UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

KELLY ROCIO VARGAS VILLAFUERTE

**Efeitos do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre o perfil de citocinas
inflamatórias em pacientes com periodontite crônica e câncer de mama
submetidos à quimioterapia**

PG-PERIO
FOP - USP

RIBEIRÃO PRETO

2017

KELLY ROCIO VARGAS VILLAFUERTE

**Efeitos do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre o perfil de citocinas
inflamatórias em pacientes com periodontite crônica e câncer de mama
submetidos à quimioterapia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Periodontia da Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo,
como requisito para a obtenção de título de
Doutor em Odontologia (Periodontia).

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

RIBEIRÃO PRETO

2017

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Villafuerte, Kelly Rocio Vargas

Efeitos do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre o perfil de citocinas inflamatórias em pacientes com periodontite crônica e câncer de mama submetidos à quimioterapia/ orientadora Daniela Bazan Palioto. Ribeirão Preto - São Paulo, 2017.

157 p.: il; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Palioto, Daniela Bazan.

1. Câncer de mama.
2. Quimioterapia.
3. Periodontite crônica.
4. Sistema imunológico.
5. Fluido crevicular gengival.
6. Citocinas.
7. Terapia periodontal não cirúrgica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

VILLAFUERTE, Kelly Rocio Vargas

Título: Efeitos do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre o perfil de citocinas inflamatórias em pacientes com periodontite crônica e câncer de mama submetidos à quimioterapia.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: ____ / ____ / 2017

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Leoncio G. Vargas Santander e mãe **Paulina Villafuerte de Vargas**, meus exemplos de vida e de amor incondicional para seus filhos em todo momento. Muito obrigada pela minha educação, formação moral, perseverança, força, pelo apoio em todos meus sonhos e porque nunca mediram esforços para me ver feliz. Sou muito grata a Deus por ter vocês na minha vida. AMO muito vocês!

À minha querida irmã e sobrinha,

Zulema Vargas Villafuerte, pelo seu amor, pela união, pelos momentos felizes, pela amizade, atenção, compreensão, incentivo e ajuda desprendida durante todo este período distante, mas com os corações juntos.

Antonella Alessandra Victoria Conza Vargas, minha querida sobrinha sua chegada me fez muito feliz, AMO muito vocês!

À minha avó

Eulalia Villafuerte (*in memoriam*), obrigada por ser meu anjo, durante todo este tempo.

A meu namorado,

Luiz Henrique Palucci Vieira, Deus coloca as pessoas no momento preciso e é como você chegou na minha vida. Obrigada por todos os momentos vividos, pelo seu amor, companheirismo, cuidado, incentivo, ajuda e por me fazer sentir especial em todo momento. Espero sempre estar de seu lado. Te AMO!

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Que me deu o maior presente, o dom da vida.

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o senhor, “planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro”.

Jeremias 29:11

À minha orientadora,

Prof^a. Dr^a. **Daniela Bazan Palioto**. OBRIGADA pela confiança, desde o início do mestrado e agora no doutorado, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual. Meu carinho e minha gratidão por me permitir dar mais um passo em minha vida profissional.

Aos Professores do departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas, **Prof. Francisco José Candido dos Reis, Prof. Hélio Humberto Angotti Carrara**, obrigada pela sua ajuda e disposição para a realização deste projeto. Serei grata para sempre.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Periodontia, **Prof. Arthur Belém Novaes Junior, Prof. Michel Reis Messoria, Prof. Sérgio Scombatti de Souza, Prof. Mario Taba Junior**, muito obrigada pelos conhecimentos transmitidos durante estes seis anos. Foi uma grande experiência conviver com mestres que são referências nacionais e internacionais da área. Minha gratidão para todos vocês.

Às Professoras **Ana Carolina Fragoso Motta e Camila Tirapelli**, muito obrigada pelo carinho, confiança e pela atenção que sempre tiveram comigo desde que cheguei aqui a Ribeirão Preto. Obrigada por me permitir participar do DAPE e de outros projetos. Tenho gratidão por vocês.

À minha turma de doutorado, **Mariana Sales, Cristine D’Almeida, Paula Pessoa, Felipe Santos e Marcos Invernici** pela amizade, companheirismo e por compartilhar estes anos de muito aprendizado.

Aos meus colegas do mestrado e doutorado, **Pedro Henrique Felix, Renata Cardoso, Wesley Cadore, Kleber Suzuki, Yasmin Dal Acqua, Natacha Malu, Sergio Lago, Catarina Tahim, Luiz Fernando Ferreira**. Obrigada pela amizade.

A **Felipe Torres**, meu amigo e companheiro de trabalho. Muito obrigada pela sua valiosa ajuda. Torço pelo seu sucesso.

Aos meus amigos, **Cristhiam Hernandez e Atila Nobre**, obrigada pela sua amizade, pelo carinho e companhia. Levarei comigo, essa amizade.

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.

Às enfermeiras do Hospital das Clínicas em especial a **Dulce, Luci, Rose e Alaíde** pela sua ajuda em todo momento.

A todos os funcionários da FORP-USP, de forma especial à **Dani, Joana**, funcionárias da Clínica de Pós-graduação, e a **Isabel e Daniela** secretárias do departamento de CTBMF e Periodontia, obrigada pela colaboração e pelo carinho durante esses anos.

À minha amiga, **Maria Helena Mendça Abud** que me acolheu no seio da sua família, oferecendo-me o carinho, a preocupação e o aconchego que a mãe oferece para suas filhas. Obrigada por me deixar sentir, muitas vezes, como se estivesse em casa.

Aos meus queridos amigos, aqueles que ainda estão em Ribeirão Preto e aqueles que já retornaram a seus países: **Karen, Dania, Blanca, Luciana, Dalila, Gladis, Cecilia, Diana, Stephanie, Silvia, Guido, Diego e Milagros**. Pelos bons momentos compartilhados, risos, pelos conselhos e pelo seu carinho.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP)** da Universidade de São Paulo e a **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pela minha bolsa de doutorado.

À minhas **pacientes** participantes. Pela cooperação, esforço, pelo carinho, pela confiança e pela luta, sem os quais este trabalho não seria possível **MUITO OBRIGADO!!**

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas”

Steve Jobs

RESUMO

VARGAS-VILLAFUERTE, K. R. **Efeitos de raspagem e alisamento radicular sobre o perfil de citocinas no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontites crônica com câncer de mama submetidos à quimioterapia.** 2017. 157 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Pacientes com câncer de mama sob quimioterapia tem níveis aumentados de marcadores inflamatórios, que podem piorar condições periodontais pré-existentes. Este estudo avaliou o efeito do tratamento periodontal não cirúrgico (TPNC) e estabeleceu a correlação entre os parâmetros clínicos com os níveis de citocinas presentes no fluido crevicular gengival (FCG) antes e após TPNC. Quarenta indivíduos foram alocados em dois grupos; pacientes com periodontite crônica (PC) (n=20) e pacientes com câncer de mama com periodontite crônica (CAN/PC) (n=20). Os seguintes parâmetros clínicos e imunológicos foram analisados: i) profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI), índice gengival (IG), índice de placa (IP), ii) avaliação dos níveis de Interleucina (IL) - 4, IL-10, IL-17, IL-2, IL-6, IL-1 β , Interferon gama (INF- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Fator de Crescimento Tumoral-beta (TGF- β) no fluido crevicular gengival (Luminex), no baseline, 45 dias e 180 dias após TPNC. Os dados obtidos foram estatisticamente analisados. Nas comparações entre grupos: No baseline, o grupo PC apresentou níveis maiores de INF- γ e níveis menores de IL-10 e TGF- β quando comparados ao grupo CAN/PC. Aos 45 dias o grupo CAN/PC apresentou níveis mais reduzidos de TNF- α ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo PC. Em relação aos 180 dias, o grupo PC apresentou níveis mais reduzidos de INF- γ ($p < 0,001$), IL-2 ($p < 0,001$), TNF- α ($p < 0,0001$) e níveis elevados de IL-10 ($p < 0,01$) e TGF- β ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo CAN/PC. Nas comparações entre períodos de tempo: o grupo CAN/PC apresentou uma redução significativa de IL-2 aos 45 e 180 dias ($p < 0,05$) em comparação com baseline, TNF- α teve uma redução aos 45 dias, em comparação com baseline ($p < 0,0001$), além disso, houve uma redução significativa do TGF- β aos 180 dias em comparação com baseline ($p < 0,0001$). Enquanto IL-1 β , foi aumentado aos 45 dias em comparação com baseline ($p < 0,05$). No grupo PC, houve uma redução significativa dos níveis de INF- γ aos 180 dias, em comparação com baseline ($p < 0,0001$) e 45 dias ($p < 0,05$). Da mesma forma, IL-2 e TNF- α reduziram aos 180 dias, em comparação com baseline ($p < 0,0001$) e 45 dias ($p < 0,0001$), bem como um aumento de TGF- β aos 180 dias, em comparação com baseline ($p < 0,05$) e 45 dias ($p < 0,0001$). Na análise de correlação entre os parâmetros clínicos e os níveis de citocinas do FCG: No grupo CAN/PC, foi encontrado uma positiva correlação entre PS e os níveis de TNF- α ($r = 0.6489$, $p = 0.002$) no baseline. IL-17 foi positivamente correlacionado com redução de PS ($r = 0.4596$, $p = 0.04$) aos 180 dias; assim também IL-6 foi positivamente correlacionado com redução de PS e ganho de NCI ($r = 0.4513$, $p = 0.05$, $r = 0.5578$, $p = 0.01$, respectivamente) aos 180 dias. No grupo PC, IL-17 foi positivamente correlacionada com PS e NCI ($r = 0.4558$, $p = 0.04$, $r = 0.5447$, $p = 0.01$, respectivamente) no baseline. IL-1 β foi positivamente correlacionado com redução de PS e ganho de NCI ($r = 0.5538$, $p = 0.01$, $r = 0.5902$, $p = 0.006$, respectivamente), aos 45 dias. Uma negativa correlação foi encontrada entre IL-4 e ganho de NCI ($r = -0.4981$, $p = 0.03$) aos 180 dias. Pode-se concluir que a TPNC reduz os estímulos antigênicos e consequentemente ajuda a reduzir a carga inflamatória de pacientes com câncer de mama com periodontite crônica, melhorando assim as condições clínicas periodontais e sistêmicas.

Palavras-chave: Câncer de mama, fluido crevicular gengival, citocinas, periodontite crônica, quimioterapia, terapia periodontal não cirúrgica.

ABSTRACT

ABSTRACT

VARGAS-VILLAFUERTE K.R. **Effects of scaling and root planing on the cytokine profile in the gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis with breast cancer undergoing chemotherapy.** 2017. 157 p. tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Patients with breast cancer undergoing chemotherapy have increased levels of inflammatory markers, which may worsen pre-existing periodontal conditions. The aim of this study was to evaluate the effect of non-surgical periodontal treatment (NSPT) and to establish a correlation between clinical parameters and levels of cytokines present in the gingival crevicular fluid (GCF) before and after NSPT. Forty individuals were allocated in two groups; patients with chronic periodontitis (PC) (n = 20) and patients with breast cancer with chronic periodontitis (CAN/PC) (n = 20). The following clinical and immunological parameters were analyzed: i) probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), gingival index (GI), plaque index (PI), ii) levels of Interleukin (IL) - 4, IL-10, IL-17, IL-2, IL-6, IL-1 β , Interferon gamma (INF- γ), tumor necrosis factor (TNF- α), transforming growth factor beta (TGF- β) in gingival crevicular fluid (Luminex) in baseline, 45 days and 180 days after NSPT. The data were statistically analyzed. In the comparisons between groups: At the baseline, the PC group had higher levels of INF- γ and low levels of IL-10 and TGF- β when compared to the CAN/PC group. At 45 days, the CAN/PC group had lower levels of TNF- α ($p < 0.0001$) compared to the PC group. In 180 days, the PC group had lower levels of INF- γ ($p < 0.001$), IL-2 ($p < 0.001$), TNF- α ($p < 0.0001$), and higher levels of IL-10 ($p < 0.01$) and TGF- β ($p < 0.001$), compared to the CAN/PC group. In comparisons between periods: The CAN/PC group showed a significant reduction of IL-2 at 45 and 180 days ($p < 0.05$) compared to baseline, TNF- α had a reduction at 45 days, when compared to baseline ($p < 0.0001$). In addition, there was a significant reduction of TGF- β at 180 days when compared to the baseline ($p < 0.0001$), while IL-1 β increased at 45 days when compared to baseline ($p < 0.05$). The P group showed a significant reduction of INF- γ at 180 days when compared to baseline ($p < 0.0001$) and 45 days, ($p < 0.05$). In the same manner, IL-2 and TNF- α had a reduction at 180 days when compared to baseline ($p < 0.0001$) and 45 days ($p < 0.0001$). Likewise, there was an increase of TGF- β at 180 days when compared to the baseline ($p < 0.05$) and at 45 days ($p < 0.0001$). IL-17, IL-6 and IL-4 had no statistically significant differences between groups in all time points. In the analysis of correlation between the clinical parameters and the cytokine levels of the GCF: In the CAN/P group, a significant positive correlation was found between PD and TNF- α levels ($r = 0.6489$, $p = 0.002$) at baseline. IL-17 was positively correlated with PD reduction ($r = 0.4596$, $p = 0.04$) at 180 days; also IL-6 was significantly positively correlated with PD reduction and CAL gain ($r = 0.4513$, $p = 0.05$, $r = 0.5578$, $p = 0.01$, respectively) at 180 days. In the P group, IL-17 was also positively correlated with PD and CAL ($r = 0.4558$, $p = 0.04$, $r = 0.5447$, $p = 0.01$, respectively) at baseline. IL-1 β was positively correlated with PD reduction and CAL gain ($r = 0.5538$, $p = 0.01$, $r = 0.5902$, $p = 0.006$, respectively) at 45 days. A negative correlation was found between IL-4 and CAL gain ($r = -0.4981$, $p = 0.03$) at 180 days. In conclusion, these data suggest that NSPT reduces antigenic stimuli and consequently helps to reduce the inflammatory burden in breast cancer patients with chronic periodontitis

Keywords: Breast cancer, gingival crevicular fluid, cytokines, chronic periodontitis, chemotherapy, non - surgical periodontal therapy.

LISTAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Médias e desvios- padrão de PS, NCI, IG, IP para os grupos PC e CAN/PC nos diferentes períodos experimentais em bolsas periodontais – como os resultados das comparações intra e inter-grupos	64
Tabela 2- Relação entre parâmetros clínicos e níveis de citocinas	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Mediana e 95% de intervalo de confiança. A) INF- γ ; B) IL-10; C) IL-1 β ; D) IL-2; E) TNF- α ; F) TGF- β (pg/mL) para os grupos PC e CAN/PC nos diferentes períodos de tempo em bolsas periodontais (*) diferença significativa quando comparado ao baseline ($p < 0,05$), (†) diferença significativa 45 dias versus 180 dias ($p < 0,05$), (‡) diferença significativa entre grupos experimentais num mesmo tempo de análise ($p < 0,05$) 66
- Figura 2-** Mediana e 95% de intervalo de confiança. A) IL-17; B) IL-6; C) IL-4 (pg/mL) para os grupos PC e CAN/PC nos diferentes períodos de tempo em bolsas periodontais sem diferença entre períodos de tempo ($p > 0,05$); sem diferença entre grupos experimentais num mesmo período de análise ($p > 0,05$) 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP: Academia Americana de Periodontia

CAN/PC: Câncer de mama e Periodontite crônica

CD: células dendríticas

DP: Doença periodontal

FCG: Fluido crevicular gengival

FORP: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FN-k β : Factor nuclear Kappa-beta

HCRP: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

IG: Índice gengival

IP: Índice de placa

IL-2: Interleucina-2

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina-6

IL-10: Interleucina-10

IL-17: Interleucina-17

IL-1 α : Interleucina-1 alfa

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IHO: Instruções de higiene oral

mm: Milímetro

mg/mL: Miligrama por decilitro

NCI: Nível clínico de inserção

NK: Natural Killer

n. dentes: Número de dentes

OMS: Organização Mundial da Saúde

PC: Periodontite crônica

PS: Profundidade de sondagem

PHO: Programa de Higiene Oral

Pg/mL: Picograma por mililitro

SS: Sangramento à sondagem

QT: Quimioterapia

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β : Fator de crescimento tumoral-beta

Th1: Linfócitos T helper-1

Th17: Linfócitos T *helper*-17

Th2: Linfócitos T *helper*-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

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Por cento

$\leq$: Menor ou igual a (símbolo matemático)

$\geq$: Maior ou igual a (símbolo matemático)

$>$: Maior a (símbolo matemático)

$<$: Menor a (símbolo matemático)

$=$: Igual

n : Tamanho da amostra

p : Probabilidade de significância

r : Coeficiente de correlação

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	92
ANEXO B: PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA	94
ANEXO C: Artigo científico submetido para publicação no periódico <i>Journal clinical of periodontology</i>	96
ANEXO D: Artigo científico submetido para publicação no periódico <i>Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology</i>	127

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	30
2.1 Papel das citocinas na periodontite crônica.....	30
2.1.1 Resposta imune inata.....	31
2.1.2 Resposta imune adquirida.....	32
2.2 Papel das citocinas no câncer de mama.....	36
2.3 Quimioterapia e citocinas no câncer de mama	45
2.4 Efeito do tratamento periodontal na diminuição de marcadores inflamatórios e melhoria dos parâmetros clínicos	47
3 PROPOSIÇÃO	51
3.1 Objetivo Geral	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Consentimento para a pesquisa.....	53
4.2 Cálculo do tamanho da amostra.....	53
4.3 Seleção dos pacientes	54
4.4 Delineamento do estudo	55
4.5 Calibração do Examinador	55
4.6 Coleta dos parâmetros clínicos periodontais	56
4.7 Coleta das amostras	57
4.7.1 Coleta de fluido crevicular gengival (FCG).....	57
4.7.2 Terapia Periodontal Não Cirúrgica (TPNC).....	57
4.8 Processamento das amostras.....	58
4.8.1 Fluido Crevicular Gengival (FCG).....	58
4.9 Análise estatística	60
4.9.1 Parâmetros Clínicos Periodontais.....	60
4.9.2 Parâmetros Imunológicos	60
5 RESULTADOS	62
5.1 Monitoramento Clínico.....	62

5.2 Monitoramento imunológico	65
5.3 Análise de correlação entre parâmetros clínicos e níveis de citocinas no fluido crevicular gengival	68
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS	92

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, e em mulheres aparece como a neoplasia maligna mais comum. Esta neoplasia tem baixa incidência antes dos 35 anos de idade e após esta faixa etária, este índice cresce rápida e progressivamente (BRAZIL. Ministry of Health. National Program of Breast Cancer Control. National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva, July 2014). Em 2016, cerca de 57.960 mulheres foram diagnosticadas com novos casos de câncer de mama no Brasil e no mundo. Além disso, dados atuais têm mostrado que este câncer mata mais de 521 mil mulheres por ano (2016).

Existem várias possibilidades terapêuticas para combater a neoplasia maligna mamária, entre elas estão: cirurgia oncológica, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal (LOPEZ-GALINDO et al., 2006). Dentre essas modalidades de tratamento, quimioterapia a base de antraciclina caracteriza-se como um tratamento convencional (PETERSON; D'AMBROSIO, 1992; HESPANHOL et al., 2010). Estes fármacos são capazes de afetar às células cancerosas que se dividem rapidamente, evitando assim sua proliferação (LOPEZ-GALINDO et al., 2006; NAPENAS et al., 2007; NAPENAS et al., 2010; RAHNAMA et al., 2015). Como consequência, tecidos com alta taxa de atividade mitótica tais como a medula óssea, trato gastrointestinal, folículo piloso e mucosa oral são altamente afetados (TORRES et al., 2013).

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que afeta e destrói os tecidos de suporte dos dentes, considerada como uma das causas mais importantes da perda dentária. A forma mais comum dessa doença é a periodontite crônica, comumente observada em adultos acima de 35 anos de idade (OLIVER; BROWN; LOE, 1998), e que apresenta uma microbiota disbiótica complexa como agente etiológico primário (DENG; SZAFRANSKI, 2017). A

complexa microbiota oral é uma das comunidades microbianas mais dinâmicas do corpo humano, a qual pode influenciar o sistema imunológico do hospedeiro e causar desequilíbrio na comunidade simbiótica saudável, resultando em uma subsequente secreção de mediadores inflamatórios envolvidos na destruição tecidual (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1992; LAMONT; HAJISHENGALLIS, 2015; DENG; SZAFRANSKI, 2017).

Além disso, a periodontite crônica tem sido associada a outras doenças sistêmicas, incluindo câncer (FITZPATRICK; KATZ, 2010) e há evidências de que condições periodontais podem se exacerbar durante a terapia antineoplásica, o que pode resultar em dor e infecção local e sistêmica (TORRES et al., 2013). Vale ressaltar que a quimioterapia tem efeito tóxico sobre as células da camada basal do epitélio oral, a qual causa disfunção de células do epitélio e indução de apoptose, resultando em afinamento do epitélio e insuficiência de regeneração da mucosa (SUNG, 1995).

