancer**, v. 114, n. 3, p. 237-42, Feb 2 2016.
- WANG, L. et al. Association analysis of IL-17A and IL-17F polymorphisms in Chinese Han women with breast cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e34400, 2012.
- YANG, L. et al. Expression of Th17 cells in breast cancer tissue and its association with clinical parameters. **Cell Biochem Biophys**, v. 62, n. 1, p. 153-9, Jan 2012.
- YUCEL-LINDBERG, T.; BAGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert Rev Mol Med**, v. 15, p. e7, 2013.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

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

Título da Pesquisa: Avaliação clínica, imunológica e hematológica de pacientes portadores de câncer com periodontite crônica

Pesquisador: Daniela Bazan Palioto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37030514.7.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 922.793

Data da Relatoria: 16/12/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e pela CONEP. Os pesquisadores são habilitados para execução do mesmo. Relevante para a área da saúde. Bem embasado cientificamente.

Objetivo da Pesquisa:

Os mesmos descritos no parecer inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos descritos no parecer inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores atenderam a todas as pendências do parecer inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado. Os relatórios (parciais/final) deverão ser encaminhados, utilizando-se da

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 922.793

opção “Enviar Notificação” (descrita no Manual “Submeter Notificação”, disponível na Central de Suporte – canto superior direito do portal www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 175ª R.O. do CEP.

RIBEIRAO PRETO, 19 de Dezembro de 2014

Assinado por:

Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você, _____ para participar voluntariamente do projeto intitulado “*Avaliação clínica, imunológica e hematológica em pacientes portadores de câncer com periodontite crônica*”, tendo como responsáveis pela execução os Cirurgiões-Dentistas Kelly Rocio Vargas Villafuerte, Felipe Torres Dantas e a Prof. Dra. Daniela Bazan Palioto, Professora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Antes de aceitar o convite tomarei ciência e serei esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- Que o estudo será realizado com o objetivo de avaliar minhas condições periodontais e monitorar o efeito do tratamento periodontal e avaliar minhas condições clínicas (dentes e suas estruturas de suporte), imunológicas (substâncias do sistema de defesa do corpo) e hematológicas (exames de sangue).
- Que a análise será feita após a avaliação dos parâmetros clínicos periodontais, coleta de sangue e coleta de fluido crevicular gengival (líquido que sai normalmente da gengiva) antes do início do tratamento periodontal, após 45 dias, seis meses e um ano do tratamento periodontal.
- Que a coleta de sangue será feita no Hospital das Clínicas, por um profissional experiente e que poderei sentir um leve desconforto durante o procedimento, que serão analisados em laboratório, e que serei informada dos resultados.
- Que a coleta de fluido crevicular gengival (líquido que sai normalmente da gengiva) será feita na Clínica de Pós-graduação da FORP- USP, por um profissional experiente e que poderei sentir um leve desconforto nos maxilares devido a necessidade de ficar com a boca aberta durante o procedimento, que será coletado com tiras de papel absorvente no sulco gengival, e que serei informada dos resultados ao final do projeto.
- Que após a realização do diagnóstico periodontal, será necessária a elaboração do plano de tratamento periodontal. No caso de não haver doença periodontal será feita a terapia preventiva como, instruções de higiene oral, raspagem supragengival (ultrassom) e/ou profilaxia com taça de borracha – Limpeza dental.
- Que antes de começar o tratamento periodontal serão realizados procedimentos de adequação do meio bucal como extrações dentárias (quando for necessário), profilaxia com ultrassom (limpeza), e adequação de restaurações em excesso/falta.
- Que o tratamento periodontal será realizado com curetas manuais e ultrassônicas, sob anestesia local (raspagem subgengival).
- Que poderei sentir um leve desconforto após o tratamento periodontal, que tende a diminuir em algumas horas após a realização do procedimento, porém a prescrição de remédios para dor poderá ser feita, caso tenha necessidade.
- Todo material a ser empregado nas coletas e no tratamento periodontal será previamente esterilizado (livre de germes/bactérias), e armazenado em embalagem individual que será aberta na minha frente.
- Após o término do tratamento periodontal, serei colocada no programa de manutenção da terapia periodontal.
- Serei informado antes e durante a realização da pesquisa, de como esta se desenvolverá, bem como de que forma ocorrerá a minha participação na mesma.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

- Os benefícios que deverei esperar com minha participação são diretos, como diagnóstico e tratamento da doença periodontal, além de informações e tratamento para prevenir a doença periodontal, melhorando minha qualidade de vida.
- Autorizo que as radiografias, fotografias, modelos, desenhos e informações relacionadas ao meu tratamento e quaisquer outras informações do planejamento de diagnóstico e tratamento poderão ser usados para divulgação e publicação em revistas científicas dos dados obtidos nesta pesquisa, desde que minha identidade não seja revelada. Tenho, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo que assegura a minha privacidade, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre profissionais estudiosos do assunto.
- Que autorizarei a utilização de dados do meu prontuário médico, caso seja portador de algum tipo de câncer, o qual se encontra no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, para que os pesquisadores possam coletar informações sobre minhas condições de saúde geral (condições sistêmicas), tipo e efeitos adversos da quimioterapia, valores dos exames de sangue complementares e características do tipo de câncer.
- Poderei, a qualquer momento, durante a elaboração do projeto, deixar de participar, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo, e que também poderei recolher junto aos idealizadores do estudo todos os documentos com meus dados coletados.
- Estou disposto a autorizar minha participação para que os resultados encontrados possam ajudar outras pessoas.
- Não será oferecido nenhum tipo de pagamento pela minha participação. Mas, será fornecido lanche e/ou almoço e transporte (ida e volta), se necessário.
- No caso de dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo o participante terá direito a custeio médico-odontológico.
- Ao final da pesquisa, serei informado sobre todos os resultados obtidos.
- Que este documento será elaborado em duas vias idênticas e uma delas ficará comigo. Terei que rubricar todas as páginas e assinar a última página.

Desta forma, confirmo que recebi de maneira clara, e tendo compreendido perfeitamente todas as informações sobre minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos direitos, das responsabilidades, dos riscos e dos benefícios, concordo com minha participação. Assim, **INFORMO QUE IREI PARTICIPAR DESTA PESQUISA POR LIVRE E ESPONTÂNEA**

Endereço do participante-voluntário(a)
 Domiciliado (Rua, Avenida, Conjunto):
 Bloco/ Nº/ Complemento:
 Bairro/ Cidade:
 Telefone:
 E- mail

Endereço do responsável pela pesquisa

Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Departamento de CTBMF e Periodontia.

Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto – SP - Brasil CEP: 14040-904

Tel (16) 3315-3980 / Fax: 3315-4788 / Celular: (16) 981180737

**ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO
PERIÓDICO *JOURNAL OF PERIODONTOLOGY***

**CYTOKINES PROFILE IN GINGIVAL CREVICULAR FLUID OF BREAST CANCER
PATIENTS WITH CHRONIC PERIODONTITIS**

Felipe T. Dantas, DDS*; Kelly R. Vargas-Villafuerte, DDS*; Hélio H. A. Carrara, DDS, PhD[†]; Francisco J. C. Reis, DDS, PhD[†]; Fabiani G. Frantz, Pharm.D[‡]; Michel R. Messori, DDS, PhD*; Daniela B. Palioto*.

*Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

[†]Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

[‡]Department of Clinical Analysis, Toxicological and Bromatological, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Prof. Dr^a. Daniela Bazan Palioto

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP.

Avenida do Café, S/N, 14040-904 Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

E-mail: dpalioto@forp.usp.br (e-mail can be published)

Tel: 0055-16-33154136; Fax: 0055-16-33154788 (fax number can be published).

Word count: 3431

Number of figures: 2

Number of tables: 2

Number of references: 37

Running title: Relationship between periodontitis and breast cancer.

Summary Sentence: Periodontal disease behaved as a source of inflammatory mediators, as IL-17 and TGF- β , which can impact on immunopathogenesis of breast cancer.

ABSTRACT

Background: Inflammatory cytokines in periodontal disease can cause systemic health impact. Cytokines in cancer may act in anti-tumor response or stimulate its development. This study aimed to characterize the crevicular fluid cytokines profile presented by breast cancer patients with chronic periodontitis. **Methods:** Plaque index - PI, bleeding on probing - BOP, probing depth - PD, clinical attachment level - CAL and cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β and IL-1 β were evaluated. Ninety women were selected: healthy (H) (n=20), chronic periodontitis (CP) (n=20), breast cancer (BC) (n=25) and breast cancer with CP (BC-CP) (n=25). Cytokines concentration was determined by Luminex method. Laboratory tests were performed as C-reactive protein, fasting blood glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol and white blood cell count in peripheral blood samples. All data were statistically analyzed by non-parametric tests. **Results:** CP and BC-CP groups had higher values PI, BOP, PD, and CAL (p <0.05). CP group showed higher neutrophils levels (p <0.05). CP group showed significant levels of IL-17 and TGF- β , IL-6 and IL-1 β compared to H group (p<0.05). In BC-CP group, IL-17 and TGF- β levels were significantly higher than BC group (p<0.05). **Conclusions:** Women in BC-CP group showed crevicular fluid pro-inflammatory cytokines profile, as evidenced by significant IL-17 expression. Furthermore, TGF- β was also increased. The combination IL-17 and TGF- β could have an impact on pro-tumorigenic activities in the tumor microenvironment. Thus, periodontal disease behaved as a source of inflammatory mediators related to the immunopathogenesis of breast cancer.

Keywords: Chronic periodontitis; Breast cancer; Inflammation; Immune system; Cytokines.