Tem sido demonstrado que pacientes com câncer de mama apresentam níveis aumentados de mediadores inflamatórios, como interleucina (IL)-6, IL-1 β , IL-17, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (IVANOVIC et al., 2003; RYAN et al., 2007; JAGER; SLEIJFER; VAN DER RIJT, 2008; CHEN et al., 2013). Adicionalmente, outros estudos apontam que o tratamento quimioterápico pode modificar os níveis desses marcadores (citocinas), e que a dosagem dos mesmos pode servir para estimar o prognóstico do tratamento antineoplásico (IVANOVIC et al., 2006; NICOLINI; CARPI; ROSSI, 2006; LUKASZEWICZ; MROCZKO; SZMITKOWSKI, 2007; TORRES et al., 2013; KONIG et al., 2016). A produção das citocinas pró-inflamatórias é controlada pelo fator nuclear FN-k β , um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes envolvidos na resposta imune inata e adaptativa (LORUSSO; RUEGG, 2008). A desregulação do FN-k β resulta na produção anormal de citocinas pró-inflamatórias, como

acontece em várias doenças inflamatórias crônicas, doenças autoimunes e câncer (FEGHALI; WRIGHT, 1997; ALLAVENA et al., 2008).

Vários estudos têm reportado níveis aumentados de citocinas, incluindo IL-2, IL-6, IL-1 β , IL-17, TNF- α , INF- γ , no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com doença periodontal (ENGEBRETSON et al., 2002; GOUTOUDI; DIZA; ARVANITIDOU, 2004; ZHAO et al., 2011). Estes marcadores inflamatórios podem ser reduzidos após o tratamento periodontal básico de raspagem e alisamento radicular em associação a um eficiente controle de placa supragengival (GOUTOUDI; DIZA; ARVANITIDOU, 2004; DEAS; MEALEY, 2010; LIU; LERNER; TENG, 2010; ZHAO et al., 2011). Dessa forma, tem-se observado um crescente interesse no potencial das citocinas como marcadores de diagnóstico ou prognóstico para atividade de doença periodontal e cicatrização de feridas (GENCO, 1992).

Até o presente momento, não existem evidências científicas sobre o perfil inflamatório de pacientes portadores de câncer de mama com periodontite crônica, sob tratamento quimioterápico, antes e após terapia periodontal. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da terapia periodontal não cirúrgica (TPNC) no perfil de citocinas do FCG e estabelecer uma correlação entre os parâmetros clínicos antes e após TPNC. A hipótese de nosso estudo é que pacientes com câncer, sob quimioterapia, apresentam níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias e que o tratamento periodontal pode ajudar a modular essas citocinas.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Papel das citocinas na periodontite crônica

A doença periodontal (DP) é uma doença crônica complexa, de natureza imunoinflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes, considerada como uma das causas mais importantes de perda dentária. A forma mais comum desta doença é a periodontite crônica comumente observada em adultos com mais de 35 anos de idade (OLIVER; BROWN; LOE, 1998; CHENG; HUGHES; TAAMS, 2014) e é induzida por uma microbiota disbiótica complexa (DENG & SZAFRANSKI, 2017), considerada como uma das comunidades microbianas mais dinâmicas do corpo humano. Essa complexa relação biofilme/inflamação pode influenciar o sistema imunológico do hospedeiro e causar desequilíbrio na comunidade simbiótica saudável (LAMONT & HAJISHENGALLIS, 2015). Isso modifica ou perpetua uma subsequente secreção de marcadores inflamatórios que contribuem para a destruição dos tecidos de suporte periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992; LAMONT & HAJISHENGALLIS, 2015).

Marcadores inflamatórios como as citocinas estão associados com a patogênese da doença periodontal (GOMES et al., 2016). As citocinas são proteínas ou peptídeos de baixo peso molecular que realizam múltiplas funções e tem a capacidade de agir na célula que a produziu iniciando a inflamação (CEKICI et al., 2014). As primeiras citocinas pró-inflamatórias secretadas após o reconhecimento microbiano, são as citocinas da resposta imune inata ou natural tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -1 β e IL-6 (VAN DYKE; VAN WINKELHOFF, 2013). Se a lesão periodontal aguda persistir sem resolução, os antígenos bacterianos são processados e apresentados para o sistema imune adaptativo por macrófagos e células dendríticas (Th1/Th2) (VAN DYKE; VAN WINKELHOFF, 2013; CHENG; HUGHES; TAAMS, 2014)

2.1.1 Resposta imune inata

O TNF- α , é uma citocina pleiotrópica secretada por fagócitos mononucleares ativados, células natural killer (NK) e mastócitos em resposta a lipopolissacarídeos (LPS) (KINDLE et al., 2006). A principal função fisiológica do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção, além disso esta citocina gera vários processos biológicos, como a indução de outros mediadores inflamatórios, como: citocinas, metaloproteases de matriz (MMP), quimiocinas e prostaglandinas, ativação de células endoteliais e interações de leucócitos endoteliais, adesão de monócitos, facilitando assim a amplificação da resposta inflamatória e progressão da DP (OKADA et al., 1997; GOMES et al., 2016).

Interleucina (IL) -1 β , é uma citocina pró-inflamatória produzida pelos neutrófilos e macrófagos, esta citocina encontra-se envolvida na proliferação, diferenciação e apoptose e na patofisiologia da periodontite (FAIZUDDIN; BHARATHI; ROHINI, 2003). A atividade da IL-1 β em conjunto com o TNF- α coincide com os eventos críticos que ocorrem durante a doença periodontal, ou seja, perda de inserção e reabsorção óssea (GRAVES; COCHRAN, 2003). Figueredo et al. (1999) e Engebretson et al. (2002) relataram que os níveis de IL-1 β dependem do grau de severidade da doença. Indivíduos com periodontite severa tem níveis duas vezes maiores em relação aos indivíduos com periodontite leve/moderada. Faizuddin et al. (2003) encontraram níveis de IL-1 β mais elevados em amostras de fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com periodontite, quando comparados a pacientes com gengivite e controle saudáveis. Outro estudo de Chaudhari et al. (2011) compararam os níveis de IL-1 β entre pacientes com periodontite crônica e indivíduos saudáveis. Observando que nos sítios com doença periodontal os níveis de IL-1 β foram duas vezes maiores, em comparação com os controles – saudáveis.

Interleucina (IL) – 6 é uma citocina multifuncional produzida por vários tipos de células, incluindo macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, células endoteliais, fibroblastos e

osteoblastos, desempenhando um papel importante na inflamação (HORII et al., 1988). A IL-6, em cooperação com IL-1 β e TNF- α , desempenham um papel importante na destruição óssea (MATSUKI; YAMAMOTO; HARA, 1992). Kamagata et al. (1989) avaliaram os níveis de IL-6 em tecidos gengivais de pacientes com periodontite, gengivite e pacientes saudáveis. Observou-se que tecido gengival de sítios periodontais doentes possuem níveis mais elevados de IL-6 quando comparado a sítios periodontais saudáveis.

2.1.2 Resposta imune adquirida

Células T CD4⁺ (células T- helper) foram inicialmente subdivididas em dois subconjuntos, denominados Th1 e Th2. O perfil linfocitário Th1 é regulada por uma resposta imune-celular e o Th2 é regulada por uma resposta imune-humoral. As citocinas IL-2, INF- γ promove a diferenciação da Th1 responsável da resposta pró inflamatória, enquanto IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 promove a diferenciação de Th2 responsável pela resposta anti-inflamatória (CHEN et al., 2013; CHENG; HUGHES; TAAMS, 2014). Neste contexto, a literatura periodontal tem relatado que o balanço do Th1/Th2 determina a progressão ou estabilidade da doença periodontal. No entanto populações das células T, como Th17 e Tregs, podem também desempenhar um papel importante na resposta periodontal do hospedeiro, como células efectoras e supressoras respectivamente (GAFFEN; HAJISHENGALLIS, 2008).

Interferon-gama (IFN- γ), é secretado por macrófagos, células NK, células do subgrupo Th1 e TCD8⁺ (MACCALLI, SCARAMUZZA, PARMIANI, 2009). Sua principal função é induzir a ativação 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 (DUTZAN et al., 2009; FU et al., 2013) e risco de progressão da doença periodontal (ALMAGHLOUTH et al., 2014). Em um estudo de

Papathanasiou et al. (2014) investigaram os níveis de IFN- γ em amostras de FCG de pacientes com periodontite crônica, gengivite e saudáveis, observando níveis significativamente maiores de IFN- γ em locais com periodontite em relação aos locais com gengivite e saudáveis. Outro estudo Dutzan et al. (2009) avaliaram os níveis de IFN- γ em amostras de FCG e tecido gengival de sítios ativos e inativos de pacientes com periodontite crônica. Observando concentrações maiores de IFN- γ em sítios ativos do que em sítios inativos (99,90 versus 68,90 pg; $p = 0,03$; 106,62 pg/mg versus 75,64 pg/mg, $p = 0,04$, respectivamente).

Interleucina (IL) - 2, é uma citocina imunorreguladora, com efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Produzida principalmente pelos linfócitos LTCD4+, sua função é aumentar a produção de citocinas efetoras como INF- γ , assim também estimular o crescimento de células NK (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996). Níveis mais elevados de IL-2 foram encontrados em sítios de periodontite refratária quando comparados a sítios estáveis sem progressão da doença (LEE et al., 1995), no entanto, não está correlacionada com o grau de perda óssea (MCFARLANE; MEIKLE, 1991).

Interleucina (IL) - 4, é uma citocina anti-inflamatória na patogênese da doença periodontal, produzida por linfócitos TCD4+ subpopulação Th2, e mastócitos ativados. Esta citocina suprime a resposta imune inflamatória das células Th1 (IFN- γ e IL-2), inibe a ativação de macrófagos ativados e ao contrário de outras citocinas, inibe a reabsorção óssea (RIANCHO et al., 1993). Isto pode ser explicado porque a IL-4 direciona a diferenciação dessas células em direção à linhagem de macrófagos, diminuindo assim a formação de osteoclastos.

Interleucina (IL) - 10, produzida por células T, células B, monócitos e queratinócitos, é uma citocina multifuncional considerada um mediador chave da resposta imune inflamatória frente à persistente agressão bacteriana, encarregadas de minimizar a extensão do tecido lesado durante a evolução da periodontite (BELARDELLI; FERRANTINI, 2002; CARDOSO et al., 2008; PASSOJA et al., 2010). Passoja et al. (2010) investigaram a extensão da

inflamação periodontal nos níveis séricos de IL-10 e TNF- α em pacientes com periodontite crônica comparados com saudáveis, e foi identificado que pacientes saudáveis apresentaram níveis mais elevados de IL-10 e níveis mais baixos de TNF- α , sugerindo que menores quantidades de IL-10 podem contribuir para o aumento da progressão da doença de um estado de gengivite para periodontite.

Interleucina (IL) -17, é uma citocina pró-inflamatória produzida por células T CD4⁺ e um distinto subconjunto de células T-helper (Th17) (SHAHARA et al., 2008). Este marcador ativa fibroblastos e células endoteliais ao incrementar a secreção de IL-6 em presença de TNF- α , que induz exacerbação da doença periodontal (KATZ; NADIV; BEER, 2001). Cardoso et al. (2009) investigaram a presença de células Th17 em amostras de gengiva de pacientes saudáveis e pacientes com periodontite crônica. A presença de células Th17 na gengiva inflamada foi confirmada por microscopia confocal de imunofluorescência, observando a presença de células Th17 na gengiva de pacientes com periodontite crônica. Em outro estudo Lester et al. (2007) avaliaram os níveis de interleucina IL-17, IL-23, IL-6, IL1 β e TNF- α em gengiva de sítios com doença periodontal leve, moderada e severa. As concentrações de IL-23, IL-1 β , IL-17 e IL-6 foram significativamente maiores nos sítios com periodontite severa, quando comparado a sítios com periodontite leve.

Tregs tem um papel protetor no dano tecidual periodontal. Tregs são expressos pelas células T CD4⁺ e CD25⁺ que especificamente regulam a ativação, proliferação e função efetora de células T convencionais (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2009). As citocinas produzidas por Tregs são associadas a fator de crescimento transformador beta TGF- β e linfócitos T – associado a molécula 4 (CTLA-4), que desregulam a inflamação. IL-10, TGF- β e CTLA-4 são reguladas para diminuição da progressão da doença periodontal (VAN DYKE; VAN WINKELHOFF, 2013).

Fator de crescimento e transformador beta (TGF- β), é uma citocina multifuncional pleiotrópica imunossupressoras e/ou anti-inflamatórias, produzida por células T estimuladas por

antígeno e fagócitos mononucleares ativados por LPS, a qual inibe a proliferação e a função efetora de células T e a ativação de macrófagos controlando respostas imunes exacerbadas (DUTZAN et al., 2009), sendo também importante no metabolismo do tecido conjuntivo durante a periodontite crônica (BABEL et al., 2006). Apresenta papel modulador, regula a reparação tecidual, acelerando 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 periodontite crônica 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).

Citocina – Imunidade inata	Secretada	Função
TNF- α	Fagócitos mononucleares ativados, células NK e mastócitos	Estimula formação de osteoclastos
IL-1 β	Neutrófilos e macrófagos	Regula reações imunes e inflamatórias Estimula formação de osteoclastos
IL-6	Células T, células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e osteoblastos.	Estimula formação de osteoclastos Regula crescimento de células T e B
Citocina –Imunidade adquirida	Secretada	Função
INF- γ	Linfócitos, macrófagos e células NK	Ativa macrófagos Suprime as células Th2
IL-2	Linfócitos, relacionada ao crescimento de células T e células NK	Atua na reabsorção óssea
IL-4	Linfócitos TCD4+ e mastócitos ativados	Anti-inflamatória Suprime as células Th1 Inibe macrófagos ativados
IL-10	Células T, células B, monócitos e queratinócitos	Anti-inflamatória Suprime as células Th1
IL-17	Células T CD4+ e um distinto subconjunto de células T-helper (Th17)	Destruição tecidual e osteoclastogênese
TGF- β	Células T estimuladas por antígeno e fagócitos mononucleares ativados	Papel modulador, aumenta o reparo cicatricial, Modula a produção de citocinas pró-inflamatórias

2.2 Papel das citocinas no câncer de mama

O câncer de mama é uma neoplasia maligna de etiologia multifatorial que representa o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres (RAO et al., 2006). Esta neoplasia tem baixa incidência antes dos 35 anos de idade e é considerada a causa mais importante de morte em casos de metástase (ALINEJAD et al., 2017). A sua etiologia ainda não é completamente entendida e a comunidade médica costuma classificá-la pelo tamanho do tumor (T), comprometimento linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M) (GRADISHAR et al., 2016).

Estudos recentes têm focado sobre a importância do papel que os sistemas imune e inflamatório desempenham na resposta antitumoral (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Nesse contexto, as citocinas são moléculas de sinalização que participam dos processos inflamatórios e imunológicos, segregadas pelos monócitos, macrófagos, linfócitos, as quais possuem características funcionais e efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (RAO et al., 2006). A produção desses mediadores é controlada pelo fator nuclear FN-kB, um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes envolvendo o sistema imune inato e adaptativo (LORUSSO; RUEGG, 2008). A desregulação do FN-k β resulta em alterações nos níveis locais e sistêmicos desses marcadores (FEGHALI; WRIGHT, 1997; ALLAVENA et al., 2008) e dependendo do equilíbrio das citocinas o seu efeito coletivo pode ser pró ou anti-tumorigênico (SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010).

A exposição prolongada a níveis elevados de citocinas, tais como interleucina (IL) IL-6, IL-17, factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , interferon-gama (INF- γ) estimulam o desenvolvimento tumoral e por isso são consideradas pró-tumorigênicas (GOLDBERG; SCHWERTFEGER, 2010; CHEN et al., 2013; ALINEJAD et al., 2017). Por outro lado, a IL-10 e o factor de crescimento transformador beta (TGF- β), as quais desempenham um papel

chave na resposta imune, podem ter múltiplas ações e efeitos tanto positivos como negativos no ambiente tumoral (LIN; KARIN, 2007).

Estudos que investigaram o microambiente tumoral da mama reforçam que certas citocinas parecem impedir uma resposta imunológica eficaz ao inibir a resposta antitumoral e acelerar o crescimento do tumor (RUDDY et al., 2004; GOLDBERG; SCHWERTFEGER, 2010; CHEN et al., 2013). Recentemente, os níveis de citocinas no ambiente tumoral e na detecção de células tumorais circulantes na circulação sanguínea têm sido utilizados como indicadores de prognóstico para avaliação do estágio da doença, agressividade e progressão (GOLDBERG; SCHWERTFEGER, 2010).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina anti-apoptótica, secretado principalmente por macrófagos, que estimula a resposta imune. A IL-6 tem um papel na resposta inflamatória aguda e é um fator estimulador de hepatócitos derivados de monócitos, regulando as proteínas inflamatórias de fase aguda, como, por exemplo, a proteína C-reativa, produzida pelo fígado (HEINRICH et al., 2003). A produção desta interleucina é estimulada pela IL-1, INF- γ , TNF- α e lipolisacarídeos (GOLDBERG; SCHWERTFEGER, 2010). Níveis altos de IL-6 tem sido associada com condições inflamatórias, autoimunes, como por exemplo: artrite, diabetes, lupus eritematoso e câncer (HEINRICH et al., 2003; GOLDBERG; SCHWERTFEGER, 2010). Um estudo sugere que o polimorfismo do gene da IL-6 (G / C no nucleótido-174) pode predispor o câncer de mama. Além disso, níveis elevados desta citocinas são correlacionados com estágio avançado do câncer, pior prognóstico e metástase (BERGER, 2004).

Benoy et al. (2002) encontraram concentrações séricas de IL-6 significativamente aumentadas nos pacientes com câncer de mama quando comparados aos controles saudáveis. Estas concentrações foram quase 10 vezes maiores em pacientes com câncer de mama (n = 73) quando comparados com os controles (N = 31), 6,0 pg / ml *versus* 0,7 pg / ml, respectivamente. Em outro estudo, Husssein et al (2004) examinaram os níveis séricos de

algumas citocinas em 40 mulheres com câncer de mama e correlacionaram os achados com características clinicopatológicas, incluindo a expressão do receptor de estrogênio e progesterona em células tumorais. Níveis de IL-6 (111,38 pg / ml) e IL-12 (1142,75 pg / ml) estavam significativamente aumentados em pacientes com câncer de mama em comparação com os controles (1,75 pg / ml e 19,90 pg / ml, respectivamente). Além disso, foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de IL-6 e IL-12 e a progressão do tumor ($P < 0,05$). Por outro lado, ambas as citocinas se correlacionaram negativamente com a expressão do receptor de estrogênio e progesterona.

Em relação ao prognóstico de tratamento da neoplasia mamária, Zhang e Adachi (1999) reportaram níveis elevados de IL-6 em pacientes com metástase quando comparados com pacientes doentes e com menores níveis desta interleucina. Os autores também destacaram que os pacientes com altos níveis de IL-6 respondem pobremente à quimioterapia e hormonioterapia, sugerindo que esta citocina pode representar um preditor de pior prognóstico no câncer de mama. Salgado et al. (2003) corroboraram com estes achados ao relacionarem níveis de IL-6 com extensão da doença, pior prognóstico e sobrevida dos pacientes com metástase.

A interleucina-17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória produzida por células dendríticas CD4⁺ e um distinto subconjunto de células T-helper (Th17) (MANGAN et al., 2006; CHEN et al., 2013). A família IL-17 consiste em 6 membros, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Vários estudos têm encontrado uma sobreexpressão de IL-17A e IL-17F em vários tumores malignos, incluindo gástrico, ovário, mama e no melanoma (ZHU et al., 2008; CHEN et al., 2013). Além disso, a literatura científica destaca a importância da IL-17 na resposta inflamatória (MANGAN et al., 2006), uma vez que esta envolvida na localização e amplificação de respostas inflamatórias e imunológicas (RUDDY et al., 2004), sendo uma característica distintiva da IL-17. Além disso, esta interleucina tem a capacidade

para induzir a expressão e sinergizar outras citocinas, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, aumentar a expressão de muitos genes alvos e promover assim o desenvolvimento de tumores (LIN; KARIN, 2007; YANG, L. et al., 2012; ALINEJAD et al., 2017) .

A interleucina-17 também é correlacionada positivamente com o grau histológico do câncer de mama e também representa um importante marcador de prognóstico (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2016). Yang et al. (2012) examinaram a expressão de células Th17 e células T reguladoras (Treg) em tecidos de pacientes com câncer de mama comparados a tecidos de pacientes sem câncer. Foi observado elevadas concentrações de células Th17 em tecidos com malignidade, embora essas células não tenham sido associadas à Treg. Para os autores, as células Th17 (IL-17) estão envolvidas na resposta antitumoral e promovem um melhor prognóstico do câncer. Entretanto, para Benavides et al. (2013) a Th17 (IL-17) e Treg (TGF- β e IL-10) estão aumentadas de forma sincronizada no microambiente tumoral do carcinoma ductal invasivo e são associadas a agressividade do tumor e pior prognóstico de sobrevida. Os autores defendem que a IL-17 é capaz de induzir fatores angiogênicos e fatores de crescimento endotelial vascular que favorecem o crescimento tumoral. Além disso, as células Treg através de suas citocinas TGF- β e IL-10 podem mediar a imunossupressão efetora e inibir as respostas imunes, estimulando proliferação e invasão do câncer.