INTRODUCTION

Recent researches have linked periodontal infection to several systemic diseases, including cardiovascular disease, diabetes mellitus, preterm birth, respiratory disease and osteoporosis, possibly mediated through markers of systemic infection and inflammation. The results of several epidemiologic studies have also suggested a possible positive association between periodontal disease (PD) and cancer risk in the different tissues.¹⁻³

Among types cancer associated with periodontitis, is still unknown the possible link with breast cancer. There are several potential mechanisms that attempt to explain the association both diseases. One such explanation is that periodontal pathogens directly impacts in carcinogenesis accumulating in the breast tissue after bacteremia caused by daily activities such as tooth brushing, flossing and chewing, especially among those with gum disease, or by bacterial metabolites such as nitrosamines and acetaldehyde, which could have an effect on the genesis of cancer. Another potential mechanism, more plausible to date, is the inflammation resulted from chronic periodontitis is associated with systemic inflammation, including increased C-reactive protein, cytokines and chemokines in the blood, which could participate in mammary carcinogenesis.⁴

It has been postulated that cytokines profiles characteristic of a Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-1 β – pro-inflammatory) and Th2 (IL-4, IL-10 e TGF- β – anti-inflammatory), individually or in combination, may modulate the host response to periodontal infection. The Th1/ h2 balance depend on the PD stage and may be

related to an immune response with destructive characteristics or tissue homeostasis.^{5,6} Nevertheless, it has been suggested that Th17 cells, a third population of TCD4⁺ effector cells, and IL-17 cytokines also play a crucial role in immunopathogenesis of periodontal disease. The relationship Th17/IL-17 is associated with gingival inflammation, bone destruction and increased severity of PD.⁷⁻¹¹

In breast cancer, inflammatory cells are recruited into the neoplastic processes and initially are potent tumor promoters by creating a favorable environment for tumor growth, facilitating genomic instability and promoting angiogenesis. Later in the process, malignant cells redirect inflammatory mechanisms in favor of neoplastic growth and metastasis. Among the major soluble mediators in inflammation related to breast cancer are IL-2, IFN- γ , IL-1 family (IL-1 α and IL-1 β), TNF- α , IL-6 and TGF- β .¹² Special attention should also be given to IL-17 in breast cancer. It has been widely associated with the risk of this malignancy, tumor growth by increasing angiogenesis, aggressiveness and metastasis.¹³⁻¹⁵

There is limited information evaluating association between PD and breast cancer, especially, about the level of inflammatory cytokines in patients with both diseases. Therefore, the aim of the present study is to evaluate the inflammatory profile of patients with breast cancer with or without chronic periodontitis.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Ninety female patients, 20 healthy (H), 20 chronic periodontitis patients (CP), 25 breast cancer patients (BC), and 25 BC and CP patients (BC-CP) – were recruited over 2 years from March 2014 to March 2016. The study protocol was approved by the Institutional Ethical Committee (Protocol 37030514.7.0000.5419). All participants signed written informed consent in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 (revised in 2013). Although it was not the main purpose of this study, all patients with CP were referred for treatment. The selection of the patients was made according to the clinical criteria proposed by the 1999 International World Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions.

Inclusion and Exclusion Criteria

The inclusion criteria were: 1) age ≥ 35 years; 2) a minimum of 15 teeth; 3) presence of 6 teeth with probing depth (PD) ≥ 5 mm and clinical attachment level (CAL) ≥ 5 mm to the groups PC and BC-PC; 4) No CAL loss on the H and BC groups 5) women diagnosed for the first time with breast cancer and without chemotherapy to the groups BC and BC-PC.

The exclusion criteria were: 1) subgingival periodontal therapy or antibiotic treatment in the previous 6 months; 2) systemic diseases that could affect the periodontitis progression (e.g., diabetes and osteoporosis); 3) extensive prosthetic involvement; 4) long-term administration of anti-inflammatory medication; 6) smoking; 7) pregnancy; 8) patients had previously received chemotherapy or radiotherapy and 9) patients with metastasis and/or patients with neoadjuvant chemotherapy.

Clinical Assessment

All clinical parameters in four groups were recorded at baseline (pre-intervention periodontal and chemotherapy period). The clinical periodontal

parameters were assessed at six sites around each tooth (mesio-buccal, midbuccal, disto-buccal, mesio-lingual, mid-lingual, and disto-lingual locations) and included probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), plaque index (PI) and bleeding on probing (BOP). All measurements were performed using an automated periodontal probe*. Clinical measurements were performed by a calibrated examiner. PI was determined by the presence or absence of plaque at the gingival margin on the four faces of the tooth, BOP as presence or absence of bleeding 20 seconds after probing. PI and BOP was expressed as a percentage of biofilm and of bleeding on the total of tooth surfaces. PD was measured from the free gingival margin to the bottom of the periodontal pocket and the CAL was measured from the cementum-enamel junction (CEJ) to the bottom of periodontal pocket.

Examiner Calibration

All clinical parameters were measured by a single and calibrated examiner (periodontist). For calibration, at two separate sessions, 48 hours apart, duplicate measurements of PD and CAL were obtained from ten patients who were not related to this study and presented at least two pairs of teeth with $PD \geq 5$ mm in proximal sites. The examiner was considered calibrated when the percentage of agreement between repeated measurements, assuming the maximum variation of 1 mm, was greater than or equal to 90%. The coefficient of intra-class correlation was used to ensure calibration of the examiner.

Collection of GCF Samples

In all groups, gingival crevicular fluid (GCF) samples were obtained from the mesio-buccal sites of four posterior teeth by the same periodontist on the day of clinical assessment. GCF samples were obtained from teeth with $PD > 5$ mm in the CP

and BC-CP. In the H and BC groups, samples were collected from teeth with PD $\leq$ 3 mm without bleeding. Before GCF sampling, the supragingival plaque was removed from the interproximal surfaces with a sterile curet; these surfaces were dried gently by an air syringe and were isolated by cotton rolls. GCF was sampled with filter paper. Papers trips were carefully inserted in to the crevice until mild resistance was felt and were left there for 30 seconds; care was taken to avoid mechanical injury. Strips contaminated with blood were discarded. Papers trips absorbed GCF were placed into sterile polypropylene tubes (12 papers per tube), and kept at -80 °C until analyzed.

Blood Sampling

In all groups to assess condition of the systemic health, in each patient, 5ml of peripheral blood samples were collected by a standard venipuncture method in the antecubital vein, before initiation of any periodontal intervention, in the morning period and fasting for 12 hours for analysis of C-reactive protein (CRP), fasting blood glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol and neutrophils.

Biochemical Analysis

The amount of total protein of each sample was determined by conventional enzyme-linked immune sorbent assays, using commercially available kits (Bio-Rad, California, EUA) and the results were expressed as milligram per milliliter (mg/mL). The levels of the cytokines in GCF samples were determined using high-sensitivity kits[†] and the multiplexing instrument according to the recommendations of the manufacturer[‡]. The samples were evaluated individually, and the concentrations of each cytokine were estimated from the standard curve using a five-parameter polynomial equation with specific software xPONENT^{®§}. The results were expressed

as picograms per milliliter (pg/mL). Values found for each cytokine (pg/ml) were normalized by dividing them by the total protein value (mg/ml). Thus, the results were expressed in picograms per milligram (pg/mg).

Peripheral blood samples were processed following the specific protocols of the Institutional Clinical Analyzes Laboratory and C-reactive protein (CRP) was measured by the turbidimetry method.

Statistical Analyses

Power calculation analysis revealed that the minimum required sample size was twenty for each group. Considering a difference of 50% in mean GCF levels of the biochemical markers, assuming standard deviations to be a maximum of 80% of the mean values, accepting a power of 90%, and $p=0.05$ in healthy and diseased groups, a minimum sample size was calculated. Statistical analysis was performed using non-parametric tests, and the patient was used as the unit of the observation. Comparisons among the study groups were performed using the Kruskal-Wallis test. When there were significant differences ($p<0.05$), two-group comparisons were assessed with Dunn post hoc tests, and $p<0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Clinical Findings

All women in the CP and BC-CP groups were diagnosed with severe generalized chronic periodontitis, and the BC and BC-CP groups had been

diagnosed with breast cancer for the first time. There was no difference in ages among the study groups ($p>0.05$).

The whole-mouth clinical parameters are presented in **Table 1**. The number of teeth was significantly lower in the BC-CP group compared with the CP group ($p<0.05$). The CP and BC-CP groups had significantly higher PD, CAL, PI means and BOP scores compared with BC and H groups ($p<0.05$).

Blood Sampling Findings

All hematological parameters are presented in **Table 2**. There was no difference in mean of C-reactive protein (CRP), fasting blood glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL cholesterol and HDL cholesterol between the four groups ($p>0.05$). However, neutrophils mean were significantly higher in CP group compared with H, BC and BC-CP groups ($p<0.05$).

GCF Cytokine Levels

The concentration of pro-inflammatory cytokines is shown in **Figure 1**. There was no significant difference in the GCF concentrations of IL-2, IFN- γ and TNF- α among the study groups (**Fig. 1A, 1B and 1C**). CP group had higher IL-6 total amounts compared to the H group ($p<0.05$) and higher IL-1 β levels than the H and BC groups ($p<0.05$) (**Fig. 1D and 1F**). BC-CP group had higher IL-1 β and IL-6 total amounts than the BC group, but the difference was not significant ($p>0.05$) (**Fig. 1D and 1F**). CP and BC-CP groups had significantly higher IL-17 compared to H and BC groups ($p<0.05$). However, there was no difference among CP and BC-CP groups in IL-17 levels ($p>0.05$) (**Fig. 1E**).

The concentration of anti-inflammatory cytokines is shown in **Figure 2**. There was no significant difference in the concentrations of IL-4 and IL-10 among the four groups (**Fig. 2A and 2B**). The CP and BC-CP groups had significantly higher TGF- β levels compared to H and BC groups ($p < 0.05$). However, there was no difference among the CP and BC-CP groups in TGF- β total amounts ($p > 0.05$) (**Fig. 2C**).