Chen et al. (2013) investigaram os níveis de IL-17 no microambiente do tumor de pacientes com câncer de mama e seu papel prognóstico. Um total de 207 espécimes de carcinomas de mama foi avaliado mediante imuno-histoquímica e os achados correlacionados com os parâmetros clinicopatológicos. Os autores observaram que altos níveis de IL-17 estão correlacionados com alto grau histológico, status negativo de ER/PR e os subtipos moleculares triple-negativos. Por outro lado, não estão correlacionados com tamanho do tumor, estado linfonodal, estado de HER2 positivo. Também foi observado que pacientes com

tumores e números elevados de células produtoras de IL-17 apresentaram menor tempo de sobrevida quando comparado a pacientes com números menores destas células ($P < 0,01$), indicando que um alto nível de células produtoras de IL-17 no ambiente tumoral da mama é um indicador de pior prognóstico.

Em relação à metástase, Roato et al. (2006) avaliaram 50 pacientes afetados por tumores sólidos, incluindo câncer de mama. Amostras de sangue foram coletadas e células mononucleares do sangue (CMSP) foram isoladas e cultivadas com e sem a IL-17 para estudar sua influência na osteoclastogênese. Os níveis de IL-17 do sobrenadante da cultura foram identificados por ELISA e quantificados por PCR em tempo real. Foi observado que a IL-17 aumenta significativamente a osteoclastogênese e um anticorpo anti-IL-17 o inibe, demonstrando assim que esta interleucina pode favorecer metástase óssea mediante a produção de TNF-alfa e RANKL, os quais sinergizam a promoção da osteoclastogênese.

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) é produzido por monócitos mononucleares ativados e pode ativar neutrófilos, alterando as propriedades das células endoteliais e regulando as atividades metabólicas (LIN; KARIN, 2007). O TNF- α tem sido proposto como iniciador (gatilho?) do tumor mamário e níveis altos estão associados ao pior prognóstico e metástase do câncer de mama (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005). Além de contribuir nas fases iniciais da tumorigênese, o TNF- α pode aumentar a progressão do tumor por meio da angiogênese, a qual favorece a proliferação e metástase, e pela supressão da vigilância imunológica, inibindo fortemente a atividade citotóxica dos macrófagos (LIN; KARIN, 2007).

Ardizzoia et al. (1992) avaliaram a expressão de TNF- α em 48 pacientes com tumores sólidos (câncer de pulmão: 22, câncer de cólon: 11, câncer de mama: 10, câncer renal: 5) e 40 indivíduos saudáveis. Foram observados níveis elevados de TNF- α em 27 dos 48 pacientes com câncer. Além disso, dentro do grupo câncer os níveis de TNF- α foram

significativamente mais elevados em pacientes com metástase do que naqueles sem metástase. Em um estudo de caso controle, Sheen cheen et al. (1997) verificaram concentrações séricas de TNF- α em pacientes com câncer de mama e sua correlação com as características clinicopatológicas e o prognóstico. Foram incluídas 40 pacientes com câncer de mama e 30 controles saudáveis. Os autores observaram que o grupo com câncer apresentou maiores concentrações de TNF- α quando comparados aos controles ($p < 0.05$), bem como maiores níveis em pacientes com estádios mais avançados da doença. Foi sugerido que concentrações séricas de TNF- α podem ser um parâmetro valioso que reflete a gravidade do estadiamento no câncer de mama.

A IL-1 β é uma citocina multifuncional, da família da IL-1, produzida pelos macrófagos, a qual regula a resposta imunoinflamatória e cumpre um papel importante no desenvolvimento do câncer de mama (EIRO et al., 2012). Pesquisas indicam que polimorfismos da família da IL-1 encontram-se associados com várias doenças inflamatórias e cada vez mais evidências mostram sua relação com câncer (LEE et al., 2006). Jin et al. (1997) afirmam que a IL-1 β encontra-se correlacionada com outras variáveis imunopatológicas utilizadas como prognóstico de câncer de mama e que esta citocina contendo CD68 está presente em tecido maligno. Em outro estudo, Kurtzman et al. (1999) avaliaram a hipótese de associação entre IL-1 α e IL-1 β com câncer de mama por meio de análise imunohistoquímica em células tumorais. Foi demonstrado que essas citocinas estão presentes no microambiente tumoral e são reguladoras do crescimento, assim como do desenvolvimento de metástase.

Pantschenko et al. (2003) observaram que não só a IL-1 α e a IL-1 β são pró-tumorigênicos, uma vez que demonstraram mediante mecanismos autócrinos e parácrinos que a IL-1 e seus receptores levam a uma cascata de outras citocinas que atuam como pró-tumorigênicas como, por exemplo, a produção de IL-8, a qual contribui na proliferação,

angiogênese e invasão do tumor. Outros estudos corroboram com esses achados ao indicar atividade pró-tumorigênica regulada pela família da IL-1 (MILLER et al., 2000; VILSMAIER et al., 2016).

Outra citocina importante no câncer de mama é o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), considerada multifuncional e pleiotrópica (TAYLOR; LEE; SCHIEMANN, 2011). Este fator apresenta um papel bifásico na tumorigênese da mama, atuando como supressores tumorais ao inibirem a proliferação, migração, diferenciação e apoptose celular nos estádios iniciais, bem como estimulam a progressão tumoral em estágios avançados (LIN; KARIN, 2007; TAYLOR; LEE; SCHIEMANN, 2011; CANDIA et al., 2016). Eventos genéticos e epigenéticos que ocorrem durante a tumorigênese mamária tipicamente inativam as atividades de supressão tumoral do TGF- β e conferem finalmente a esta citocina atividades de promoção tumoral, incluindo a capacidade de estimular a invasão do câncer, metástase, angiogênese e a evasão do sistema imunitário (TAYLOR; LEE; SCHIEMANN, 2011; CANDIA et al., 2016). Esta conversão dramática na função TGF-beta é conhecida como “paradoxo TGF-beta” e reflete uma variedade de alterações dinâmicas que ocorrem não apenas dentro do carcinoma mamário em desenvolvimento, mas também dentro da composição celular e estrutural do seu microambiente de tumor (TAYLOR; LEE; SCHIEMANN, 2011).

Sheen-Chen et al. (2001) avaliaram concentrações séricas de TGF- β 1 em 60 pacientes com câncer de mama submetidos à mastectomia e 14 pacientes com tumores benignos de mama (7 com doença fibrocística e 7 com fibroadenoma). Foram também avaliadas as características clínico patológicas, estado linfonodal e metástases à distância (TNM). Os níveis de TGF- β 1 no plasma dos pacientes com câncer foi de 498,7 $\pm$ 249,7 pg/mL e no grupo de controle foi de 495,2 $\pm$ 225,5 pg/mL. Os autores relataram que nos estádios de TNM mais avançados os níveis TGF-beta1 foram mais elevados, sugerindo que estes níveis podem refletir a gravidade do câncer de mama.

Em outra investigação, Ivanovic et al. (2003) também examinaram a associação entre o nível de TGF- β 1 no plasma e a progressão do câncer de mama em 44 mulheres. O TGF- β 1 plasmático foram significativamente maior nos pacientes com estadio IIIB/IV quando comparados com os saudáveis. Foi sugerido que o TGF- β pode ser um marcador de prognóstico promissor para pacientes com câncer da mama em estadio avançado. Posteriormente, em um estudo piloto Ivanovic et al. (2006) avaliaram o papel do TGF- β 1 em relação à sobrevida global de 53 pacientes com câncer de mama e 37 doadores saudáveis. A sobrevivência foi significativamente reduzida nos pacientes com níveis de TGF- β 1 mais elevados quando comparados aos pacientes com níveis plasmáticos próximos ao normal.

Corroborando com os resultados anteriores, Dave et al. (2012) também demonstraram que níveis elevados de TGF- β 1 estão relacionados com maior probabilidade de recidiva do câncer, marcando o seu papel como promotor tumoral e evidenciando a existência de um TGF- β paradoxo. Diante disso, o TGF- β 1 circulante pode ser utilizado como marcador preditivo e de prognóstico no carcinoma da mama (KAEWKANGSADAN et al., 2016).

A interleucina-10 (IL-10) também é considerada como multifuncional e pleiotrópica, uma vez que se comporta como imunosupresor e/ou imunoestimulador tumoral. A IL-10 é produzida por linfócitos T ativados e células apresentadoras de antígenos, sendo capaz de promover o desenvolvimento da tolerância imunológica e suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (LLANES-FERNANDEZ et al., 2006). Esta interleucina, tem um papel complexo no câncer de mama, podendo agir de duas maneiras: facilitando o desenvolvimento do câncer e evitando o crescimento do tumor, por meio de efeitos antiangiogênicos (GERGER et al., 2010; HAMIDULLAH; CHANGKIJA; KONWAR, 2012).

Llanes - Fernandez et al. (2000) avaliaram a expressão de IL-10 e a associação com outros marcadores tumorais no microambiente tumoral. Vinte e sete pacientes com câncer de mama foram biopsiados e avaliados mediante imunohistoquímica. Os resultados mostraram

que 23 amostras exibiram uma maior expressão de IL-10 e foi observada uma associação direta entre IL-10, Bcl-2 e Bax. A relação entre IL-10 e Bax foi estatisticamente significativa, no entanto uma inversa associação de IL-10 com p53 foi observada. Conclui-se que na presença de IL-10 e sua relação com marcadores de apoptose (Bcl-2) pode sugerir um aumento da agressividade do tumor mesmo se ainda estiver numa fase precoce. Em um estudo de Yang et al. (2015) evidenciou-se que macrófagos associados a tumor (MATs) podem induzir resistência aos medicamentos através da via de sinalização IL-10/STAT3/Bcl-2 e o bloqueio do MATs pode resultar em atenuação da ativação de STAT3 e diminuição da expressão de Bcl2.

Mais recentemente, Bhattacharjee et al (2016) avaliaram a expressão de IL-10 em amostras de câncer de mama e sua correlação com os marcadores estabelecidos de prognóstico. Os tecidos foram coletados de 60 mulheres que foram submetidos à cirurgia para remoção do câncer. O estudo observou que 36 pacientes (60%) expressaram IL- 10 no tecido tumoral em comparação a 0% de pacientes sem expressão ($P < 0,01$). A expressão foi significativamente associada aos sítios com doença localmente avançada e grau de tumor.

Entretanto, a IL-10 também tem demonstrado ser antitumoral. Dorsey et al. (2002) (DORSEY et al., 2002) demonstraram que administração sistêmica de IL-10 humana recombinante em ratos com tumores mamários altamente malignos leva a inibição significativa do crescimento. Esta inibição do crescimento tumoral está associada a um aumento do número de células CD4 +, consistente com uma atividade de quimioatratores de células T para Mig. Nenhuma alteração na vascularização, conforme indicado pelas células CD31 +, foi observada em tumores transfectados com Mig ou IL-10. Assim, uma atividade antiangiogênica para qualquer citocina não pode ser confirmada. Mig e IP-10 são críticos para a resposta terapêutica resultante de altos níveis de IL-10 e, além disso, Mig como agente único também possui atividade inibidora de tumores em um modelo de câncer de mama.

Citocina	Papel das citocinas
IL-6	- Níveis elevados correlacionados a estágios mais avançados, progressão do tumor. - Níveis elevados de IL-6 respondem pobremente ao tratamento quimioterápico e hormonioterapia.
IL-17	- Níveis elevados podem levar a metástases ósseas.
TNF- α	- Níveis elevados podem iniciar o crescimento e progressão do tumor e podem levar a metástases ósseas. - Tumor associado a TNF- α circulante serve de marcador de prognóstico.
IL-1 β	- Papel importante na ativação de células dendríticas.
TGF- β	- Níveis altos em pacientes com estágios avançados do tumor (III/IV).
IL-10	- Níveis altos em pacientes com estágios avançados do tumor. - Pode inibir o crescimento tumoral em modelos animais e possui atividade antimetástase.

2.3 Quimioterapia e citocinas no câncer de mama

O tratamento quimioterápico compreende o uso de drogas que atuam como um processo citotóxico para as células normais e tumorais, no qual 70 % dos pacientes faz uso destas drogas no decorrer do tratamento (HESPANHOL et al., 2010). Estas drogas são utilizadas dependendo da idade, estágio do câncer, como tolerância para medicamentos específicos (SHARMA et al., 2010). A efetividade das drogas quimioterápicas depende da intensidade de dose aplicada e sensibilidade das células. Os fatores associados a recidivas na maioria dos casos é o tamanho do tumor, consequentemente o estado de linfonodos.

Tong et al. (2000) pesquisaram a resposta imune e sua função após o tratamento com docetaxel e paclitaxel. Eles coletaram sangue antes de iniciar quimioterapia e após quimioterapia (uma vez por semana). Células natural killer (CD16 e CD56), células T (CD3/CD4, CD8), células B (CD19) e níveis de citocinas TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-10, IL-12 foram analisadas. Houve uma diminuição nos níveis de IL-10 nos pacientes tratados com paclitaxel e os níveis de IL-2, IL-12 e INF- γ não foram detectáveis. A atividade citotóxica das células natural killer (CD16 e CD56) reduziu nos pacientes que fizeram uso de docetaxel.

Os autores sugerem que a função imune foi afetada significativamente após o tratamento com docetaxel. Posteriormente, Tsavaris et al. (2002) avaliaram o efeito da quimioterapia com taxanos (paclitaxel e docetaxel) e sua capacidade na alteração dos parâmetros imunológicos (IL-2, IL-1 β , IFN- γ , GM-CSF, IL-6, TNF- α , e PGE2) em pacientes com câncer de mama. Observou-se que os níveis de TNF- α e IL-6 estavam aumentados nos pacientes com câncer de mama, antes do tratamento quimioterápico. Ambos dos medicamentos levaram a um aumento de citotoxicidade de IL-6, GM-CSF, IFN- γ e uma diminuição dos níveis de IL-1, TNF- α e PGE2 foi maior para o grupo que uso docetaxel, comparado ao grupo que uso paclitaxel.

Verma et al. (2013) avaliaram os níveis de células T reguladoras (Tregs) e as citocinas Th1, Th2 e Th17 no sangue de mulheres com câncer de mama localmente avançado submetidas à quimioterapia neoadjuvante e cirurgia. Os autores descobriram que as mulheres com câncer avançado têm níveis anormais de Tregs (FOXP3+, CTLA-4+) e das citocinas Th1 (IL-1 β , IL-2, INF- γ , TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5) e Th17 (IL-17). A quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia não consegue regular os níveis anormais de Tregs e das citocinas Th1, Th2 e Th17. Foi notado também que uma redução de Treg (FOXP3+, CTLA-4+) é um bom prognóstico de tratamento, indicando uma boa resposta clinicopatológica ao tratamento em relação ao tamanho do tumor. Em um estudo subsequente, Yu et al. (2014) analisaram, por imunohistoquímica, os marcadores TGF- β e CD8+ em tecidos de mulheres com câncer de mama para avaliar a expressão desses marcadores e analisar sobrevida após tratamento quimioterápico adjuvante. Os autores observaram que uma ausência de CD8 no microambiente tumoral e um aumento de TGF- β estavam associadas a um pior prognóstico, no entanto o tratamento quimioterápico adjuvante melhora a sobrevida dessas pacientes.

Kaewkangsadan et al. (2016) avaliaram as células T (CD4, CD8, CTLA-4), T reg (FOXP3) e citocinas (Th1, Th2, Th17) em mulheres com câncer de mama localmente avançado. Níveis altos de células Treg FOXP3+, IL-10 e IL-17 foram associados a uma

resposta clinicopatológica ruim. Níveis de linfócitos T e subconjuntos de células T CD4 + e CD8 + em mulheres com câncer avançado podem ser marcadores úteis para analisar o benefício do tratamento quimioterápico. Estes marcadores biológicos podem ser complementados com parâmetros clinicopatológicos e com o prognóstico de sobrevida.

2.4 Efeito do tratamento periodontal na diminuição de marcadores inflamatórios e melhoria dos parâmetros clínicos

Muitos estudos na literatura indicam que a doença periodontal (DP) pode causar disseminação de bactérias, suas toxinas ou produtos bacterianos, ocasionando assim a disseminação dos mediadores inflamatórios da fase aguda como a proteína C-reativa (PCR), interleucina (IL)-6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (KORNMAN et al., 1997; RADAFSHAR et al., 2010). Indivíduos com doença periodontal particularmente colonizados por bactérias gram-negativas como *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythensis* (Tf), *Porphyromonas gingivallis* (Pg), *Campylobacter rectus* (Cr), apresentam níveis elevados de PCR, IL-6 e fibrinogênio, quando comparados com indivíduos controles sem doença periodontal (NOACK et al., 2001).

Desta forma, surgiu o interesse de verificar se o tratamento periodontal não cirúrgico (TPNC) poderia alterar os níveis de citocinas inflamatórias da resposta imune inata (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e citocinas da resposta imune adaptativa produzidas por linfócitos T helper (Th1/Th2/Th17) no fluido crevicular gengival (FCG) e no sangue de pacientes com periodontite.

Tsai et al. (2007) avaliou as alterações do FCG nos níveis de IL-4 e IFN- γ em pacientes com periodontite crônica antes e após TPNC, e identificaram uma diminuição da

quantidade total de IFN- γ , e um aumento nos níveis de IL-4 após TPNC, sugerindo que níveis aumentados de IL-4 poderia estar relacionado com a melhoria da saúde clínica periodontal.

Marcaccini et al. (2009) investigaram os níveis dos marcadores de inflamação crônica (IL-6 e PCR), no sangue de indivíduos controle e pacientes com doença periodontal (DP) antes e após a TPNC. Observaram que pacientes com DP tinham maiores níveis de marcadores de inflamação crônica quando comparados com indivíduos controle, e após 3 meses da TPNC houve uma diminuição nos níveis de IL-6 e PCR ($p = 0,001$ e $p = 0,006$, respectivamente), demonstrando que a DP está associada ao aumento das concentrações circulantes de IL-6 e PCR.

Thunell et al. (2010) avaliaram quantitativamente o efeito da terapia periodontal nos níveis de FCG de um painel abrangente de citocinas e quimiocinas e demonstraram uma diminuição de 13 citocinas incluindo INF- γ IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 nos diferentes intervalos de tempo (6 e 8 semanas) da terapia periodontal, em pacientes com periodontite crônica generalizada.

Duarte et al. (2010) avaliaram os níveis séricos de TNF- α , INF- γ , IL-4, IL-17 e IL-23 antes e após 6 meses da TPNC, em indivíduos com periodontite crônica generalizada (PCg) (N=14), periodontite agressiva generalizada (PAg) (N=14) e pacientes periodontalmente saudáveis (S) (N=14). Foi identificada uma diminuição dos parâmetros clínicos em ambos grupos com periodontite e uma significativa diminuição das concentrações séricas de TNF- α e IL-17 aos 6 meses de após pós-terapia. Embora os níveis séricos dessas citocinas tenham melhorado significativamente como resultado da TPNC, os níveis de TNF- α permaneceram mais elevados em indivíduos com PAg, quando comparados com os indivíduos com PCg e S.

Zhao et al. (2011) investigaram o efeito da TPNC na expressão de citocinas Th17 / Th1 / Th2 (IL-17, IL-21 / IFN- γ /IL-4) no FCG de 30 pacientes chineses com periodontite

crônica. Neste estudo, houve uma diminuição nos níveis de Th17 (IL-17, IL-21) e um aumento nos níveis de Th2 (IL-4) após TPNC.

Konopla et al. (2012) avaliaram o efeito da TPNC sobre os níveis de IL-1 β , IL-8 e MMP-8 no FCG de pacientes com periodontite crônica em relação aos parâmetros clínicos (baseline, 1 semana e 4 semanas). A TPNC levou a uma melhora em todos os parâmetros clínicos periodontais e também resultou em uma diminuição significativa nas quantidades de IL-1 β , IL-8 e MMP-8 quando comparados ao baseline, especialmente na quarta semana após TPNC.

Fu et al. (2013) avaliaram a eficácia da TPNC em pacientes com periodontite crônica, mensurando os níveis de citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-17 no baseline, +8, +16 e +24 semanas após TPNC, e observaram que níveis de IL-17 diminuíram após TPNC.

George AK e Janam P. (2013) determinaram se a presença de periodontite crônica e subsequente TPNC poderiam influenciar os níveis séricos de IL-6 e proteína C-reativa (PCR) em pacientes com periodontite generalizada crônica severa. Os níveis de IL-6 e PCR reduziram após TPNC, indicando melhoria da condição periodontal após a intervenção.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica (TPNC) sobre o perfil de citocinas inflamatórias, em pacientes com periodontite crônica e em pacientes com câncer de mama e periodontite crônica submetidos a quimioterapia.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar parâmetros clínicos periodontais (índice de placa – IP, índice gengival – IG, profundidade de sondagem – PS, nível clínico de inserção – NCI), antes e após terapia periodontal não-cirúrgica.
- ✓ Avaliar os níveis das citocinas interleucina (IL) - 4, IL-10, IL-17, IL-2, IL-6, IL-1 β , interferon gama (INF- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento tumoral-beta (TGF- β) presentes no fluido crevicular gengival (FCG), antes e após terapia periodontal não-cirúrgica.
- ✓ Avaliar a magnitude de correlação entre parâmetros clínicos periodontais e níveis de citocinas presentes no FCG, em diferentes intervalos de tempo (*baseline*, +45 dias e +180 dias).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Consentimento para a pesquisa

Todas as pacientes participantes foram informadas detalhadamente a respeito do estudo do qual participaram (objetivos, benefícios, riscos e desconfortos), e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), confirmando por escrito sua participação (Anexo A). Os procedimentos realizados nesta pesquisa foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (Protocolo nº 37030514.7.0000.5419) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) – Universidade de São Paulo (USP) (Anexo B).