DISCUSSION

It has been shown that the immune response to periodontal infection impacts on systemic inflammation and, consequently, increases the risk of cancer.¹⁶ The lack of studies investigating the role of PD in breast carcinogenesis and the fact that these conditions are prevalent public health problems justify the need for further exploration in this field. To the best of our knowledge, this is the first study evaluating the GCF IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , IL-1 β and IL-17 levels in women with breast cancer and chronic periodontitis. Th1 lymphocyte profiles (IL-2, IFN- γ and TNF) and Th2 (IL-4, IL-10, TGF- β and IL-6) are well documented as the main responsible of the host response modulating the periodontal infections.^{5,6} Nevertheless, it has been suggested that Th17 cells and IL-17 cytokines also play a crucial role in the periodontal disease.⁸ The Th17/IL-17 profile is associated with gingival inflammation and bone destruction, in patients with periodontitis and animal models.⁹⁻¹¹ Moutsopoulos et al.,⁷ reported that *P. gingivalis*, a major periodontal pathogen is able to induce Th17/IL-17 response through mechanisms involving the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6. In this study, GCF IL-17, IL-1 β and IL-6 levels were significantly increased in the CP group ($p < 0.05$) when compared to healthy controls (H), reaffirming the importance of Th17/IL-17 profile in the pathogenesis of PD.

Yang et al.,¹⁷ assessed the expression of Th17 cells and regulatory T cells (Treg) in breast cancer tissues compared to normal tissues. High concentrations of Th17 cells in tissues with malignancy were correlated positively with IL-17 expression, IL-6 and IL-1 β , although these cells have not been associated with Treg. For those authors, Th17 cells (IL-17) are involved in antitumor response and promote better cancer prognosis. However, for Benavides et al.,¹⁸ Th17 cells (IL-17) and Treg (TGF- β and IL-10) are synchronously increased in the microenvironment of invasive ductal carcinoma and are associated with tumor aggressiveness and poor prognosis. The biological plausibility that supports these findings is the fact that IL-17 is able to induce angiogenic factors and vascular endothelial growth factors favoring tumor growth. Furthermore, Treg cells through their TGF- β and IL-10 cytokines may mediate effector immunosuppression and inhibit immune responses, stimulating the proliferation and cancer invasion. TGF- β in combination with IL-6 induces TCD8 + cells to produce IL-17, and when IL-1 β enters this context, these cytokines amplify the differentiation of Th17 cells and create a chronic inflammatory condition which favors tumor progression. Results of Chen et al.,¹⁹ corroborate these findings by stating that high levels of IL-17 producing cells in the tumor microenvironment is a negative prognostic factor, having been correlated with higher histological grades of the tumor and absence of expression of cell receptors for hormones. In the present study, Th17 profiles (IL-17) and Treg (TGF- β) were clearly evident in CP and BC-CP groups. When compared the BC and BC-CP groups, it was observed a significant increase in IL-17 and TGF- β in women BC-CP group ($p < 0.05$). Additionally, GCF IL-1 β and IL-6 levels were also elevated in BC-CP group compared to the BC group ($p > 0.05$). This suggests that periodontal disease may favor an increase in cytokines related to breast cancer progression. Therefore, special attention should be given to

patients with periodontal disease and breast cancer, since IL-17 has been widely associated with the malignancy risk,¹³ tumor growth by increasing angiogenesis,¹⁴ aggressiveness and metastasis.¹⁵

In the PD, profile Th2 (IL-4, IL-10, TGF- β and IL-6) stimulates a humoral immune response mediated by antibodies and related tissue repair.⁶ In this context, TGF- β acts as a beneficial cytokine that modulates inflammation, controls exacerbation of immune response and enhances repair of periodontal tissue by angiogenesis. On the other hand, it was seen in the tumor microenvironment as a factor that favors malignant cells to escape the immune system, reducing the antitumor response, allowing the tumor growth and proliferation, besides activating Th17 responses with pro-angiogenic features.²⁰ GCF TGF- β levels in this study were higher in the CP group. In BC-CP group, these values were also significantly increased compared to the BC group ($p < 0.05$), suggesting that the presence of periodontal disease in patients with breast cancer increased levels of this cytokine, which could contribute to the tumor development.

Associated with TGF- β , IL-10 participates in the Treg response and contributes to the suppression of the immune response, both in sites with periodontal involvement as the breast tissue affected by the cancer. It inhibits IL-6, TNF- α , IL-1 IL-8 and IL-12, suppresses antigen-presenting cells, inhibits activate macrophages and T cells. In periodontal tissues IL-10 acts to attenuate inflammation and alveolar bone loss, which could be harmful to the host,²¹ whereas this immunosuppression in breast cancer may promote tumor progression.²² In this study, no significant differences were observed in IL-10 levels of the four groups, although lower levels were present in the BC-CP group. The fact this cytokine be pleotropic and play pro-

inflammatory functions (destructive) and anti-inflammatory (protective) could explain this possible contradiction.²²

The INF- γ and IL-2, pro-inflammatory cytokines participate in Th1 immune response and have been associated with excessive inflammation and tissue damage on periodontal patients.²³ The present study showed high levels of INF- γ and IL-2 in the CP group compared to healthy controls (H) ($p > 0.05$). Although, there was slightly lower levels of this cytokine in the BC-CP group in relation to CP ($p > 0.05$), it is suggested that in these patients the Th1 profile is decreased due to the increased expression of Treg profiles (TGF- β /IL-10) and Th17/IL-17. This decrease could favor the growth of breast cancer by compromising the IFN- γ and IL-2 function, since this cytokines have been associated with an efficient antitumor activity, reduction of oncogenes, increased tumor suppressor genes and increased apoptosis.^{12,20,24}

The highest expression of Treg (TGF- β /IL-10) and Th17/IL-17 profiles could also explain the results seen with GCF TNF- α (Th1) and IL-4 (Th2) levels in women with breast cancer and chronic periodontitis ($p > 0.05$). Another possible explanation for IL-2, IFN- α , TNF- α and IL-4 local levels is the fact that breast tumor being in progress and modulates the production of systemic cytokines (downregulate),²⁰ with a consequent impact on periodontal tissues, showing that there may be a bidirectional relationship between breast cancer and periodontal disease. However, new studies are necessary to elucidate the mechanisms by which periodontal disease and breast carcinoma affect each other. On the other hand, the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 were higher in the BC-CP compared with BC ($p > 0.05$), suggesting that periodontal disease might spread systemically and cause adverse impact on the anti-tumor response. IL-1 β and IL-6 are related to a powerful breast pro-tumorigenic activity by activating pro-metastatic genes, stimulate

angiogenesis and promote the proliferation and tumor invasion²⁵. The combination IL-1 β and IL-6 stimulates the response Th17/IL-17¹⁸ and the production of estrogen, a hormone which promotes breast cancer cell growth.²⁶

All women with breast cancer had invasive ductal carcinoma without metastasis at the study time. It was decided to recruit women who were first diagnosed with breast cancer and who had not undergone any treatment, such as chemotherapy, radiation therapy or mastectomy to avoid the interference of these therapies in periodontal and systemic conditions. The anticancer treatment induces several side effects both in the oral cavity and in the systemic condition of individuals. For example, during chemotherapy, the gum might be affected due to direct stomatotoxicity the chemotherapeutic drug, which may induce marginal gingivitis and periodontitis or aggravate pre-existing periodontal conditions, and the risk of systemic complications of immunosuppression.²⁷

Among the four groups, there were no statistically significant differences in hematological results, such as C-reactive protein, fasting blood glucose, total cholesterol and fractions (HDL and LDL) and triglycerides. These findings show that, despite the presence of breast cancer and periodontal disease, systemic condition of the patients was similar. In this context, the average fasting blood glucose showed that patients were within acceptable benchmarks, proving the absence of diabetes, a major risk factor for periodontal disease. Diabetes and smoking are factors that modify the host's immune response and thus interfere with the course of PD, its severity and response to treatment.³ To Söder et al.,²⁸ smoking is a major risk factor for many malignant tumors and deserves special attention. In this sample there were no smokers, since smoking was an exclusion criterion.

The number of neutrophils was statistically higher in the CP group compared to H, BC, BC-CP groups ($p < 0.05$). These findings can be explained by the fact that neutrophils are the first line of defense to a periodontal infection and are found in large numbers in the bloodstream due to systemic dissemination of inflammatory mediators and microorganisms PD.^{29,30} In BC-CP and BC groups, neutrophils values were similar to those of the H group ($p > 0.05$). One possible explanation for this finding is that although neutrophils participate in the mechanisms involved in the antitumor response, its function is more evident in later stages of the disease, usually with normal levels in the early stages of tumor.¹⁵ To Fridlender and Albelda,³¹ neutrophils are constantly recruited to the tumor microenvironment and neutrophilia is observed when the cancers are more advanced. In this study, most patients were in the initial tumor grade and metastasis was absent.

An important aspect was the lowest number of teeth in the BC-CP group compared the CP group ($p < 0.05$). Many studies investigating the association of PD and cancer have correlated tooth loss with increased risk of malignancy.³²⁻³⁶ Amodio et al.,³⁷ also found fewer remaining dental units in a population with the same characteristics of this study. In this context, Michaud et al.,⁽¹⁶⁾ suggest that PD may be a marker of susceptibility of the compromised immune system and/or can directly affect the risk of cancer. However, Söder et al.,⁽²⁸⁾ pointed out that tooth loss may occur for reasons other than PD, such as cavities and endodontic abscesses, which are also characterized by infection/chronic inflammation.

CONCLUSIONS

Women with breast cancer and chronic periodontitis showed pro-inflammatory cytokines profile compared to cancer patients, as evidenced by significant expression

Th17/IL-17 profile in gingival crevicular fluid. Furthermore, the Treg (TGF- β) profile was also increased in cancer patients with CP. The combination Th17/IL-17 and Treg (TGF- β) can possibly enhance pro-tumorigenic activities in the tumor microenvironment. Therefore, periodontal disease behaved as a source of inflammatory mediators that can impact immunopathogenesis of breast cancer. Future studies are needed to clarify the mechanisms involved in this relationship.