O estudo foi registrado no *ClinicalTrials.gov* (NCT03244943).

4.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo de tamanho amostral foi realizado pelo programa Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), considerando como parâmetro de referência os valores de PS. 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 câncer e sem câncer de mama, sendo o valor de α ajustado em 5% e um erro tipo beta em 20% para detectar diferenças pós operatórias de 1 mm entre os grupos com desvio- padrão intragrupo de 2 mm. O tamanho amostral requerido foi de 16 pacientes por grupo. No entanto, considerando que alguns pacientes poderiam desistir durante o acompanhamento, o número de pacientes incluídos por grupo neste estudo foi igual a 20.

4.3 Seleção dos pacientes

Os indivíduos foram submetidos à anamnese, exame clínico e radiográfico. As pacientes com câncer de mama foram diagnosticadas pelo setor ambulatorial de mastologia – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP- USP) e as pacientes sem câncer, foram selecionadas na clínica de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da FORP-USP. De acordo com a condição periodontal e saúde geral, as pacientes foram incluídas no estudo.

Todos os pacientes foram diagnosticados com periodontite crônica (P) (ARMITAGE, 1999). Os critérios de inclusão foram: 1) idade ≥ 35 anos; 2) um mínimo de 20 dentes; excluindo terceiros molares 3) presença de seis dentes com locais proximais com profundidade de sondagem (PD) ≥ 5 mm e CAL ≥ 5 mm.

Os critérios de exclusão neste estudo foram: 1) Tratamento periodontal de raspagem e alisamento radicular ou tratamento antibiótico nos últimos 6 meses; 2) doenças sistêmicas que podem afetar a progressão da periodontite (por exemplo, diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares); 3) envolvimento protéticos extensos; 4) uso de anti-inflamatórios por longo período de tempo, ou qualquer medicamento que possa interferir nos aspectos periodontais; 6) fumantes e ex-fumantes; 7) gravidez ou aleitamento; 8) terapia ortodôntica; 9) uso de enxaguatórios bucais contendo antimicrobianos nos últimos 2 meses; 10) pacientes que tenham recebido quimioterapia ou radioterapia anteriormente; 11) pacientes com metástase e / ou pacientes com quimioterapia neoadjuvante.

Neste estudo, apenas as pacientes diagnosticadas pela primeira vez com câncer de mama e que realizaram quimioterapia adjuvante pela primeira vez foram incluídas.

4.4 Delineamento do estudo

Após a assinatura do TCLE, todas as pacientes selecionadas (do sexo feminino, com idade entre 35 e 70 anos) foram alocadas em dois grupos experimentais: pacientes com periodontite crônica (PC) (n = 20) e pacientes com câncer de mama e periodontite crônica (CAN/PC) (n = 20).

Todas as pacientes selecionadas receberam informações detalhadas sobre a etiologia da doença periodontal e instruções de higiene oral (IHO) específicas sobre técnicas de escovação adequadas para um efetivo controle de biofilme, incluindo a realizar limpeza interdentária com fio dental e escovas interproximais. Nas sessões iniciais, os pacientes que apresentavam fatores retentivos de placa como: cáries, excesso de restaurações e cálculo supragengival foram removidos.

A avaliação dos parâmetros clínicos periodontais e coleta de fluido crevicular gengival (FCG) foram realizadas no *baseline* (*pré – intervenção*), *+45 dias* e *+180 dias* após a realização da terapia periodontal (*Pós-intervenção*). Os exames clínicos periodontais (*pré* e *pós-intervenção*) foram realizados por um único examinador devidamente treinado e calibrado utilizando uma sonda eletrônica computadorizada de pressão controlada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, U.S.A.), para as coletas de FCG foram selecionados quatro sítios interproximais não contíguos em cada paciente, apresentando PS ≥ 5 mm e presença de sangramento.

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. 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).

Para a calibração, foram coletadas medidas duplicadas para PS e NCI de dez pacientes com periodontite crônica que não estavam relacionadas a este estudo e apresentaram pelo menos dois pares de dentes com PS ≥ 5 mm em locais proximais. Esta calibração foi feita com um intervalo de 48 horas entre o primeiro e o segundo exame. Os coeficientes de correlação intraclasse como medida da reprodutibilidade intraexaminador foram de 0,81 e 0,89 para PS e NCI, respectivamente.

4.6 Coleta dos parâmetros clínicos periodontais

Os parâmetros clínicos foram avaliados em todos os dentes, excluindo os terceiros molares no baseline, aos +45 e +180 dias.

Profundidade de sondagem (PS), mensurada em milímetros (mm), a PS foi medida a partir da margem gengival até o fundo do sulco gengival ou bolsa periodontal.

Nível clínico de inserção (NCI), foi mensurada em mm a partir da junção cimento-esmalte até a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal.

A PS e NCI foram mensurados em seis sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual).

Índice gengival (IG) (Ainamo & Bay 1976) e *índice de placa (IP)* (O'Leary et al., 1972) foi medido em quatro faces por cada dente (Vestibular, lingual ou palatina, mesial e distal) ambos índices foram expressos em porcentagem. O IG foi avaliado dicotomicamente e foi representada pela presença ou ausência de sangramento até 30 segundos após a sondagem e o IP avaliado também de forma dicotômica, foi utilizado para avaliar o estado de higiene bucal das pacientes.

Uma sonda periodontal computadorizada (Florida Probe, Gainesville, FL.) foi utilizada para realizar as medidas periodontais.

4.7 Coleta das amostras

4.7.1 Coleta de fluido crevicular gengival (FCG)

No baseline, bem como em +45 e +180 dias após a realização da TPNC, foram coletadas amostras de FCG, obtido de quatro sítios interproximais (mesial e distal) não contíguos. Em cada paciente, três amostras foram coletadas de cada sítio, de tal forma que cada paciente contribuiu com doze amostras.

A placa supragengival dos elementos dentários selecionados foi removida e os sítios foram cuidadosamente secos com jatos de ar, posteriormente, foram isolados com roletes de algodão estéreis. As amostras do FCG foram obtidas dos sítios mesiais e distais com uma PS $\geq 5\text{mm}$, com a utilização de tiras de Periopaper® (Oralflow Inc., Amityville, NY, EUA). As tiras foram cuidadosamente inseridas junto à margem do sulco gengival durante 30 segundos (Zhao et al., 2011). Em seguida as tiras foram colocadas em frascos esterilizados do tipo *eppendorf*, os quais foram armazenadas a uma temperatura de 80°C para posterior quantificação das citocinas IL-4, IL-10, IL-17, IL-2, IL-6, IL-1 β , INF- γ , TNF- α e TGF- β .

4.7.2 Terapia Periodontal Não Cirúrgica (TPNC)

Todas as pacientes foram submetidas a um exame radiográfico periapical completo da boca toda, após as pacientes foram submetidas à avaliação dos parâmetros clínicos periodontais já descritos anteriormente, sendo também realizadas as coletas do FCG

(baseline). Logo em seguida, receberam raspagem supragengival e polimento coronário com taças de borracha em todos os elementos presentes na cavidade oral.

A TPNC foi iniciada 7 dias após a execução da IHO e da raspagem supragengival inicial. O tratamento foi realizado por um especialista em Periodontia, que consistiu em debridamento subgingival – raspagem e alisamento radicular (RAR) sob anestesia local. A instrumentação foi realizada usando curetas Gracey (Hu-Friedy MFG. Co. Inc., Chicago, IL, EUA), aparelhos ultra-sônicos (Bob-Cat, Dentsply / Cavitron, Long Island City, NY, EUA) e se necessário brocas multilaminadas para acabamento e polimento das superfícies dentárias. A instrumentação foi realizada quadrante por quadrante, até adequada limpeza da área e alisamento radicular, o qual foi verificado com auxílio de uma sonda exploradora ou sonda manual. Em média, o tratamento de toda a cavidade oral foi completado em quatro sessões (sessões de 50 minutos).

Após da TPNC todas as pacientes foram incluídas em um programa de manutenção composto por controle de placa supragengival profissional e reforço de instruções de higiene oral (IHO) mensalmente antes do ciclo de quimioterapia durante 6 meses (180 dias). O programa de manutenção também incluiu uma atualização das histórias médicas e dentárias, exame extra oral e intra-oral de tecidos moles, exame odontológico. Todos os pacientes foram monitorados parâmetros clínicos e imunológicos no baseline, +45 e +180 dias após RAR.

4.8 Processamento das amostras

4.8.1 Fluido Crevicular Gengival (FCG)

Foi determinado o valor da proteína total de cada amostra por meio de imunoenaios enzimáticos convencionais (ELISA), utilizando kits comercialmente disponíveis (Bio-Rad

DC™ Protein Assay, Laboratories, Inc., Berkeley, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. Os dados foram lidos mediante um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 750nm e os resultados apresentados como uma média da duplicata.

Para quantificação de citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-1 β , IL-4, IL-10 e TGF- β), foram utilizados kits disponíveis comercialmente (HSCYTMAG-28SK e TGFBMAG-64K-01 – Milliplex™ map, TGF- β 1 single plex, 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, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-1 β , IL-4, IL-10 e TGF- β) foram adicionadas aos poços. As amostras e padrões foram transferidas para os poços e incubadas *overnight* 4°C. Os poços foram lavados novamente e uma mistura de anticorpos secundários biotinizados foi adicionada. Após a incubação por uma hora, adicionou-se, aos poços, a Streptavidina R-ficoeritrina, sendo este conjunto incubado por mais uma hora. Após lavagem para a remoção de reagentes não-ligados, foi acionado *sheath fluid* (Luminex, 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).

Os valores da proteína total foram convertidos em pg/mL. Os níveis finais das nove citocinas analisadas foram obtidos entre os valores inicialmente obtidos com o sistema MAGPIX® e os valores da proteína total convertida em pg/mL.

4.9 Análise estatística

Para todas as análises, utilizou-se um *software* específico das estatísticas IBM® SPSS® (Statistical Package for Social Sciences) para Windows, versão 20.0. O paciente foi considerado como a unidade estatística (n=20). Foi estabelecido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A normalidade e homocedasticidade dos dados clínicos e imunológicos foi verificada mediante o teste de *Shapiro-Wilk*. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos e testes não paramétricos foram aplicados para os dados com distribuição não normal.

4.9.1 Parâmetros Clínicos Periodontais

Em cada paciente, foi calculada a média $\pm$ desvio-padrão de PS, NCI, IG, IP e a unidade experimental foi o indivíduo. A análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni foi utilizada para detectar significância estatística entre períodos de tempo (baseline, +45 dias, +180 dias) em cada grupo ($p < 0,05$). Para as diferenças entre os grupos foram avaliados pelo Teste t não-pareado ($p < 0,05$).

4.9.2 Parâmetros Imunológicos

A análise estatística entre períodos de tempo (baseline, +45 dias, +180 dias) em cada grupo ($p < 0,05$), foram avaliados pelo teste de Friedman, seguido pelo teste de post-hoc Dunn e as diferenças entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

A correlação entre os níveis de citocinas com os parâmetros clínicos para cada período de tempo (no baseline, + 45, + 180 dias) foi determinada pela correlação de Spearman ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

No total, 200 pacientes foram triadas no ambulatório de mastologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. No entanto só 20 pacientes se encaixaram nos critérios de inclusão. A maioria dos pacientes com câncer de mama foi excluída por ter outro tipo de doença sistêmica, falta de um número mínimo de dentes (20 dentes), morte, abandono e recorrência de câncer de mama ou metástase.

Todas as 20 mulheres com câncer de mama receberam Antraciclinas e Taxanos (epirrubicina, ciclofosfamida e docetaxel), oito ciclos a cada 21 dias. Dos quais 7 pacientes (35,3%) apresentaram tumores com estágio II e 13 pacientes (64,7%), apresentaram tumores com estágio III no momento do diagnóstico.

A amostra geral (40 pacientes) apresentou as seguintes características demográficas: 1) média $\pm$ desvio padrão (DP) idade $46,23 \pm 2,30$ anos (P: $44,6 \pm 5,97$ anos e CAN/PC: $47,85 \pm 9,10$ anos; $t_{38} = 1,301$, $p = 0,20$, nenhuma diferença significativa entre os grupos); 2) todos os pacientes eram do sexo feminino (P: 13 eram pré-menopausadas, CAN/PC: 7 eram pré-menopausadas) e as pacientes incluídas tinham mais de 20 dentes, com mediana de $23,83 \pm 3,64$.

5.1 Monitoramento Clínico

Parâmetros clínicos do local de amostra dos grupos de estudo: medias e desvios padrão de PS, NCI, IG e IP, não foram observadas diferenças significativas no baseline. Houve uma redução significativa de PS para ambos os grupos e em todos os períodos analisados em comparação com o baseline ($p < 0,05$). O grupo PC apresentou uma maior redução de PS aos 180 dias em comparação com o grupo CAN/PC em um único tempo de avaliação ($p < 0,0492$). Em relação ao NCI, ambos grupos mostraram um ganho de inserção

clínica aos +45 e +180 dias em comparação com o valor obtido no baseline ($p < 0,0486$), entretanto, o grupo PC mostrou um maior ganho de NCI aos 180 dias comparado ao grupo CAN/PC em um único tempo de avaliação ($p < 0,0492$) (Tabela 1).

Quanto à porcentagem de IG e IP, observou-se redução significativa em ambos os grupos aos +45 e +180 dias, em comparação com baseline ($p < 0,05$). Adicionalmente o grupo PC mostrou uma maior redução de IG aos 180 dias, comparado aos 45 dias e o grupo CAN/PC mostrou uma maior redução de IP aos 180 dias quando comparado aos 45 dias. O grupo PC teve uma redução maior do IG aos 180 dias quando comparados com o grupo CAN/PC em um único tempo de avaliação ($p < 0,0038$) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e desvios- padrão de PS, NCI, IG e IP para os grupos PC e CAN/PC nos diferentes períodos experimentais em bolsas periodontais- como os resultados das comparações intra e inter-grupos.

Grupos experimentais (Média ± DP)				Comparações inter- grupos (Unpaired t teste)		
Variável	Tempo	PC (n=20)	CAN/PC (n=20)	Diferença entre as médias	95%IC	Valor de p
PS (mm)	<i>Baseline</i>	5.33±0.67	5.33±0.63	0.0000	-0.4191 to 0.4191	NS
	45 dias	3.13±1.14*†	3.29±1.13*	-0.1625	-0.8905 to 0.5655	NS
	180 dias	2.5±0.91*	3.16±1.14*	-0.6625	-1.323 to -0.00285	0.0492
NCI (mm)	<i>Baseline</i>	5.56±0.81	5.74±0.88	-0.1750	-0.7165 to 0.3665	NS
	45 dias	3.86±1.51*	4.16±1.12*	-0.3000	-1.152 to 0.5518	NS
	180 dias	3.34±1.42*	4.25±1.05*	-0.9125	-1.711 to 0.1143	0.0261
IG (%)	<i>Baseline</i>	59.85± 27.56	60.39±24.30	-1.435	-17.80 to 14.93	NS
	45 dias	19.98±19.87*†	21.75±17.10*	-9.120	-19.50 to 1.2558	NS
	180 dias	4.32±4.11*	12.10±10.50*	-2.994	-6.380 to 0.3933	0.0038
IP (%)	<i>Baseline</i>	59.45±25.50	60.89±25.60	-0.5400	-17.18 to 16.10	NS
	45 dias	15.63±12.32*	24.75±19.32*†	-1.775	-13.65 to 10.10	NS
	180 dias	3.79±3.13*	6.79±6.79*	-7.778	-12.89 to -2.670	NS

PS = profundidade de Sondagem; NCI = nível clínico de inserção; DP = desvio padrão; IC= Intervalo de confiança.

Diferenças significativas inter-grupos (Teste t não pareado). $p > 0,1$: não significativo (NS); $p < 0,05$: significativo; * diferença significativa quando comparado ao valor do baseline em um mesmo grupo; † Diferença significativa 45 vs 180 dias em um mesmo grupo (Análise de Variância para medidas repetidas, Teste *post hoc* de Bonferroni).

5.2 Monitoramento imunológico

No baseline, o grupo PC apresentou níveis maiores de INF- γ e níveis menores de IL-10 e TGF- β quando comparados ao grupo CAN/PC (figuras 1A, 1B e 1F). Aos 45 dias o grupo CAN/PC apresentou níveis mais reduzidos de TNF- α ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo PC (figura 1E). Aos 180 dias, o grupo PC apresentou níveis mais reduzidos de INF- γ ($p < 0,001$), IL-2 ($p < 0,001$), TNF- α ($p < 0,0001$) (figuras 1A, 1D, 1E), e níveis elevados de IL-10 ($p < 0,01$) e TGF- β ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo CAN/PC (figuras 1B e 1F).

Quando avaliados após TPNC, o grupo CAN/PC apresentou uma redução significativa de IL-2 aos 45 e 180 dias ($p < 0,05$) em comparação com baseline (figura 1D), TNF- α teve uma redução aos 45 dias, em comparação com baseline ($p < 0,0001$) (figura 1E), além disso, houve uma redução significativa do TGF- β aos 180 dias em comparação com baseline ($p < 0,0001$) (figura 1F). Enquanto IL-1 β , foi aumentado aos 45 dias em comparação com baseline ($p < 0,05$) (figura 1C). No grupo PC, houve uma redução significativa dos níveis de INF- γ aos 180 dias, em comparação com baseline ($p < 0,0001$) e 45 dias ($p < 0,05$) (figura 1A). Da mesma forma, IL-2 e TNF- α reduziram aos 180 dias, em comparação com baseline ($p < 0,0001$) e 45 dias ($p < 0,0001$) (figuras 1D, 1E), bem como um aumento de TGF- β aos 180 dias, em comparação com baseline ($p < 0,05$) e 45 dias ($p < 0,0001$) (figura 1F).

IL-17, IL-6 e IL-4 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em todos os períodos de tempo (figuras 2A, 2B e 2C).

Figura 1. Mediana e 95% de intervalo de confiança. A) INF- γ ; B) IL-10; C) IL-1 β ; D) IL-2; E) TNF- α ; F) TGF- β (pg/mL) para os grupos CAN/PC e PC nos diferentes períodos de tempo em bolsas periodontais (*) diferença significativa quando comparado ao baseline ($p < 0,05$), (†) diferença significativa 45 dias versus 180 dias ($p < 0,05$), (‡) diferença significativa entre grupos experimentais num mesmo tempo de análise ($p < 0,05$).

Figura 2. Mediana e 95% de intervalo de confiança. A) IL-17; B) IL-6; C) IL-4 (pg/mL) para os grupos CAN/PC e PC nos diferentes períodos de tempo em bolsas periodontais, sem diferença entre períodos de tempo ($p > 0,05$); sem diferença entre grupos experimentais num mesmo período de análise ($p > 0,05$).

5.3 Análise de correlação entre parâmetros clínicos e níveis de citocinas no fluido crevicular gengival

No grupo CAN/PC, foi encontrado uma positiva correlação entre PS e os níveis de TNF- α ($r = 0.6489$, $p = 0.002$) no baseline. IL-17 foi positivamente correlacionado com redução de PS ($r = 0.4596$, $p = 0.04$) aos 180 dias; assim também IL-6 foi positivamente correlacionado com redução de PS e ganho de NCI ($r = 0.4513$, $p = 0.05$, $r = 0.5578$, $p = 0.01$, respectivamente) aos 180 dias (tabela 2).

Quanto às correlações entre os níveis de IP, IG e os níveis de citocinas. No grupo CAN/PC, TGF- β foi negativamente correlacionado com IP ($r = -0.4611$, $p = 0,04$) no baseline. IL-6 foi positivamente correlacionado com redução de IP ($r = 0,4699$, $p = 0,03$) aos 45 dias (tabela 2).

No grupo PC, IL-17 foi positivamente correlacionada com PS e NCI ($r = 0.4558$, $p = 0.04$, $r = 0.5447$, $p = 0.01$, respectivamente) no baseline. IL-1 β foi positivamente correlacionado com redução de PS e ganho de NCI ($r = 0.5538$, $p = 0.01$, $r = 0.5902$, $p = 0.006$, respectivamente), aos 45 dias. Uma negativa correlação foi encontrada entre IL-4 e ganho de NCI ($r = -0.4981$, $p = 0.03$) aos 180 dias. Finalmente, o nível de IL-2 foi positivamente correlacionado com redução de IP ($r = 0,4535$, $p = 0,04$) aos 180 dias (tabela 2).