Footnotes

*Florida Probe, Gainesville, FL, EUA.

[†]HSCYTMAG-28SK e TGFBMAG-64K-01 – Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA.

[‡]MAGPIX®- Luminex Corporation, Austin, TX, EUA.

[§]Luminex Corporation, Austin, TX, EUA.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. J Periodontol. 2013;84(4 Suppl):S1-7.
2. Linden GJ, Lyons A, Scannapieco FA. Periodontal systemic associations: review of the evidence. J Periodontol. 2013;84(4 Suppl):S8-s19.
3. Igari K, Kudo T, Toyofuku T, Inoue Y, Iwai T. Association between periodontitis and the development of systemic diseases. Oral Biology and Dentistry. 2014;2(1):4.

4. Freudenheim JL, Genco RJ, LaMonte MJ, Millen AE, Hovey KM, Mai X, et al. Periodontal Disease and Breast Cancer: Prospective Cohort Study of Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(1):43-50.
5. Teng YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun.* 2002;70(9):5269-73.
6. Ebersole JL, Dawson DR, 3rd, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, Gonzalez OA. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. *Periodontol 2000.* 2013;62(1):163-202.
7. Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun.* 2012;39(4):294-303.
8. Cheng WC, Hughes FJ, Taams LS. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2014;41(6):541-9.
9. Lin D, Li L, Sun Y, Wang W, Wang X, Ye Y, et al. IL-17 regulates the expressions of RANKL and OPG in human periodontal ligament cells via TRAF6/TBK1-JNK/NF-kappaB pathways. *Immunology.* 2014.
10. Awang RA, Lappin DF, MacPherson A, Riggio M, Robertson D, Hodge P, et al. Clinical associations between IL-17 family cytokines and periodontitis and potential differential roles for IL-17A and IL-17E in periodontal immunity. *Inflamm Res.* 2014;63(12):1001-12.
11. Chitrapriya MN, Rao SR, Lavu V. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol.* 2015;19(1):14-7.
12. Nicolini A, Carpi A, Rossi G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(5):325-37.
13. Wang L, Jiang Y, Zhang Y, Wang Y, Huang S, Wang Z, et al. Association analysis of IL-17A and IL-17F polymorphisms in Chinese Han women with breast cancer. *PLoS One.* 2012;7(3):e34400.
14. Du JW, Xu KY, Fang LY, Qi XL. Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer. *Mol Med Rep.* 2012;6(5):1099-102.
15. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2015;522(7556):345-8.
16. Michaud DS, Liu Y, Meyer M, Giovannucci E, Joshipura K. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2008;9(6):550-8.

17. Yang L, Qi Y, Hu J, Tang L, Zhao S, Shan B. Expression of Th17 cells in breast cancer tissue and its association with clinical parameters. *Cell Biochem Biophys*. 2012;62(1):153-9.
18. Benevides L, Cardoso CR, Tiezzi DG, Marana HR, Andrade JM, Silva JS. Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *Eur J Immunol*. 2013;43(6):1518-28.
19. Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR, Su IJ, Chen HH. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology*. 2013;63(2):225-33.
20. Esquivel-Velazquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The role of cytokines in breast cancer development and progression. *J Interferon Cytokine Res*. 2015;35(1):1-16.
21. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010;89(12):1349-63.
22. Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(1):11-21.
23. Yucel-Lindberg T, Bage T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013;15:e7.
24. Kamali-Sarvestani E, Merat A, Talei AR. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN-gamma) among Iranian women with breast cancer. *Cancer Lett*. 2005;223(1):113-9.
25. Eiro N, Gonzalez L, Gonzalez LO, Fernandez-Garcia B, Lamelas ML, Marin L, et al. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. *PLoS One*. 2012;7(11):e49047.
26. Purohit A, Newman SP, Reed MJ. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002;4(2):65-9.
27. Hespanhol FL, Tinoco EM, Teixeira HG, Falabella ME, Assis NM. [Buccal manifestations in patients submitted to chemotherapy]. *Cien Saude Colet*. 2010;15 Suppl 1:1085-94.
28. Söder B, Yakob M, Meurman JH, Andersson LC, Klinge B, Söder P. Periodontal disease may associate with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(2):497-502.
29. Loos BG. Systemic effects of periodontitis. *Ann R Australas Coll Dent Surg*. 2006;18:27-9.