Tabela 2. Relação entre parâmetros clínicos e níveis de citocinas

Coeficiente de correlação de Spearman									
Parâmetros clínicos	INF- γ	IL-10	IL-17	IL-1	IL-2	IL-4	IL-6	TNF- α	TGF- β
Grupo CAN/PC									
PS baseline	0.0994	0.1393	0.0818	0.0359	0.0818	0.1163	-0.1354	0.6489*	-0.0061
PS 45 dias	-0.0181	0.0809	-0.2149	0.0590	0.1150	-0.1468	0.0454	-0.007	0.0802
PS 180 dias	-0.0491	-0.1066	0.4596*	-0.0219	-0.2404	-0.1897	0.4513*	0.0876	-0.0136
NCI baseline	0.1514	0.0456	0.0989	-0.0281	0.0989	-0.0616	0.1514	-0.3812	0.1697
NCI 45 dias	-0.0710	0.0763	-0.1716	0.1785	0.0552	-0.0226	0.1754	0.0423	0.3108
NCI 180 dias	0.2290	0.2441	-0.2933	-0.2026	0.0423	0.1625	0.5578*	0.2411	0.1965
IP baseline	-0.0173	-0.3696	-0.2547	-0.3235	-0.2547	-0.3999	-0.1081	0.1111	-0.4611*
IP 45 dias	0.4101	0.2936	0.0113	-0.0900	0.2906	0.2868	0.4699*	-0.3776	0.0688
IP 180 dias	0.2036	0.4724	-0.1461	-0.2483	0.1802	0.2422	0.0697	0.1279	0.3702
IG baseline	-0.0467	-0.3853	-0.2205	-0.3898	-0.2205	-0.2333	0.2829	0.2310	-0.1663
IG 45 dias	0.4016	0.2672	0.2832	0.0786	0.2359	0.2359	0.2283	-0.1031	0.1504
IG 180 dias	0.1228	0.2977	0.3353	0.0286	0.3233	0.0686	-0.0821	0.3240	0.2434
Grupo PC									
PS baseline	-0.0228	0.1033	0.4558*	0.1147	-0.1686	0.0365	0.2476	0.0501	-0.0007
PS 45 dias	0.2011	0.0105	-0.1821	0.5538*	0.0226	-0.2357	-0.1881	-0.1957	0.2652
PS 180 dias	0.1042	-0.3025	-0.1134	0.0707	-0.0030	-0.3667	-0.2115	-0.0654	0.3545
NCI baseline	-0.0778	0.2613	0.5447*	0.1664	-0.2636	0.1194	0.2909	0.1428	-0.2226
NCI 45 dias	0.2703	0.0241	-0.0996	0.5902*	0.1570	-0.0377	-0.2543	-0.2045	0.2332
NCI 180 dias	0.1242	-0.3942	-0.2354	0.0787	0.0953	-0.4981*	-0.2619	-0.0242	0.4080
IP baseline	0.3437	-0.3692	0.0664	0.0461	0.3533	-0.4174	-0.1291	0.1321	-0.0694
IP 45 dias	0.0577	0.1424	0.3661	-0.0758	0.0919	0.1085	0.3224	0.3842	-0.3051
IP 180 dias	0.3302	-0.1410	0.3769	0.1659	0.4535*	-0.1123	-0.1274	0.1357	0.2450
IG baseline	-0.0105	-0.1461	0.2102	0.1838	0.0760	-0.0649	0.0610	-0.1785	-0.2644
IG 45 dias	-0.0060	0.1265	0.1591	-0.0758	0.1523	0.0168	0.3326	0.3743	-0.3500
IG 180 dias	0.3202	-0.2298	0.1431	0.1672	0.2072	-0.1665	0.0851	0.1989	0.4234

*P <0,05 diferença estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A resposta imune é mediada pela liberação de citocinas envolvidas em reações inflamatórias que são características da periodontite e câncer. Células cancerígenas podem produzir citocinas que estimulam o crescimento e a progressão do tumor e podem induzir o sistema imunológico a produzir outras citocinas (KURZROCK, 2001). Assim pacientes com câncer submetidos à quimioterapia podem apresentar níveis elevados de citocinas circulantes e receptores de citocinas em resposta a um desafio imunitário (RYAN et al., 2007; JAGER; SLEIJFER; VAN DER RIJT, 2008; KONIG et al., 2016) e condições periodontais pré-existentes podem piorar durante a quimioterapia (EPSTEIN; CHOW, 1999; EPSTEIN; STEVENSON-MOORE, 2001; RABER-DURLACHER et al., 2002). Este estudo avaliou os efeitos da TPNC sobre o perfil de citocinas no FCG de pacientes com periodontite crônica e câncer de mama sob quimioterapia.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, os pacientes que só tiveram periodontites apresentaram maiores níveis de INF- γ e menores níveis de IL-10, TGF- β , quando comparados ao grupo com câncer e periodontites no baseline. Isso pode ser explicado, porque INF- γ participa da resposta imune Th1 que inibe selectivamente a proliferação de células Th2 (YUCEL-LINDBERG; NILSSON; MODEER, 1999; GAMONAL et al., 2000; KURU et al., 2004; GARLET, 2010). Além disso o INF- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos, produtores de metabólitos tóxicos para os microorganismos e uma vez mantida a agressão bacteriana e a consequente liberação do IFN- γ , há persistência do quadro inflamatório (DUTZAN et al., 2009a; FU et al., 2013) e risco de progressão da doença periodontal (ALMAGHLOUTH et al., 2014). Dutzan et al. (2009) encontraram concentrações maiores de IFN- γ em tecido gengival de sítios periodontais ativos, quando comparado a sítios inativos.

No grupo de pacientes com câncer e periodontite, no baseline apresentou maiores níveis de IL-10, TGF- β e menores níveis de INF- γ . Essas diferenças com o grupo sem câncer podem ser devido a que essas citocinas (IL-10, TGF- β) encontram-se frequentemente expressas em linhagens de células do câncer de mama e no microambiente tumoral, agindo por mecanismos autócrinos e parácrinos (SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010). O TGF- β , tal como IL-10 são citocinas multifuncionais pleiotrópicas imunossupressoras e/ou anti-inflamatórias, mas também agem como reguladores centrais na proliferação e função das células T reguladoras (Treg) (LIN; KARIN, 2007). Eventos genéticos e epigenéticos que ocorrem durante a tumorigênese mamária tipicamente inativam as atividades de supressão tumoral de TGF- β e IL-10 conferem finalmente a estas citocinas atividades de promoção tumoral, incluindo a capacidade de estimular a invasão do câncer da mama, metástase, angiogênese e a evasão do sistema imunitário (LIN; KARIN, 2007; TAYLOR; LEE; SCHIEMANN, 2011). Ivanovic et al (2003) encontraram maiores valores de TGF- β no plasma de pacientes com câncer de mama, com estagio IIIB/IV quando comparados com doadores saudáveis. Em nosso estudo, 13 pacientes (64.7%) apresentaram tumores do estágio III no momento do diagnóstico. Por outro lado maiores níveis de TGF- β em pacientes com periodontite, pode ser devido a uma resposta imune exacerbada que aparece como um componente molecular associado ao imunossupressão da resposta inflamatória (LEITE et al., 2015).

Ainda avaliados em um único período de avaliação entre os grupos. O grupo CAN/PC apresentou níveis menores de TNF- α aos 45 dias, em comparação com o grupo PC. Níveis menores de TNF- α , pode significar uma estabilidade da doença periodontal já que a atividade desta citocina esta associada com perda de inserção e reabsorção óssea (GRAVES; COCHRAN, 2003). Turer et al. (2017) encontraram uma redução de TNF- α após 6 semanas da TPNC em pacientes com periodontite crônica generalizada. O grupo PC apresentou níveis

mais baixos de INF- γ , IL-2, TNF- α e níveis mais altos de IL-10 e TGF- β aos 180 dias, em comparação com o grupo CAN/PC. Esses resultados podem ser devido a que IL-10 possui um importante papel na supressão da resposta inflamatória, inibindo a síntese das citocinas pró-inflamatórias, suprimindo inúmeras atividades de células apresentadoras de antígenos, inibindo macrófagos e a ativação de células T (GAMONAL et al., 2000). Além disso IL-10 está relacionada a inibição da reabsorção óssea (SASAKI et al., 2000). Já o TGF- β tem como função controlar respostas imune exacerbadas. Por tanto maiores níveis de TGF- β no FCG de pacientes com periodontite crônica estariam ocorrendo não somente como forma de modular a resposta inflamatória, como também para minimizar a extensão do tecido lesado (CARDOSO et al., 2008).

Os resultados obtidos após TPNC no grupo CAN/PC, mostra uma redução significativa de IL-2 aos 45 e 180 dias comparados com baseline, redução de TNF- α aos 45 dias quando comparado com baseline; adicionalmente também houve significante redução de TGF- β aos 180 dias quando comparado com baseline. Estudos indicam que a TPNC pode reduzir marcadores inflamatórios no sangue e no FCG, entre eles IL-2 (THUNELL et al., 2010), TNF- α (TURER et al., 2017) e TGF- β (LEITE et al., 2015). Assim também há evidência do efeito da quimioterapia e sua capacidade na alteração dos parâmetros imunológicos. Tsavaris et al. (2002) avaliou o efeito da quimioterapia com taxanos (placlitaxel e docetaxel) e sua capacidade na alteração dos parâmetros imunológicos (IL-2, IL-1 β , IFN- γ , GM-CSF, IL-6, TNF- α , e PGE2) em pacientes com câncer de mama, observando que após do tratamento quimioterápico houve uma diminuição dos níveis de IL-2, IL-1 β , TNF- α e PGE2 maior para o grupo que uso docetaxel, comparado ao grupo que uso paclitaxel. No entanto é importante ressaltar que a TPNC pode ter ajudado a diminuir esses marcadores prejudiciais nessas pacientes (TSAVARIS et al., 2002).

Quando avaliado o grupo PC após tratamento periodontal foi observada uma redução significativa de INF- γ , IL-2, TNF- α aos 180 dias, quando comparados com baseline e aos 45 dias, assim como também foi observado um incremento de TGF- β aos 180 dias comparados com baseline e 45 dias. A diferenciação seletiva de células T dependeram dos níveis de citocinas, o que determinaria a predominância de células patológicas (Th1) ou protetoras (células Th2) (CARDOSO et al., 2008; DUTZAN et al., 2009b; GARLET, 2010; DUTZAN et al., 2012). No estudo de Thunell et al. (2010) encontraram uma redução da IL-2 e INF- γ (Th1 citocinas) nos diferentes intervalos de tempo (6 e 8 semanas) da terapia periodontal. Em outro estudo Dutzan et al. (2009) encontraram concentrações maiores de IL-10, TGF- β em tecido gengival de sítios periodontais inativos, quando comparado a sítios ativos. Nesse contexto níveis maiores de células Th2/ou Tregs em pacientes com periodontite poderiam estar relacionados com a melhoria da saúde clínica periodontal.

No grupo CAN/PC, foi encontrado uma positiva correlação entre PS e os níveis de TNF- α no baseline. Nossos resultados são similares aos encontrados por Kurtis et al. (2005) e Zhang et al. (2016) que encontraram uma positiva correlação entre TNF- α e PS em pacientes com periodontite crônica e agressiva. Em outro estudo, uma positiva correlação também foi encontrada entre TNF- α e PS em pacientes com doenças autoimunes e periodontite crônica (MAYER et al., 2013). Assim, também foi observado que os pacientes com doenças autoimunes têm índices periodontais mais altos e níveis mais altos de TNF- α no FCG do que controles saudáveis e que o tratamento periodontal parece reverter esse fenômeno.

Após terapia periodontal no grupo CAN/PC, a redução dos níveis de IL-17 foi positivamente correlacionado com redução de PS aos 180 dias. A IL-17 é considerada uma citocina pró-inflamatória muito importante, tanto na doença periodontal (Zhang et al., 2011; Fu et al., 2013) como no câncer de mama (Chen et al., 2013).

Da mesma forma IL-6 foi positivamente correlacionado com redução de PS e ganho de NCI aos 180 dias. Estudos tem mostrado que níveis reduzidos de IL-17 e IL-6 após TPNC, encontra-se correlacionados a redução dos parâmetros clínicos periodontais (DUARTE et al., 2010; FU et al., 2013; GEORGE; JANAM, 2013). Zhou et al. (2013) encontraram uma positiva correlação entre IL-6 e NCI em pacientes com periodontite crônica com doença cardíaca coronária estável, três meses após o tratamento periodontal.

No grupo PC, IL-17 foi positivamente correlacionado com PS e NCI no baseline. Awang et al. (2014) também encontraram uma positiva correlação entre níveis maiores de IL-17 no FCG com aumento de PS, NCI e sangramento a sondagem (SS), o que indica que esta citocina tem um papel inportante na patogênese da doença periodontal. IL-1 β foi positivamente correlacionado com redução de PS e ganho de NCI aos 45 dias. Nossos resultados são consistentes com os encontrados por HOU et al. (1995), TSAI et al. (1995); Chaudhari et al. (2011), sugerindo que a quantidade de FCG de IL-1 β está intimamente associada ao estado periodontal. Esta relação pode ser valiosa no monitoramento da atividade da doença periodontal. Uma correlação negativa foi encontrada entre IL-4 e ganho de NCI. Nossos resultados são similares aos de Park et al. (2010), que encontraram uma correlação negativa entre os níveis de IL-4 e a altura do osso alveolar em pacientes com periodontitis severa.

No grupo CAN/PC, níveis de TGF- β foi correlacionado negativamente com IP no baseline. Por outro lado após TPNC, uma correlação positiva de IL-6 com a redução de IP aos 45 dias. Zhou et al. (2013) e Zhang et al. (2016) mostraram uma correlação positiva nos níveis de IL-6 com redução de IP após tratamento periodontal. No grupo P, IL-2 foi positivamente correlacionado com a redução de IP aos 180 dias. Isso pode ser devido a que o índice de placa é um importante fator etiológico da periodontite, que pode ser parte da prova do mecanismo que liga a infecção focal com níveis sistêmicos de citocinas.

Até o presente momento este estudo é o primeiro estudo em investigar o efeito do tratamento periodontal no perfil das citocinas em pacientes câncer de mama e periodontite crônica submetidos a quimioterapia. Este estudo indica que os pacientes com câncer de mama e doença periodontal devem ser tratados periodontalmente antes de iniciar o tratamento quimioterápico. Os marcadores inflamatórios podem ser reduzidos ou modulados de forma a favorecer um padrão menos inflamatório no ambiente oral, proporcionando um tecido periodontal mais resistente a reações agudas que podem ser de grande risco durante o período de quimioterapia.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Pode se concluir o seguinte:

- i. A TPNC em pacientes com câncer de mama e periodontite crônica sobre quimioterapia pode ajudar a modular as citocinas expressas sistematicamente e/ou no microambiente tumoral, levando assim a um ambiente global mais favorável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

secondary title: INCA, National Institute of Cancer, Brazil, 2016. 2017.

ALINEJAD, V.; DOLATI, S.; MOTALLEBNEZHAD, M.; YOUSEFI, M. The role of IL17B-IL17RB signaling pathway in breast cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 88, n., p. 795-803, 2017.

ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M. G.; SICA, A.; MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 18, n. 1, p. 3-10, 2008.

ARDIZZOIA, A.; LISSONI, P.; BRIVIO, F.; TISI, E.; PEREGO, M. S.; GRASSI, M. G.; PITTALIS, S.; CRISPINO, S.; BARNI, S.; TANCINI, G. Tumor necrosis factor in solid tumors: increased blood levels in the metastatic disease. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 6, n. 3, p. 103-107, 1992.

ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7, n. 3, p. 211-217, 2005.

BENEVIDES, L.; CARDOSO, C. R.; TIEZZI, D. G.; MARANA, H. R.; ANDRADE, J. M.; SILVA, J. S. 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. 1518-1528, 2013.

BENOY, I.; SALGADO, R.; COLPAERT, C.; WEY TJENS, R.; VERMEULEN, P. B.; DIRIX, L. Y. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. **Clin Breast Cancer**, v. 2, n. 4, p. 311-315, 2002.

BERGER, F. G. The interleukin-6 gene: a susceptibility factor that may contribute to racial and ethnic disparities in breast cancer mortality. **Breast Cancer Res Treat**, v. 88, n. 3, p. 281-285, 2004.

BHATTACHARJEE, H. K.; BANSAL, V. K.; NEPAL, B.; SRIVASTAVA, S.; DINDA, A. K.; MISRA, M. C. Is Interleukin 10 (IL10) Expression in Breast Cancer a Marker of Poor Prognosis? **Indian J Surg Oncol**, v. 7, n. 3, p. 320-325, 2016.

BRAZIL. Ministry of Health. National Program of Breast Cancer Control. National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva. secondary title, July 2014.

CANDIA, J.; SOMARRIVA, C.; FONSECA, D.; PARADA, F.; BRICEÑO, J.; FERNÁNDEZ, A. TGF- β alterations in oral squamous cell carcinoma. Narrative review. **Journal of Oral Research**, v. 5, n. 5, p. 207-214, 2016.

CARDOSO, C. R.; GARLET, G. P.; MOREIRA, A. P.; JUNIOR, W. M.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 1, p. 311-318, 2008.

CHAUDHARI, A. U.; BYAKOD, G. N.; WAGHMARE, P. F.; KARHADKAR, V. M. Correlation of levels of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid to the clinical parameters of chronic periodontitis. **J Contemp Dent Pract**, v. 12, n. 1, p. 52-59, 2011.

CHEN, W. C.; LAI, Y. H.; CHEN, H. Y.; GUO, H. R.; SU, I. J.; CHEN, H. H. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. **Histopathology**, v. 63, n. 2, p. 225-233, 2013.

DAVE, H.; SHAH, M.; TRIVEDI, S.; SHUKLA, S. Prognostic utility of circulating transforming growth factor beta 1 in breast cancer patients. **Int J Biol Markers**, v. 27, n. 1, p. 53-59, 2012.

DEAS, D. E.; MEALEY, B. L. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. **Periodontol** 2000, v. 53, n., p. 154-166, 2010.

DENG, Z. L.; SZAFRANSKI, S. P. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. v. 7, n. 1, p. 3703, 2017.

DUARTE, P. M.; DA ROCHA, M.; SAMPAIO, E.; MESTNIK, M. J.; FERES, M.; FIGUEIREDO, L. C.; BASTOS, M. F.; FAVERI, M. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. **J Periodontol**, v. 81, n. 7, p. 1056-1063, 2010.

DUTZAN, N.; VERNAL, R.; HERNANDEZ, M.; DEZEREGA, A.; RIVERA, O.; SILVA, N.; AGUILLON, J. C.; PUENTE, J.; POZO, P.; GAMONAL, J. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 80, n. 2, p. 290-296, 2009a.

DUTZAN, N.; GAMONAL, J.; SILVA, A.; SANZ, M.; VERNAL, R. 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, 2009b.

DUTZAN, N.; VERNAL, R.; VAQUE, J. P.; GARCIA-SESNICH, J.; HERNANDEZ, M.; ABUSLEME, L.; DEZEREGA, A.; GUTKIND, J. S.; GAMONAL, J. Interleukin-21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. **J Periodontol**, v. 83, n. 7, p. 948-954, 2012.

EIRO, N.; GONZALEZ, L.; GONZALEZ, L. O.; FERNANDEZ-GARCIA, B.; LAMELAS, M. L.; MARIN, L.; GONZALEZ-REYES, S.; DEL CASAR, J. M.; VIZOSO, F. J. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49047, 2012.

ENGEBRETSON, S. P.; GRBIC, J. T.; SINGER, R.; LAMSTER, I. B. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 29, n. 1, p. 48-53, 2002.

EPSTEIN, J. B.; CHOW, A. W. Oral complications associated with immunosuppression and cancer therapies. **Infect Dis Clin North Am**, v. 13, n. 4, p. 901-923, 1999.

EPSTEIN, J. B.; STEVENSON-MOORE, P. Periodontal disease and periodontal management in patients with cancer. **Oral Oncol**, v. 37, n. 8, p. 613-619, 2001.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front Biosci**, v. 2, n., p. d12-26, 1997.

FERNANDEZ-GARCIA, B.; EIRO, N.; MIRANDA, M. A.; CID, S.; GONZALEZ, L. O.; DOMINGUEZ, F.; VIZOSO, F. J. Prognostic significance of inflammatory factors expression by stroma from breast carcinomas. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 8, p. 768-776, 2016.

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, 2010.

FU, Q. Y.; ZHANG, L.; DUAN, L.; QIAN, S. Y.; PANG, H. X. Correlation of chronic periodontitis in tropical area and IFN-gamma, IL-10, IL-17 levels. **Asian Pac J Trop Med**, v. 6, n. 6, p. 489-492, 2013.

GAMONAL, J.; ACEVEDO, A.; BASCONES, A.; JORGE, O.; SILVA, A. 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. 1535-1545, 2000.

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. 1349-1363, 2010.

GENCO, R. J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **J Periodontol**, v. 63, n. 4 Suppl, p. 338-355, 1992.

GEORGE, A. K.; JANAM, P. The short-term effects of non-surgical periodontal therapy on the circulating levels of interleukin-6 and C-reactive protein in patients with chronic periodontitis. **J Indian Soc Periodontol**, v. 17, n. 1, p. 36-41, 2013.

GERGER, A.; RENNER, W.; LANGSENLEHNER, T.; HOFMANN, G.; KNECHTEL, G.; SZKANDERA, J.; SAMONIGG, H.; KRIPPL, P.; LANGSENLEHNER, U. Association of interleukin-10 gene variation with breast cancer prognosis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 119, n. 3, p. 701-705, 2010.

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. 1133-1146, 2010.

GOUTOUDI, P.; DIZA, E.; ARVANITIDOU, M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. **J Dent**, v. 32, n. 7, p. 511-520, 2004.

GRADISHAR, W. J.; ANDERSON, B. O.; BALASSANIAN, R.; BLAIR, S. L.; BURSTEIN, H. J.; CYR, A.; ELIAS, A. D.; FARRAR, W. B.; FORERO, A.; GIORDANO, S. H.; GOETZ, M.; GOLDSTEIN, L. J.; HUDIS, C. A.; ISAKOFF, S. J.; MARCOM, P. K.; MAYER, I. A.; MCCORMICK, B.; MORAN, M.; PATEL, S. A.; PIERCE, L. J.; REED, E. C.; SALERNO, K. E.; SCHWARTZBERG, L. S.; SMITH, K. L.; SMITH, M. L.; SOLIMAN, H.; SOMLO, G.; TELLI, M.; WARD, J. H.; SHEAD, D. A.; KUMAR, R. Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 14, n. 3, p. 324-354, 2016.

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, 2003.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

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

HEINRICH, P. C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H. M.; MULLER-NEUEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem J**, v. 374, n. Pt 1, p. 1-20, 2003.

HESPANHOL, F. L.; TINOCO, E. M.; TEIXEIRA, H. G.; FALABELLA, M. E.; ASSIS, N. M. [Buccal manifestations in patients submitted to chemotherapy]. **Cien Saude Colet**, v. 15 Suppl 1, n., p. 1085-1094, 2010.

HOU, L. T.; LIU, C. M.; ROSSOMANDO, E. F. Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. **J Clin Periodontol**, v. 22, n. 2, p. 162-167, 1995.

HUSSEIN, M. Z.; AL FIKKY, A.; ABDEL BAR, I.; ATTIA, O. Serum IL-6 and IL-12 levels in breast cancer patients. **Egypt J Immunol**, v. 11, n. 2, p. 165-170, 2004.

IVANOVIC, V.; TODOROVIC-RAKOVIC, N.; DEMAJO, M.; NESKOVIC-KONSTANTINOVIC, Z.; SUBOTA, V.; IVANISEVIC-MILOVANOVIC, O.; NIKOLIC-VUKOSAVLJEVIC, D. Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. **Eur J Cancer**, v. 39, n. 4, p. 454-461, 2003.

IVANOVIC, V.; DEMAJO, M.; KRTOLICA, K.; KRAJNOVIC, M.; KONSTANTINOVIC, M.; BALTIC, V.; PRTENJAK, G.; STOJILJKOVIC, B.; BREBERINA, M.; NESKOVIC-KONSTANTINOVIC, Z.; NIKOLIC-VUKOSAVLJEVIC, D.; DIMITRIJEVIC, B. Elevated plasma TGF-beta1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients. **Clin Chim Acta**, v. 371, n. 1-2, p. 191-193, 2006.

JAGER, A.; SLEIJFER, S.; VAN DER RIJT, C. C. The pathogenesis of cancer related fatigue: could increased activity of pro-inflammatory cytokines be the common denominator? **Eur J Cancer**, v. 44, n. 2, p. 175-181, 2008.

JIN, L.; YUAN, R. Q.; FUCHS, A.; YAO, Y.; JOSEPH, A.; SCHWALL, R.; SCHNITT, S. J.; GUIDA, A.; HASTINGS, H. M.; ANDRES, J.; TURKEL, G.; POLVERINI, P. J.; GOLDBERG, I. D.; ROSEN, E. M. Expression of interleukin-1beta in human breast carcinoma. **Cancer**, v. 80, n. 3, p. 421-434, 1997.

JONES, V. S.; HUANG, R. Y.; CHEN, L. P.; CHEN, Z. S.; FU, L.; HUANG, R. P. Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1865, n. 2, p. 255-265, 2016.

KAEWKANGSADAN, V.; VERMA, C.; EREMIN, J. M.; COWLEY, G.; ILYAS, M.; EREMIN, O. Crucial Contributions by T Lymphocytes (Effector, Regulatory, and Checkpoint Inhibitor) and Cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a Pathological Complete Response Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Breast Cancer. **J Immunol Res**, v. 2016, n., p. 4757405, 2016.

KONIG, A.; VILSMAIER, T.; RACK, B.; FRIESE, K.; JANNI, W.; JESCHKE, U.; ANDERGASSEN, U.; TRAPP, E.; JUCKSTOCK, J.; JAGER, B.; ALUNNI-FABBRONI, M.; FRIEDL, T.; WEISSENBACHER, T. Determination of Interleukin-4, -5, -6, -8 and -13 in Serum of Patients with Breast Cancer Before Treatment and its Correlation to Circulating Tumor Cells. **Anticancer Res**, v. 36, n. 6, p. 3123-3130, 2016.

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, n 1, p. 33-53, 1997.

KUMARI, N.; DWARAKANATH, B. S.; DAS, A.; BHATT, A. N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **Tumour Biol**, v. 37, n. 9, p. 11553-11572, 2016.

KURTZMAN, S. H.; ANDERSON, K. H.; WANG, Y.; MILLER, L. J.; RENNA, M.; STANKUS, M.; LINDQUIST, R. R.; BARROWS, G.; KREUTZER, D. L. Cytokines in human breast cancer: IL-1alpha and IL-1beta expression. **Oncol Rep**, v. 6, n. 1, p. 65-70, 1999.

KURTIS, B.; TUTER, G.; SERDAR, M.; AKDEMIR, P.; UYGUR, C.; FIRATLI, E.; BAL, B. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. **J Periodontol**, v. 76, n. 11, p. 1849-1855, 2005.

KURU, L.; GRIFFITHS, G. S.; PETRIE, A.; OLSEN, I. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 7, p. 527-533, 2004.

KURZROCK, R. The role of cytokines in cancer-related fatigue. **Cancer**, v. 92, n. 6 Suppl, p. 1684-1688, 2001.

LAMONT, R. J.; HAJISHENGALLIS, G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. **Trends in molecular medicine**, v. 21, n. 3, p. 172-183, 2015.

LEITE, A. C.; CARNEIRO, V. M.; MORANDINI, A. C.; RAMOS-JUNIOR, E. S.; GUIMARAES, M. C. Effects of periodontal therapy on white blood cell count and levels of transforming growth factor beta in serum of subjects with severe periodontitis. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 61, n. 1, p. 72-80, 2015.

LEE, K. M.; PARK, S. K.; HAMAJIMA, N.; TAJIMA, K.; CHOI, J. Y.; NOH, D. Y.; AHN, S. H.; YOO, K. Y.; HIRVONEN, A.; KANG, D. Genetic polymorphisms of interleukin-1 beta (IL-1B) and IL-1 receptor antagonist (IL-1RN) and breast cancer risk in Korean women. **Breast Cancer Res Treat**, v. 96, n. 2, p. 197-202, 2006.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest**, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, 2007.

LIU, Y. C.; LERNER, U. H.; TENG, Y. T. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. **Periodontol** 2000, v. 52, n. 1, p. 163-206, 2010.

LLANES-FERNANDEZ, L.; ALVAREZ-GOYANES, R. I.; ARANGO-PRADO MDEL, C.; ALCOCER-GONZALEZ, J. M.; MOJARRIETA, J. C.; PEREZ, X. E.; LOPEZ, M. O.; ODIO, S. F.; CAMACHO-RODRIGUEZ, R.; GUERRA-YI, M. E.; MADRID-MARINA, V.; TAMEZ-GUERRA, R.; RODRIGUEZ-PADILLA, C. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. **Breast**, v. 15, n. 4, p. 482-489, 2006.

LOPEZ-GALINDO, M. P.; BAGAN, J. V.; JIMENEZ-SORIANO, Y.; ALPISTE, F.; CAMPS, C. Clinical evaluation of dental and periodontal status in a group of oncological patients before chemotherapy. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 11, n. 1, p. E17-21, 2006.

LORUSSO, G.; RUEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochem Cell Biol**, v. 130, n. 6, p. 1091-1103, 2008.

LUKASZEWICZ, M.; MROCZKO, B.; SZMITKOWSKI, M. [Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease]. **Pol Arch Med Wewn**, v. 117, n. 5-6, p. 247-251, 2007.

MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D. B.; HELMS, W. S.; BULLARD, D. C.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WAHL, S. M.; SCHOEB, T. R.; WEAVER, C. T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.

MARCACCINI AM, MESCHIARI CA, SORGI CA, SARAIVA MC, DE SOUZA AM, FACCIOLO LH, TANUS-SANTOS JE, NOVAES AB, GERLACH RF. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. **J Periodontol**, v. 80, n. 4, p. 594-602, 2009.

MAYER, Y.; ELIMELECH, R.; BALBIR-GURMAN, A.; BRAUN-MOSCOVICI, Y.; MACHTEI, E. E. Periodontal condition of patients with autoimmune diseases and the effect of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. **J Periodontol**, v. 84, n. 2, p. 136-142, 2013.

MILLER, L. J.; KURTZMAN, S. H.; ANDERSON, K.; WANG, Y.; STANKUS, M.; RENNA, M.; LINDQUIST, R.; BARROWS, G.; KREUTZER, D. L. Interleukin-1 family expression in human breast cancer: interleukin-1 receptor antagonist. **Cancer Invest**, v. 18, n. 4, p. 293-302, 2000.

NAPENAS, J. J.; BRENNAN, M. T.; BAHRANI-MOUGEOT, F. K.; FOX, P. C.; LOCKHART, P. B. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, n. 1, p. 48-59, 2007.

NAPENAS, J. J.; BRENNAN, M. T.; COLEMAN, S.; KENT, M. L.; NOLL, J.; FRENETTE, G.; NUSSBAUM, M. L.; MOUGEOT, J. L.; PASTER, B. J.; LOCKHART, P. B.; BAHRANI-MOUGEOT, F. K. Molecular methodology to assess the impact of cancer chemotherapy on the oral bacterial flora: a pilot study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 4, p. 554-560, 2010.

NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 5, p. 325-337, 2006.

OLIVER, R. C.; BROWN, L. J.; LOE, H. Periodontal diseases in the United States population. **J Periodontol**, v. 69, n. 2, p. 269-278, 1998.

PANTSCHENKO, A. G.; PUSHKAR, I.; ANDERSON, K. H.; WANG, Y.; MILLER, L. J.; KURTZMAN, S. H.; BARROWS, G.; KREUTZER, D. L. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. **Int J Oncol**, v. 23, n. 2, p. 269-284, 2003.

PARK, C. S.; LEE, J. Y.; KIM, S. J.; CHOI, J. I. Identification of immunological parameters associated with the alveolar bone level in periodontal patients. **J Periodontal Implant Sci**, v. 40, n. 2, p. 61-68, 2010.

PETERSON, D. E.; D'AMBROSIO, J. A. Diagnosis and management of acute and chronic oral complications of nonsurgical cancer therapies. **Dent Clin North Am**, v. 36, n. 4, p. 945-966, 1992.

RABER-DURLACHER, J. E.; EPSTEIN, J. B.; RABER, J.; VAN DISSEL, J. T.; VAN WINKELHOFF, A. J.; GUIOT, H. F.; VAN DER VELDEN, U. Periodontal infection in cancer patients treated with high-dose chemotherapy. **Support Care Cancer**, v. 10, n. 6, p. 466-473, 2002.

RAHNAMA, M.; MADEJ-CZERWONKA, B.; JASTRZEBSKA-JAMROGIEWICZ, I.; JAMROGIEWICZ, R. Analysis of the influence of parenteral cancer chemotherapy on the health condition of oral mucosa. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 19, n. 1, p. 77-82, 2015.

RAO, V. S.; DYER, C. E.; JAMEEL, J. K.; DREW, P. J.; GREENMAN, J. Potential prognostic and therapeutic roles for cytokines in breast cancer (Review). **Oncol Rep**, v. 15, n. 1, p. 179-185, 2006.

ROATO, I.; BRUNETTI, G.; GORASSINI, E.; GRANO, M.; COLUCCI, S.; BONELLO, L.; BUFFONI, L.; MANFREDI, R.; RUFFINI, E.; OTTAVIANI, D.; CIUFFREDA, L.; MUSSA, A.; FERRACINI, R. IL-7 up-regulates TNF-alpha-dependent osteoclastogenesis in patients affected by solid tumor. **PLoS One**, v. 1, n., p. e124, 2006.

RUDDY, M. J.; WONG, G. C.; LIU, X. K.; YAMAMOTO, H.; KASAYAMA, S.; KIRKWOOD, K. L.; GAFFEN, S. L. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. **J Biol Chem**, v. 279, n. 4, p. 2559-2567, 2004.

RYAN, J. L.; CARROLL, J. K.; RYAN, E. P.; MUSTIAN, K. M.; FISCELLA, K.; MORROW, G. R. Mechanisms of cancer-related fatigue. **Oncologist**, v. 12 Suppl 1, n., p. 22-34, 2007.

SALGADO, R.; JUNIUS, S.; BENOY, I.; VAN DAM, P.; VERMEULEN, P.; VAN MARCK, E.; HUGET, P.; DIRIX, L. Y. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. **International journal of cancer**, v. 103, n. 5, p. 642-646, 2003.

SASAKI, H.; HOU, L.; BELANI, A.; WANG, C. Y.; UCHIYAMA, T.; MULLER, R.; STASHENKO, P. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. **J Immunol**, v. 165, n. 7, p. 3626-3630, 2000.

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, 2010.

SHARMA, G. N.; DAVE, R.; SANADYA, J.; SHARMA, P.; SHARMA, K. K. Various types and management of breast cancer: an overview. **J Adv Pharm Technol Res**, v. 1, n. 2, p. 109-126, 2010.

SHEEN-CHEN, S. M.; CHEN, W. J.; ENG, H. L.; CHOU, F. F. Serum concentration of tumor necrosis factor in patients with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 43, n. 3, p. 211-215, 1997.

SHEEN-CHEN, S. M.; CHEN, H. S.; SHEEN, C. W.; ENG, H. L.; CHEN, W. J. Serum levels of transforming growth factor beta1 in patients with breast cancer. **Arch Surg**, v. 136, n. 8, p. 937-940, 2001.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J Periodontol**, v. 63, n. 4 Suppl, p. 322-331, 1992.

SUNG, E. Dental management of patients undergoing chemotherapy. **Journal of the California Dental Association**, v. 23, n. 11, p. 55-59, 1995.

TAYLOR, M. A.; LEE, Y. H.; SCHIEMANN, W. P. Role of TGF-beta and the tumor microenvironment during mammary tumorigenesis. **Gene Expr**, v. 15, n. 3, p. 117-132, 2011.

THUNELL, D. H.; TYMKIW, K. D.; JOHNSON, G. K.; JOLY, S.; BURNELL, K. K.; CAVANAUGH, J. E.; BROGDEN, K. A.; GUTHMILLER, J. M. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. **J Periodontal Res**, v. 45, n. 1, p. 148-152, 2010.

TONG, A. W.; SEAMOUR, B.; LAWSON, J. M.; ORDONEZ, G.; VUKELJA, S.; HYMAN, W.; RICHARDS, D.; STEIN, L.; MAPLES, P. B.; NEMUNAITIS, J. Cellular immune profile of patients with advanced cancer before and after taxane treatment. **Am J Clin Oncol**, v. 23, n. 5, p. 463-472, 2000.

TORRES, M. A.; PACE, T. W.; LIU, T.; FELGER, J. C.; MISTER, D.; DOHO, G. H.; KOHN, J. N.; BARSEVICK, A. M.; LONG, Q.; MILLER, A. H. Predictors of depression in breast cancer patients treated with radiation: role of prior chemotherapy and nuclear factor kappa B. **Cancer**, v. 119, n. 11, p. 1951-1959, 2013.

TSAVARIS, N.; KOSMAS, C.; VADIKA, M.; KANELOPOULOS, P.; BOULAMATSIS, D. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. **Br J Cancer**, v. 87, n. 1, p. 21-27, 2002.

TURER, C. C.; DURMUS, D.; BALLI, U.; GUVEN, B. Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid and Serum Endocan, Vascular Endothelial Growth Factor-A, and Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels. **J Periodontol**, v. 88, n. 5, p. 493-501, 2017.

VERMA, C.; EREMIN, J. M.; ROBINS, A.; BENNETT, A. J.; COWLEY, G. P.; EL-SHEEMY, M. A.; JIBRIL, J. A.; EREMIN, O. Abnormal T regulatory cells (Tregs: FOXP3+, CTLA-4+), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs: monocytic, granulocytic) and polarised T helper cell profiles (Th1, Th2, Th17) in women with large and locally advanced breast cancers undergoing neoadjuvant chemotherapy (NAC) and surgery: failure of abolition of abnormal treg profile with treatment and correlation of treg levels with pathological response to NAC. **J Transl Med**, v. 11, n., p. 16, 2013.

VILSMAIER, T.; RACK, B.; KONIG, A.; FRIESE, K.; JANNI, W.; JESCHKE, U.; WEISSENBACHER, T. Influence of Circulating Tumour Cells on Production of IL-1alpha, IL-1beta and IL-12 in Sera of Patients with Primary Diagnosis of Breast Cancer Before Treatment. **Anticancer Res**, v. 36, n. 10, p. 5227-5236, 2016.

YANG, C.; HE, L.; HE, P.; LIU, Y.; WANG, W.; HE, Y.; DU, Y.; GAO, F. Increased drug resistance in breast cancer by tumor-associated macrophages through IL-10/STAT3/bcl-2 signaling pathway. **Med Oncol**, v. 32, n. 2, p. 352, 2015.

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**, v. 62, n. 1, p. 153-159, 2012.

YU, H. M.; YANG, J. L.; JIAO, S. C.; WANG, J. D.; LI, Y. TGF-beta1 precursor and CD8 are potential prognostic and predictive markers in operated breast cancer. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 34, n. 1, p. 51-58, 2014.

YUCEL-LINDBERG, T.; NILSSON, S.; MODEER, T. Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1 β and tumor necrosis factor α in human gingival fibroblasts. **J Dent Res**, v. 78, n. 1, p. 61-68, 1999.

ZHANG, G. J.; ADACHI, I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. **Anticancer Res**, v. 19, n. 2b, p. 1427-1432, 1999.

ZHANG, Q.; CHEN, B.; ZHU, D.; YAN, F. Biomarker levels in gingival crevicular fluid of subjects with different periodontal conditions: A cross-sectional study. **Arch Oral Biol**, v. 72, n., p. 92-98, 2016.

ZHAO, L.; ZHOU, Y.; XU, Y.; SUN, Y.; LI, L.; CHEN, W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 6, p. 509-516, 2011.

ZHOU, S. Y.; DUAN, X. Q.; HU, R.; OUYANG, X. Y. Effect of non-surgical periodontal therapy on serum levels of TNF- α , IL-6 and C-reactive protein in periodontitis subjects with stable coronary heart disease. **Chin J Dent Res**, v. 16, n. 2, p. 145-151, 2013.

ZHU, X.; MULCAHY, L. A.; MOHAMMED, R. A.; LEE, A. H.; FRANKS, H. A.; KILPATRICK, L.; YILMAZER, A.; PAISH, E. C.; ELLIS, I. O.; PATEL, P. M.; JACKSON, A. M. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. **Breast Cancer Res**, v. 10, n. 6, p. R95, 2008.

ANEXOS

ANEXO A: 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 com o, 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 B: 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.

RIBEIRÃO PRETO, 19 de Dezembro de 2014

Assinado por:

Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

ANEXO C: Artigo científico submetido para publicação no periódico *Journal clinical of periodontology*

Effects of non-surgical periodontal therapy on the cytokine profile of patients with breast cancer with periodontitis undergoing chemotherapy.

Kelly Rocio Vargas Villafuerte¹, Felipe Torres Dantas¹, Michel Reis Messoria¹, Mario Taba Jr¹, Francisco Jose Candido dos Reis², Hélio Humberto Angotti Carrara², Daniela Bazan Palioto¹

¹Department of Oral &Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo- USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

²Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Brazil.

Running title: Modification on cytokine profile after periodontal treatment in breast cancer patients

Key words: Breast cancer, cytokines, chronic periodontitis, periodontal therapy.

Conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

Financial Support: The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants 2012/20971-8.

Corresponding author: Prof. Dr. 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; Tel: 0055-16-33154136; Fax: 0055-16-33154788.

Abstract

Aim: This study evaluated the effects of non-surgical periodontal therapy (NSPT) on cytokine profile and correlated it with the clinical parameters of patients undergoing chemotherapy for breast cancer.

Materials and methods: 40 patients were allocated into: Chronic periodontitis patients (P) (n=20) and breast cancer with chronic periodontitis patients (CAN/P) (n=20). Cytokines in gingival crevicular fluid (GCF) were evaluated by Luminex assay at baseline, 45 and 180 days after therapy. The levels of cytokines were correlated with the clinical parameters: probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), plaque index (PI), gingival index (GI).

Results: After NSPT, the levels of IL-2, TNF- α and TGF- β were down-regulated ($p<0.05$) in CAN/P. In the P group the levels of INF- γ , IL-2, TNF- α were down regulated ($p<0.05$), and TGF- β was increased ($p<0.05$). GCF IL-17 was positively correlated with PD ($r=0.4596$); IL-6 was significantly positively correlated with PD and CAL ($r=0.4513$, $r=0.5578$) at 180 days in CAN/P ($p<0.05$). In the P group, GCF IL-1 β was positively correlated with PD and CAL ($r=0.5538$, $r=0.5902$) at 45 days ($p<0.05$).

Conclusion: NSPT before chemotherapy favorably modulates the inflammatory cytokines locally and this may lead to a more favorable general systemic environment.