-
30. Ling MR, Chapple IL, Matthews JB. Peripheral blood neutrophil cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis. *Innate Immun.* 2015;21(7):714-25.
 31. Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis.* 2012;33(5):949-55.
 32. Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, Weiss NS. An exploration of the periodontitis-cancer association. *Ann Epidemiol.* 2003;13(5):312-6.
 33. Sadighi Shamami M, Amini S. Periodontal Disease and Tooth Loss as Risks for Cancer: A Systematic Review of the Literature. *Iran J Cancer Prev.* 2011;4(4):189-98.
 34. Tanwir F, Sadia B, Duashaukat B. Relationship Between Periodontal Disease, Tooth Loss And Cancer. *Pakistan Oral & Dental Journal* 2012.
 35. Javed F, Warnakulasuriya S. Is there a relationship between periodontal disease and oral cancer? A systematic review of currently available evidence. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;97:197-205.
 36. Michaud DS, Kelsey KT, Papathanasiou E, Genco CA, Giovannucci E. Periodontal disease and risk of all cancers among male never smokers: an updated analysis of the Health Professionals Follow-up Study. *Ann Oncol.* 2016.
 37. Amódio J, Palioto DB, Carrara HH, Tiezzi DG, Andrade JM, Reis FJ. Oral health after breast cancer treatment in postmenopausal women. *Clinics (Sao Paulo).* 2014;69(10):706-8.

TABLES AND FIGURE LEGENDS

Table 1: Clinical Parameters in the study groups (mean $\pm$ standard deviation)

	H	CP	BC	BC-CP	p
	n=20	n=20	n=25	n=25	value
Age (years)	44,3 $\pm$ 9,1	44,6 $\pm$ 6,1	44 $\pm$ 5,3	48,8 $\pm$ 9,4	p>0.05 NS
Number of					
teeth	24,9 $\pm$ 4,6	26,4 $\pm$ 4,5	25,2 $\pm$ 3,6	21,6 $\pm$ 6,7 [†]	p<0.05
PI (%)	15,8 $\pm$ 15,8	62,3 $\pm$ 27,6**	19,5 $\pm$ 4,5	56,3 $\pm$ 27,3**	p<0.05
BOP (%)	22,05 $\pm$ 17,2	63 $\pm$ 29,4**	37,2 $\pm$ 33,05	58,1 $\pm$ 28,9**	p<0.05
PS (mm)	1,9 $\pm$ 0,37	2,8 $\pm$ 0,76**	2,02 $\pm$ 0,30	2,8 $\pm$ 0,83**	p<0.05
CAL (mm)	2,1 $\pm$ 0,47	3,2 $\pm$ 0,74**	2,2 $\pm$ 0,45	3,4 $\pm$ 1,07**	p<0.05

NS = Not significant (ANOVA test, p>0.05).

[†]Significant difference from the CP group (Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* of Dunn).

**Significant difference from the H and BC groups (Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* of Dunn).

Table 2: Hematological Parameters in the study groups (mean $\pm$ standard deviation).

	H	CP	BC	BC-CP	Reference	<i>p</i>
	n=20	n=20	n=25	n= 25	value [†]	value
C-reactive	0,57	0,73	0,76	0,57	until 0,50	p > 0.05
protein	±0,72	±1,19	±0,87	±0,35	mg/dL	NS
Neutrophils	56,3	66,6	56,7	55	40-60%	p < 0.05
	±4,8	±7,1*	±11,4	±15,6		
Fasting blood	89,1	87,6	89,8	91,1	70-100 mg/dL	p > 0.05
glucose	±7,5	±9,1	±7,9	±8,3		NS
Total	190,2	191,5	206,8	214,8	< 200 mg/dL	p > 0.05
cholesterol	±29,7	±30,2	±37,8	±34,5		NS
HDL						
cholesterol	46,2	47,3	49,3	51,9	> 35	p > 0.05
	±9,8	±12,0	±12,1	±12,4	mg/dL	NS
LDL						
cholesterol	122,8	136,1	148,6	138,3	< 130	p > 0.05
	±27,1	±31,5	±29,8	±32,9	mg/dL	NS
Triglycerides	114,4	113,8	158,4	137,5	< 150	p > 0,05
	±50,7	±58,4	±100	±93,3	mg/dL	NS

NS = Not significant (Kruskal-Wallis, p>0.05).

*Significant difference from the H, BC and BC-CP (Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* of Dunn).

[†]Reference values used by the Institutional Clinical Analysis Laboratory.

Figure 1: GCF concentration of pro-inflammatory cytokines (pg/mg). A) IL-2; B) IFN- γ ; C) TNF- α ; D) IL-6; E) IL-17; F) IL-1 β . Dot Plot shows medians, 25th and 75th percentiles. * $p < 0.05$, difference statistically significant (Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* of Dunn).

Figure 2: GCF concentration of anti-inflammatory cytokines (pg/mg). A) IL-4; B) IL-10; C) TGF-β. Dot Plot shows medians, 25th and 75th percentiles. * $p < 0.05$, difference statistically significant (Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* of Dunn).

ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO AO PERIÓDICO *JOURNAL OF PERIODONTOLOGY*

25/05/2016

ScholarOne Manuscripts

Journal of Periodontology

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to Journal of Periodontology

Manuscript ID JOP-16-0335

Title Cytokines Profile in Gingival Crevicular Fluid of Breast Cancer Patients With Chronic Periodontitis

Authors Dantas, Felipe
Villafuerte, Kelly
Carrara, Hélio
Candido dos Reis, Francisco
Frantz, Fabiani
Messora, Michel
Palioto, Daniela B.

Date Submitted 25-May-2016