CLINICAL RELEVANCE

Scientific rationale for study: Elevated and unfavorable levels of inflammatory cytokines is driven by periodontal disease. Likewise, chemotherapy may contribute to elevate the levels of circulating pro-inflammatory cytokines and cytokine receptors in response to an immune challenge, which may worsen pre-existing periodontal conditions. On the other hand, the periodontal treatment before chemotherapy may reduce or modulate the overall inflammatory cytokines leading to a more favorable local and, as well, systemic condition. **Principal findings:** After NSPT in cancer patients on chemotherapy, a reduction in the periodontal parameters (PD, PI and GI) and unfavorable cytokine levels were observed for these patients, such as IL-2, IL-1 β , TNF- α , IL-17, TGF- β and IL-10. **Practical implications:** This study indicates that patients with breast cancer should be treated periodontally before starting chemotherapy and that inflammatory marker can be reduced or modulated in a way that favors a less inflammatory pattern for the patient during and after treatment.

Introduction

Breast cancer is the second most common cancer in the world, and in women, it is the most common malignant neoplasm. This neoplasm has a low incidence before the age of 35 and after this age group, this index grows rapidly and progressively (National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva, 2014). In 2016, about 57,960 women were diagnosed with new cases of breast cancer in Brazil and worldwide, breast cancer kills more than 521,000 women per year (2016).

There are several therapeutic possibilities and among these modalities are oncologic surgery, radiotherapy, chemotherapy and hormonal therapy (Lopez-Galindo et al., 2006). Since chemotherapy is based on anthracyclines the conventional treatment for breast cancer (Hespanhol et al., 2010; Peterson and D'Ambrosio, 1992), these drugs are capable of affecting rapidly dividing cancer cells, thus preventing their proliferation (Napenas et al., 2010; Lopez-Galindo et al., 2006; Rahnama et al., 2015; Napenas et al., 2007). Consequently, tissues with a high rate of mitotic activity such as bone marrow, gastrointestinal tract, hair follicle and oral mucosa are highly affected (Torres et al., 2013).

Periodontitis is a complex and chronic inflammatory disease that affects the supporting tissues of the teeth, considered as one of the most important causes of tooth loss. The most common form of this disease is chronic periodontitis that is commonly observed in adults over 35 years of age (Oliver et al., 1998) and is conducted by complex dysbiotic microbiota (Deng and Szafranski, 2017). The oral microbiome is one of the most complex and dynamic microbial communities of the human body that can influence the immune system of the host and cause an imbalance in the healthy symbiotic community, resulting in a subsequent secretion of inflammatory markers that contribute to tissue destruction (Socransky and Haffajee, 1992; Lamont and Hajishengallis, 2015). In addition, periodontal disease is associated with other complex diseases including cancer (Fitzpatrick and Katz, 2010). Also,

there is evidence that periodontal conditions may worsen during chemotherapy (Torres et al., 2013; Epstein and Stevenson-Moore, 2001), since chemotherapy has a toxic effect on cells of the basal layer of the oral epithelium, causing dysfunction of epithelial cells and induction of apoptosis, resulting in thinning of the epithelium and insufficiency of mucosal regeneration (Sung, 1995).

It has been demonstrated that patients with breast cancer have increased levels of inflammatory markers such as interleukin (IL) -6, IL-1 β , tumor necrosis factor TNF- α , IL-17, TGF- β and IL-10 (Ryan et al., 2007; Jager et al., 2008; Ivanovic et al., 2003; Chen et al., 2013). In addition, other studies indicate that chemotherapy treatment may modify the levels of these cytokines, which may serve as a prognosis for antineoplastic treatment (Nicolini et al., 2006; Torres et al., 2013; Konig et al., 2016; Lukaszewicz et al., 2007; Ivanovic et al., 2006). The production of the proinflammatory cytokines is controlled by the nuclear factor kappa β (NF- $\kappa\beta$) which is a transcription factor that regulates the expression of several genes involving the innate and adaptive immune system (Lorusso and Ruegg, 2008). NF- $\kappa\beta$ deregulation results in the abnormal production of proinflammatory cytokines found in various chronic inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer (Feghali and Wright, 1997; Allavena et al., 2008).

Several past studies have reported increased levels of cytokines, including IL-2, IL-6, IL-1 β , IL-17, TNF- α , INF- γ in gingival crevicular fluid (GCF) of patients with periodontal disease (Zhao et al., 2011; Engebretson et al., 2002; Goutoudi et al., 2004), and these inflammatory markers may be reduced after basic periodontal treatment of scaling and root planning in association with control of supra gingival plaque, thus causing clinical improvements during periodontal conditions (Zhao et al., 2011; Liu et al., 2010; Goutoudi et al., 2004; Deas and Mealey, 2010). Thus, a considerable interest was focused on the potential

of the cytokines to serve as diagnostic or prognostic markers for periodontal disease activity and wound healing (Genco, 1992).

To the extent of our knowledge, there is no study with scientific of the reduction of the inflammatory profile after NSPT of periodontal patients with breast cancer undergoing chemotherapy. The authors hypothesized that cancer patients on chemotherapy have higher levels of pro-inflammatory cytokines and that periodontal treatment may help to modulate these cytokines.

In this context, the objective of the present study is to evaluate the effect of non-surgical periodontal therapy (NSPT) on the GCF cytokine profile of periodontally compromised and breast cancer patients and correlate to the clinical parameters before and after NSPT.

Material and Methods

Participant's selection

The study was performed between August 2015 and February 2017. This clinical study received the approval of the Ethics Committee that follows the Helsinki Declaration (Protocol 37030514.7.0000.5419). This study was registered at *ClinicalTrials.gov* (NCT03244943).

All patients were diagnosed with chronic periodontitis (P) in accordance with the clinical criteria stated in the consensus report of the World Workshop in Periodontitis (Armitage 1999). The inclusion criteria were: 1) a minimum of 20 teeth; 2) presence of six teeth with proximal sites presenting probing depth (PD) ≥ 5 mm and CAL ≥ 5 mm; 3) age ≥ 35 years. Assessment of the extent and severity alveolar bone loss was determined radiographically.

The exclusion criteria were: 1) scaling and root planning or antibiotic treatment in the previous 6 months; 2) systemic diseases that could affect the progression of periodontitis (e.g., diabetes, immunologic disorder); 3) long-term administration of anti-inflammatory medication; 6) smokers and former smokers; 7) pregnancy or lactation; 8) orthodontic therapy; 9) use of mouth rinses containing antimicrobials in the preceding 2 months; 9) extensive prosthetic involvement; 10) patients had previously received chemotherapy or radiotherapy; 11) patients with metastasis and/or patients with neoadjuvant chemotherapy.

All the patients with cancer were treated with adjuvant chemotherapy (epirubicin, cyclophosphamide, and docetaxel), eight cycles every 21 days.

Sample Size Calculation

The sample size was determined to provide 80% power to recognize a significant difference of 1 mm (d) between groups with a 95% confidence interval ($\alpha = 0.05$) and standard deviation (s) of 1.0 mm, considering the changes in mean of probing depth (PD) as the primary outcome variable and $[Z_a (1.96) + Z_b (0.84)]^2 = 7.84$. Size calculation was based on the following formula: $n = \{2[(s)^2/(d)^2]\} (Z_a + Z_b)^2$. Therefore, 16 patients were required. However, considering that some patients could drop off during follow-up, the number of patients enrolled per group in this study was 20.

Experimental Design and Periodontal Treatment

A total of forty patients (females, aged 35 to 70 years) were allocated into two groups – (P) chronic periodontitis patients (P) (n=20) and (CAN/P) chronic periodontitis patients with breast cancer (CAN/ P) (n=20). In each patient, four specific interproximal sites (two anterior teeth and two posterior teeth) presenting PD and CAL ≥ 5 mm were selected immunologic evaluations. After GCF collection and clinical measurements, all the patients received detailed

information on the etiology of periodontal disease and instructions on proper home-care techniques for an effective biofilm control including inter-dental cleaning with dental floss and inter-dental toothbrushes. In the initial sessions, patients also had plaque retentive factors as caries, excess of restorations and supragingival calculus removed.

The NSPT, which consisted of subgingival debridement - scaling and root planing (SRP) was conducted under local anesthesia. On average, the treatment of the entire oral cavity was completed within four sessions (sessions of 50 minutes). The SRP was performed using Gracey curettes (Hu-Friedy MFG. Co. Inc., Chicago, IL, USA), ultra-sonic devices (Bob-Cat Dentsply/Cavitron, Long Island City, NY, USA) and, if necessary, with multilaminate drills. After active treatment of SRP, all subjects were included in a maintenance program composed of professional supragingival plaque control and reinforcement of oral hygiene instructions monthly before chemotherapy cycles that were every 21 days during 6 months (180 days). The maintenance program also included an update of the medical and dental histories, extraoral and intra-oral soft tissue examination, dental examination and periodontal evaluation. All patients were monitored clinical and immunological parameters at baseline, 45 and 180 days after NSPT.

Examiner Calibration

The investigator charged with clinical assessments was calibrated for intra-examiner repeatability before the start of the trial. For the calibration, duplicate measurements for PD and CAL were collected from ten patients with chronic periodontitis who were not related to this study and presented at least two pairs of teeth with $PD \geq 5$ mm at proximal sites. This calibration was done with a 48-hour interval between the first and second recording. The intraclass correlation coefficients as a measure of intraexaminer reproducibility were 0.81 and 0.89 for mean PD, CAL, respectively.

Clinical parameters and gingival crevicular fluid collection (GCF)

At all visits, GCF was collected first and clinical parameters were then recorded.

Clinical Measurements

Clinical parameters were evaluated in all teeth, excluding third molars at baseline, at 45, and 180 days. The recorded parameters probing depth (PD), clinical attachment level (CAL) were measured in six sites per each tooth (mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual, mesiolingual), CAL was assessed from the cemento-enamel junction the base of the probable pocket. Dichotomous measurements Gingival index (GI) (Ainamo & Bay 1976) and plaque index (PI) (O'Leary et al. 1972) were measured at four sites per each tooth. GI was recorded based on the presence or absence of bleeding up to 30 seconds after probing and PI was used to assess the oral hygiene status, determined by the presence or absence of plaque at the gingival margin.

A computerized periodontal probe (Florida Probe, Gainesville, FL.) was used to perform the periodontal measurements. The patients were monitored for 180 days and all clinical measurements were taken by a single calibrated examiner (KRVV).

Collection of gingival crevicular fluid

The supragingival plaque of selected dental elements were removed and the sites were carefully air-dried, and subsequently isolated with sterile cotton rollers. GCF was collected from the deepest periodontal pocket, obtained from four specific interproximal sites (two anterior teeth and two posterior teeth), and three samples were collected from each site, each patient contributed with twelve samples, using filter paper strips (PerioPapers, Interstate Drug Exchange, Amityville, NY) for 30 seconds (Zhao et al., 2011). Strips contaminated by saliva

or blood were discarded and samples of each patient were transferred to Eppendorf tubes isolated with parafilm and stored at -80°C until further analysis.

Laboratory analysis

The amount of total protein of each sample was determined by conventional enzyme-linked immunosorbent assays, using commercially available kits (DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA.) The levels of the cytokines IL-4, IL-10, IL-17, IL-2, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and transforming growth factor- β (TGF- β) in GCF samples were determined using high-sensitivity kits (HSTCMAG-28SK Milliplex MAP Human High Sensitivity T cell, TGFBMAG-64K-01 Milliplex MAP TGF-B $_1$ Single Plex, Merck Millipore, Billerica, MA.) and the multiplexing instrument (MAGPIX analyzer, Luminex, Austin, TX) 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 software, Luminex).

Statistical analysis

Each parameter was computed per patient and then averaged across patients in both groups. The significance level was set at 5%. Data normality was assessed by Shapiro-Wilk test. The significance of differences between groups for age, PD, CAL PI, GI was determined using unpaired t test. Repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc tests were used to detect statistically significant differences (in PD, CAL, GI, PI) within each group (during the course of the study).

Total protein values were converted to picograms per milliliter. Final levels of the cytokines analyzed were obtained by dividing the values resulting from the initial multiplexing system by the total protein content in GCF samples (picograms per milligrams).

Data normality was assessed by Shapiro-Wilk test, differences within groups in all experimental periods for mean levels of IL-4, IL-10, IL-17, IL-2, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and TGF- β were assessed by the Friedman test, followed by Dunn post hoc and differences between groups were performed by the Mann-Whitney test.

The correlation between cytokine levels with clinical parameters for each moment (i.e. at baseline, 45, 180 days) were determined using Spearman's correlation. For all analysis, a specific software was used IBM® SPSS® (Statistical Package for Social Sciences) Statistics for Windows, version 20.0.

Results

A total of 200 women with breast cancer and 120 without cancer were assessed for eligibility, of which 280 were excluded because they did not meet the inclusion criteria (180 with breast cancer and 80 with no cancer, 20 failed to participate).

Most of the patients with breast cancer were excluded for having another type of systemic disease, lack of a minimum number of teeth (20 teeth), death, abandonment and breast cancer recurrence or metastasis. All 20 women with breast cancer had invasive ductal carcinoma and received anthracycline and taxane (epirubicin, cyclophosphamide and docetaxel) based on systemic treatment. Among them had 7 (35.3%) stage II tumors and 13 (64.7%) stage III tumors at the time of diagnosis. Furthermore, only patients diagnosed for the first time with breast cancer and that will undergo chemotherapy for the first time were enrolled.

The sample (40 patients) presented the following demographic characteristics: 1) mean $\pm$ standard deviation (SD) age 46.23 ± 2.30 years (P: 44.6 ± 5.97 years and CAN/P: 47.85 ± 9.10 years; $t_{38} = 1.301$, $p = 0.20$; no significant difference between groups). All patients were females (P: 13 were pre-menopausal; CAN/P: 7 were pre-menopausal) with a mean $\pm$ SD number of teeth 23.83 ± 3.64 .

Clinical Monitoring

Means and SDs of PD, CAL, GI and PI in periodontally compromised sites showed no significant differences between groups, at baseline. There was a significant reduction in PD for both groups at 45 and 180 days compared to baseline ($p < 0.05$). The P group presented a greater reduction in PD compared to the CAN/P group at 180 days ($p < 0.0492$). Both groups showed a gain in CAL on both analysed periods 45 and 180 days compared to the baseline. However, the P group showed a greater gain of CAL at 180 days compared to the CAN/P group ($p < 0.0261$) (Table 1).

PI and GI had a significant reduction in both groups at 45, and 180 days as compared to baseline ($p < 0.05$). Additionally the P group showed a greater reduction GI at 180 days as compared at 45 days and the CAN/P group showed a greater reduction PI at 180 days compared to 45 days. The P group had a greater reduction of the GI at 180 days compared to the CAN/P group ($p < 0.0038$) (Table 1).

Immunologic Monitoring

Different of what was observed on the clinical parameters, the cytokine profile was slightly different between groups. At the baseline, the P group had higher levels of INF- γ and low levels of IL-10 and TGF- β when compared to the CAN/P group (figures 1A, 1B and 1F). At 45 days, the CAN/P group had lower levels of TNF- α ($p < 0.0001$) compared to the P group (figure 1E). In 180 days, the P group had lower levels of INF- γ ($p < 0.001$), IL-2 ($p < 0.001$), TNF- α ($p < 0.0001$) (figures 1A, 1D, 1E), and higher levels of IL-10 ($p < 0.01$) and TGF- β ($p < 0.001$), compared to the CAN/P group (figures 1B and 1F).

After the NSPT, the CAN/P group showed a significant reduction of IL-2 at 45 and 180 days ($p < 0.05$) compared to baseline (figure 1D), TNF- α had a reduction at 45 days, when compared to baseline ($p < 0.0001$) (figure 1E). Also, there was a significant reduction of

TGF- β at 180 days when compared to the baseline ($p < 0.0001$) (figure 2F), while IL-1 β increased at 45 days when compared to baseline ($p < 0.05$) (figure 1C). The P group showed a significant reduction of INF- γ at 180 days when compared to baseline ($p < 0.0001$) and 45 days, ($p < 0.05$) (figure 2A). In the same manner, IL-2 and TNF- α had a reduction at 180 days when compared to baseline ($p < 0.0001$) and 45 days ($p < 0.0001$) (figures 1D, 1E). Likewise, there was an increase of TGF- β at 180 days when compared to the baseline ($p < 0.05$) and at 45 days ($p < 0.0001$) (Figure 1F). IL-17, IL-6 and IL-4 had no statistically significant differences between groups in all time points (figures 2A, 2B and 2C).

Correlation analysis between clinical parameters and levels of cytokines

In the CAN/P group, a significant positive correlation was found between PD and TNF- α levels ($r = 0.6489$, $p = 0.002$) at baseline. IL-17 was positively correlated with PD reduction ($r = 0.4596$, $p = 0.04$) at 180 days; also IL-6 was significantly positively correlated with PD reduction and CAL gain ($r = 0.4513$, $p = 0.05$, $r = 0.5578$, $p = 0.01$, respectively) at 180 days.

Regarding the correlations between PI, GI and cytokine levels, in the CAN/P group, TGF- β level was negatively correlated with PI ($r = -0.4611$, $p = 0.04$) at baseline. IL-6 was positively correlated with PI reduction ($r = 0.4699$, $p = 0.03$) at 45 days (table 2).

In the P group, IL-17 was also positively correlated with PD and CAL ($r = 0.4558$, $p = 0.04$, $r = 0.5447$, $p = 0.01$, respectively) at baseline. IL-1 β was positively correlated with PD reduction and CAL gain ($r = 0.5538$, $p = 0.01$, $r = 0.5902$, $p = 0.006$, respectively) at 45 days. A negative correlation was found between IL-4 and CAL gain ($r = -0.4981$, $p = 0.03$) at 180 days. Finally, IL-2 level was positively correlated with PI reduction ($r = 0.4535$, $p = 0.04$) at 180 days (table 2).

Discussion

The immune response is mediated by the release of cytokines involved in inflammatory reactions that are characteristic of periodontitis and cancer, as well. Cancer cells can produce cytokines that stimulate the growth and progression of the tumor and may induce the immune system to produce other cytokines (Kurzrock, 2001). Cancer patients undergoing chemotherapy may have elevated levels of circulating cytokines and cytokine receptors, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 in response to an immune challenge (Ryan et al., 2007; Konig et al., 2016; Jager et al., 2008), worsening pre-existing periodontal conditions (Epstein and Chow, 1999; Epstein and Stevenson-Moore, 2001; Raber-Durlacher et al., 2002). On the other hand, pre-existing periodontal conditions may provide an extra or different level of systemic cytokine compromising, even more, the patients and the treatment process. This study evaluated the effects of NSPT on the cytokine profile in the GCF of patients with chronic periodontitis and breast cancer undergoing chemotherapy.

In this study, the patients with only periodontitis had higher levels of INF- γ and low levels of IL-10, TGF- β , when compared to the group with cancer and periodontitis at baseline. This can be explained because INF- γ participates in the Th1 immune response that selectively inhibits proliferation of Th2 cells (Garlet, 2010; Kuru et al., 2004; Yucel-Lindberg et al., 1999; Gamonal et al., 2000). In addition INF- γ is the main cytokine activator of macrophages, producers of metabolites toxic to microorganisms and once the bacterial aggression is maintained and the consequent release of IFN- γ , there is persistence of inflammation (Dutzan et al., 2009b; Fu et al., 2013) and risk of progression of periodontal disease (Almaghlouth et al., 2014). Dutzan et al. (2009) found higher concentrations of IFN- γ in gingival tissue of active periodontal sites when compared to inactive sites.

The group of patients with cancer and periodontal disease, at the baseline, presented higher levels of IL-10, TGF- β and lower levels of INF- γ . These characteristics may be due to

the fact that these cytokines IL-10, TGF- β are often expressed in breast cancer cell lines (Schetter et al., 2010). TGF- β , like IL-10 are immunosuppressive and/or anti-inflammatory pleiotropic multifunctional cytokines but also act as central regulators in the proliferation and function of regulatory T cells (Tregs) (Lin and Karin, 2007). Genetic and epigenetic events occurring during mammary tumorigenesis typically inactivate the tumor suppressor activities of TGF- β , IL-10 and ultimately confer these cytokines with tumor promoting activities, including the ability to stimulate invasion of breast cancer, metastasis, angiogenesis and the evasion of the immune system (Taylor et al., 2011; Lin and Karin, 2007). Ivanovic et al (2003) found higher values of TGF- β in the plasma of patients with breast cancer, with stage IIIB/IV when compared with healthy donors. In our study, 13 patients (64.7%) had stage III tumors at the time of diagnosis. On the other hand, higher levels of TGF- β in patients with periodontitis may be due to an exaggerated immune response that appears as a molecular component associated with immunosuppression of the inflammatory response (Leite et al., 2015).

The CAN/P group had lower levels of TNF- α at 45 days compared to the P group. Lower levels of TNF- α may represent a stability of periodontal disease since the activity of this cytokine is associated with loss of insertion and bone resorption (Graves and Cochran, 2003). Turer et al. (2017) found a reduction of TNF- α after 6 weeks of NSPT in patients with generalized chronic periodontitis. The P group had lower levels of INF- γ , IL-2, TNF- α and higher levels of IL-10 and TGF- β at 180 days, compared to the CAN/P group. These results may be because IL-10 plays an important role in suppressing the inflammatory response, inhibiting the synthesis of the proinflammatory cytokines, suppressing innumerable activities of antigen presenting cells, inhibiting macrophages and activation of T cells (Gamonal et al., 2000). In addition, IL-10 is related to inhibition of bone resorption (Sasaki et al., 2000). TGF- β has the function of controlling exacerbated immune responses. Therefore, higher levels of

TGF- β in the GCF of patients with chronic periodontitis would occur not only as a way to modulate the inflammatory response but also to minimize the extent of the damaged tissue (Cardoso et al., 2008).

The results obtained after periodontal therapy on the CAN/P group showed a significant reduction of IL-2 at 45 and 180 days compared to the baseline, TNF- α reduction at 45 days when compared to baseline; additionally, there was a significant reduction of TGF- β at 180 days when compared to the baseline. Studies indicate that NSPT may reduce inflammatory markers in the blood and in the GCF, including IL-2 (Thunell et al., 2010), TNF- α (Turer et al., 2017) and TGF- β (Leite et al., 2015). There is also evidence of the effect of chemotherapy and its ability to alter immunological parameters. Tsavaris et al. (2002) evaluated the effect of chemotherapy treatment (paclitaxel and docetaxel) and its ability to alter immunological parameters in patients with breast cancer, observing that after the chemotherapy treatment there was a decrease in levels of IL-2, IL-1 β , TNF- α and PGE2 greater for the group that used docetaxel, compared to the group that used paclitaxel. Importantly, NSPT may have helped to decrease these harmful markers in these patients.

When the patients with only periodontal disease were evaluated after NSPT, a significant reduction of INF- γ , IL-2 and TNF- α at 180 days when compared to the baseline and at 45 days was observed. In addition, an increase of TGF- β at 180 days compared to the baseline and at 45 days could be noticed. Selective differentiation of T cells depended on cytokine levels, which would determine the predominance of pathological (Th1) or protective cells (Th2) (Cardoso et al., 2008; Garlet, 2010; Dutzan et al., 2012; Dutzan et al., 2009a). Thunell et al. (2010) found a reduction of IL-2 and INF- γ (Th1 cytokines) at different time intervals (6 and 8 weeks) of periodontal therapy. In another study, Dutzan et al. (2009) found higher concentrations of IL-10, TGF- β in the gingival tissue of inactive periodontal sites when

compared to active sites. In this context, higher levels of Th2/Tregs cells in patients with periodontitis could be related to the improvement of clinical periodontal health.

In the CAN/P group, a significant positive correlation was found between PD and TNF- α levels at baseline. Our findings are similar to the ones observed by Kurtis et al. (2005) and Zhang et al. (2016) found a positive correlation between TNF- α levels and PD in patients with chronic and aggressive periodontitis. In another study, a significant positive correlation was found between PD and TNF- α levels in the GCF of patients autoimmune disease with chronic periodontitis (Mayer et al., 2013). It was also observed that patients with autoimmune diseases have higher periodontal indices and higher levels of TNF- α in the GCF than healthy controls and that periodontal treatment seems to reverse this phenomenon.

After NSPT in the CAN/P group, reduction in IL-17 was positively correlated with PD reduction at 180 days. IL-17 is considered a very important pro-inflammatory cytokine, both in periodontal disease (Zhang et al., 2011; Fu et al., 2013) as in breast cancer (Chen et al., 2013). Likewise, IL-6 was significantly positively correlated with PD reduction and CAL gain at 180 days. Studies have shown that reduced levels of IL-17 and IL-6 after NSPT are correlated with an improvement of periodontal clinical parameters (Duarte et al., 2010; Fu et al., 2013; George and Janam, 2013). In the study of Zhou et al. (2013), they found a positive correlation between IL-6 and CAL gain in patients with chronic periodontitis with stable coronary heart disease, three months after periodontal treatment.

In the P group, IL-17 were positively correlated with PD and CAL at baseline. Awang et al. (2014) also found a positive correlation between IL-17 levels with PD, CAL and bleeding on probing, which indicates that this cytokine plays an important role in the pathogenesis of periodontal disease. IL-1 β was positively correlated with PD reduction and CAL gain at 45 days. Our results are consistent with those found by Tsai et al. (1995), Hou et al. (1995) and Chaudhari et al. (2011), suggesting that the amount of GCF IL-1 β is closely

associated with the periodontal state. This relationship may be valuable in monitoring the activity of periodontal disease. A negative correlation was found between IL-4 and CAL gain at 180 days. These results are similar to those found by Park et al. (2010) who found a negative correlation between IL-4 levels and alveolar bone height in patients with severe periodontitis.

In the CAN/P group, TGF- β level were negatively correlated with PI at baseline. On the other hand, after NSPT, IL-6 was positively correlated with PI reduction at 45 days. Zhou et al. (2013) and Zhang et al. (2016) showed a positive correlation in IL-6 levels with PI reduction after periodontal treatment. In the P group, IL-2 level was positively correlated with PI reduction at 180 days. This may be due to the fact that the plaque index is an important etiological factor of periodontitis, which may be part of the proof of the mechanism that links focal infection with systemic cytokine levels.

To our knowledge, this is the first study to investigate the effect of NSPT on the cytokine profile in breast cancer patients and chronic periodontitis submitted to chemotherapy. This study indicates that patients with breast cancer and periodontal disease should be periodontally treated before starting chemotherapeutic treatment - inflammatory markers can be reduced or modulated in a way that may favor a less inflammatory pattern in the oral environment, providing a more resistant periodontal tissue to acute reactions that , ultimately be of great risk during the period of chemotherapy.

Conclusion

In conclusion, we report that NSPT before chemotherapy favorably modulates the inflammatory cytokines locally and this may lead to a more favorable general systemic environment.

REFERENCES

2016. *BRAZIL. Ministry of Health. National Program of Breast Cancer Control. National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva* [Online]. Available: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama++.
- July 2014. *BRAZIL. Ministry of Health. National Program of Breast Cancer Control. National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva* [Online]. Available: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/conceito_magnitude [Accessed July 2014].
- Ainamo, J. & Bay, I. (1976). Periodontal indexes for and in practice. *Tandlaegebladet* **80**, 149-152.
- Allavena, P., Garlanda, C., Borrello, M. G., Sica, A. & Mantovani, A. (2008) Pathways connecting inflammation and cancer. *Current Opinion in Genetics Development* **18**, 3-10.
- Almaghlouth, A. A., Cionca, N., Cancela, J. A., Decaillet, F., Courvoisier, D. S., Giannopoulou, C. & Mombelli, A. (2014) Effect of periodontal treatment on peak serum levels of inflammatory markers. *Clinical Oral Investigation* **18**, 2113-2121.
- Armitage, G. C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.
- Cardoso, C. R., Garlet, G. P., Moreira, A. P., Junior, W. M., Rossi, M. A. & Silva, J. S. (2008) Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *Journal of Leukocyte Biology* **84**, 311-318.
- Chaudhari AU, Byakod GN, Waghmare PF, et al. (2011) Correlation of levels of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid to the clinical parameters of chronic periodontitis. *The Journal of Contemporary Dental Practice* **12**, 52-59.
- Chen WC, Lai YH, Chen HY, et al. (2013) Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology* **63**, 225-233.

- Deng ZL and Szafranski SP. (2017) Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *7*: 3703.
- Deas, D. E. & Mealey, B. L. (2010) Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontology 2000* **53**, 154-166.
- Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, et al. (2010) Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *Journal of Periodontology* **81**, 1056-1063.
- Dutzan N, Gamonal J, Silva A, et al. (2009a) 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. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 396-403.
- Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, et al. (2009b) Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **80**, 290-296.
- Engelbreton, S. P., Grbic, J. T., Singer, R. & Lamster, I. B. (2002) GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 48-53.
- Epstein, J. B. & Chow, A. W. (1999) Oral complications associated with immunosuppression and cancer therapies. *Infections Disease Clinics of North America* **13**, 901-923.
- Epstein, J. B. & Stevenson-Moore, P. (2001) Periodontal disease and periodontal management in patients with cancer. *Oral Oncology* **37**, 613-619.
- Feghali, C. A. & Wright, T. M. (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* **2**, d12-26.
- Fitzpatrick SG and Katz J. (2010) The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. *J Dent* **38**: 83-95.

- Fu, Q. Y., Zhang, L., Duan, L., Qian, S. Y. & Pang, H. X. (2013) Correlation of chronic periodontitis in tropical area and IFN-gamma, IL-10, IL-17 levels. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **6**, 489-492.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. & Silva, A. (2000) 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. *Journal of Periodontology* **71**, 1535-1545.
- Garlet, G. P. (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal Dental Research* **89**, 1349-1363.
- Genco, R. J. (1992) Host responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of Periodontology* **63**, 338-355.
- George AK and Janam P. (2013) The short-term effects of non-surgical periodontal therapy on the circulating levels of interleukin-6 and C-reactive protein in patients with chronic periodontitis. *Journal of Indian Society Periodontology* **17**, 36-41.
- Goutoudi, P., Diza, E. & Arvanitidou, M. (2004) Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of Dentistry* **32**, 511-520.
- Graves DT and Cochran D. (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* **74**, 391-401.
- Gumus P, Nizam N, Lappin DF, et al. (2014) Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor-alpha in patients with periodontitis. *Journal of Periodontology* **85**, 270-280.

- Hespanhol, F. L., Tinoco, E. M., Teixeira, H. G., Falabella, M. E. & Assis, N. M. (2010) Buccal manifestations in patients submitted to chemotherapy. *Ciencia & Saude Coletiva* **15** (Suppl 1), 1085-1094.
- Hou LT, Liu CM and Rossomando EF. (1995) Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology* **22**, 162-167.
- Ivanović, V., Demajo, M., Krtolica, K., Krajnović, M., Konstantinović, M., Baltić, V., Prtenjak, G., Stojiljković, B., Breberina, M., Nesković-Konstantinović, Z., Nikolić-Vukosavljević, D. & Dimitrijević, B. (2006) Elevated plasma TGF-beta1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients. *Clinica Chimica- Acta* **371**, 191-193.
- Ivanović, V., Todorović-Raković, N., Demajo, M., Nesković-Konstantinović, Z., Subota, V., Ivanisević-Milovanović, O. & Nikolić-Vukosavljević, D. (2003) Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. *European Journal of Cancer* **39**, 454-461.
- Jager, A., Sleijfer, S. & Van Der Rijt, C. C. (2008) The pathogenesis of cancer related fatigue: could increased activity of pro-inflammatory cytokines be the common denominator? *European Journal of Cancer* **44**, 175-181.
- Konig, A., Vilsmaier, T., Rack, B., Friese, K., Janni, W., Jeschke, U., Andergassen, U., Trapp, E., Juckstock, J., Jager, B., Alunni-Fabbroni, M., Friedl, T. & Weissenbacher, T. (2016) Determination of Interleukin-4, -5, -6, -8 and -13 in Serum of Patients with Breast Cancer Before Treatment and its Correlation to Circulating Tumor Cells. *Anticancer Research* **36**, 3123-3130.
- Kurtis B, Tuter G, Serdar M, et al. (2005) Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **76**, 1849-1855.

- Kuru, L., Griffiths, G. S., Petrie, A. & Olsen, I. 2004. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 527-533.
- Kurzrock, R. (2001) The role of cytokines in cancer-related fatigue. *Cancer* **92**, 1684-1688.
- Lamont RJ and Hajishengallis G. (2015) Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in molecular medicine* **21**, 172-183.
- Leite AC, Carneiro VM, Morandini AC, et al. (2015) Effects of periodontal therapy on white blood cell count and levels of transforming growth factor beta in serum of subjects with severe periodontitis. *Cellular and Molecular Biology (Journal noisy-le-grand)* **61**, 72-80.
- Lin WW & Karin M. (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal Clinical Investigation* 117: 1175-1183.
- Liu, Y. C., Lerner, U. H. & Teng, Y. T. (2010) Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000* **52**, 163-206.
- Lopez-Galindo, M. P., Bagan, J. V., Jimenez-Soriano, Y., Alpiste, F. & Camps, C. (2006) Clinical evaluation of dental and periodontal status in a group of oncological patients before chemotherapy. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* **11**, E17-21.
- Lorusso, G. & Ruegg, C. (2008) The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochemistry and Cell Biology* **130**, 1091-1103.
- Lukaszewicz, M., Mroczko, B. & Szmitkowski, M. (2007) Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. *Pol Arch Med Wewn* **117**, 247-251.
- Mayer Y, Elimelech R, Balbir-Gurman A, et al. (2013) Periodontal condition of patients with autoimmune diseases and the effect of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Journal of Periodontology* **84**, 136-142.

- Napenas, J. J., Brennan, M. T., Bahrani-Mougeot, F. K., Fox, P. C. & Lockhart, P. B. (2007) Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* **103**, 48-59.
- Napenas, J. J., Brennan, M. T., Coleman, S., Kent, M. L., Noll, J., Frenette, G., Nussbaum, M. L., Mougeot, J. L., Paster, B. J., Lockhart, P. B. & Bahrani-Mougeot, F. K. (2010) Molecular methodology to assess the impact of cancer chemotherapy on the oral bacterial flora: a pilot study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* **109**, 554-560.
- Nicolini, A., Carpi, A. & Rossi, G. (2006) Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Reviews* **17**, 325-337.
- Oliver, R. C., Brown, L. J. & Loe, H. (1998) Periodontal diseases in the United States population. *Journal of Periodontology* **69**, 269-278.
- Park CS, Lee JY, Kim SJ, et al. (2010) Identification of immunological parameters associated with the alveolar bone level in periodontal patients. *Journal of Periodontal & Implant Science* **40**, 61-68.
- Peterson DE and D'Ambrosio JA. (1992) Diagnosis and management of acute and chronic oral complications of nonsurgical cancer therapies. *Dental Clinics of North America* **36**, 945-966.
- Peterson, D. E. & D'ambrosio, J. A. (1992) Diagnosis and management of acute and chronic oral complications of nonsurgical cancer therapies. *Dental Clinics of North America* **36**, 945-966.
- Raber-Durlacher, J. E., Epstein, J. B., Raber, J., Van Dissel, J. T., Van Winkelhoff, A. J., Guiot, H. F. & Van Der Velden, U. (2002) Periodontal infection in cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *Support Care Cancer* **10**, 466-473.

- Rahnama, M., Madej-Czerwonka, B., Jastrzebska-Jamrogiewicz, I. & Jamrogiewicz, R. (2015) Analysis of the influence of parenteral cancer chemotherapy on the health condition of oral mucosa. *Contemporary Oncology (Pozn)* **19**, 77-82.
- Ryan, J. L., Carroll, J. K., Ryan, E. P., Mustian, K. M., Fiscella, K. & Morrow, G. R. (2007) Mechanisms of cancer-related fatigue. *Oncologist* **12** (Suppl 1), 22-34.
- Sasaki H, Hou L, Belani A, et al. (2000) IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *The Journal of Immunology* **165**, 3626-3630.
- Schetter, A. J., Heegaard, N. H. & Harris, C. C. (2010) Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* **31**, 37-49.
- Socransky SS and Haffajee AD. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of Periodontology* **63**, 322-331.
- Sung, E. (1995) Dental management of patients undergoing chemotherapy. *Journal of the California Dental Association* **23**, 55-59.
- Taylor, M. A., Lee, Y. H. & Schiemann, W. P. (2011) Role of TGF-beta and the tumor microenvironment during mammary tumorigenesis. *Gene Expression* **15**, 117-132.
- Thunell, D. H., Tymkiw, K. D., Johnson, G. K., Joly, S., Burnell, K. K., Cavanaugh, J. E., Brogden, K. A. & Guthmiller, J. M. (2010) A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *Journal of Periodontal Research* **45**, 148-152.
- Torres, M. A., Pace, T. W., Liu, T., Felger, J. C., Mister, D., Doho, G. H., Kohn, J. N., Barsevick, A. M., Long, Q. & Miller, A. H. (2013) Predictors of depression in breast cancer patients treated with radiation: role of prior chemotherapy and nuclear factor kappa B. *Cancer* **119**, 1951-1959.

- Tsai CC, Ho YP and Chen CC. (1995) Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *Journal of Periodontology* **66**, 852-859.
- Tsavaris, N., Kosmas, C., Vadiaka, M., Kanelopoulos, P. & Boulamatsis, D. (2002) Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *British Journal of Cancer* **87**, 21-27.
- Turer CC, Durmus D, Balli U, et al. (2017) Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid and Serum Endocan, Vascular Endothelial Growth Factor-A, and Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels. *Journal of Periodontology* **88**, 493-501.
- Yucel-Lindberg, T., Nilsson, S. & Modeer, T. (1999) Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1 β and tumor necrosis factor α in human gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research* **78**, 61-68.
- Zhang Q, Chen B, Zhu D, et al. (2016) Biomarker levels in gingival crevicular fluid of subjects with different periodontal conditions: A cross-sectional study. *Archives Oral Biology* **72**, 92-98.
- Zhao, L., Zhou, Y., Xu, Y., Sun, Y., Li, L. & Chen, W. (2011) Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 509-516.
- Zhang F, Tanaka H, Kawato T, et al. (2011) Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E2 in osteoblasts. *Biochimie* **93**: 296-305.
- Zhou SY, Duan XQ, Hu R, et al. (2013) Effect of non-surgical periodontal therapy on serum levels of TNF- α , IL-6 and C-reactive protein in periodontitis subjects with stable coronary heart disease. *Chinese Journal of Dental Research* **16**, 145-151.

Table 1. Mean and standard deviation of PD, CAL, GI, PI for P and CAN/P groups in the different experimental periods in periodontal pockets - intra and inter-group comparisons.

Experimental Groups (Mean±SD)				Intergroup Comparisons (unpaired t test)		
Variable	Time Point	P group (n=20)	CAN/P group (n=20)	Mean difference	95%CI	P
PD (mm)	Baseline	5.33±0.67	5.33±0.63	0.0000	-0.4191 to 0.4191	NS
	45 days	3.13±1.14*†	3.29±1.13*	-0.1625	-0.8905 to 0.5655	NS
	180 days	2.5±0.91*	3.16±1.14*	-0.6625	-1.323 to -0.00285	0.0492
CAL (mm)	Baseline	5.56±0.81	5.74±0.88	-0.1750	-0.7165 to 0.3665	NS
	45 days	3.86±1.51*	4.16±1.12*	-0.3000	-1.152 to 0.5518	NS
	180 days	3.34±1.42*	4.25±1.05*	-0.9125	-1.711 to 0.1143	0.0261
GI (%)	Baseline	59.85± 27.56	60.39±24.30	-1.435	-17.80 to 14.93	NS
	45 days	19.98±19.87*†	21.75±17.10*	-9.120	-19.50 to 1.2558	NS
	180 days	4.32±4.11*	12.10±10.50*	-2.994	-6.380 to 0.3933	0.0038
PI (%)	Baseline	59.45±25.50	60.89±25.60	-0.5400	-17.18 to 16.10	NS
	45 days	15.63±12.32*	24.75±19.32*†	-1.775	-13.65 to 10.10	NS
	180 days	3.79±3.13*	6.79±6.79*	-7.778	-12.89 to -2.670	NS

PD= Probing Depth; CAL= Clinical attachment Level, SD = standard deviation; IC = Confidence interval. Significant differences between groups (unpaired t-test). $p > 0.1$: not significant (NS); $p < 0.05$: significant; * significant difference when compared to the baseline value in the same group; † Significant difference 45 vs 180 days in the same group (Analysis of Variance for repeated measurements, Post hoc Bonferroni test)

Table 2. Relationship among clinical parameters and cytokine levels

Spearman rank correlation coefficient									
Clinical parameter	INF- γ	IL-10	IL-17	IL-1	IL-2	IL-4	IL-6	TNF- α	TGF- β
CAN/P group									
PD baseline	0.0994	0.1393	0.0818	0.0359	0.0818	0.1163	-0.1354	0.6489*	-0.0061
PD 45 days	-0.0181	0.0809	-0.2149	0.0590	0.1150	-0.1468	0.0454	-0.007	0.0802
PD 180 days	-0.0491	-0.1066	0.4596*	-0.0219	-0.2404	-0.1897	0.4513*	0.0876	-0.0136
CAL baseline	0.1514	0.0456	0.0989	-0.0281	0.0989	-0.0616	0.1514	-0.3812	0.1697
CAL 45 days	-0.0710	0.0763	-0.1716	0.1785	0.0552	-0.0226	0.1754	0.0423	0.3108
CAL 180 days	0.2290	0.2441	-0.2933	-0.2026	0.0423	0.1625	0.5578*	0.2411	0.1965
PI baseline	-0.0173	-0.3696	-0.2547	-0.3235	-0.2547	-0.3999	-0.1081	0.1111	-0.4611*
PI 45 days	0.4101	0.2936	0.0113	-0.0900	0.2906	0.2868	0.4699*	-0.3776	0.0688
PI 180 days	0.2036	0.4724	-0.1461	-0.2483	0.1802	0.2422	0.0697	0.1279	0.3702
GI baseline	-0.0467	-0.3853	-0.2205	-0.3898	-0.2205	-0.2333	0.2829	0.2310	-0.1663
GI 45 days	0.4016	0.2672	0.2832	0.0786	0.2359	0.2359	0.2283	-0.1031	0.1504
GI 180 days	0.1228	0.2977	0.3353	0.0286	0.3233	0.0686	-0.0821	0.3240	0.2434
Parâmetros clínicos									
Grupo PC									
PD baseline	-0.0228	0.1033	0.4558*	0.1147	-0.1686	0.0365	0.2476	0.0501	-0.0007
PD 45 days	0.2011	0.0105	-0.1821	0.5538*	0.0226	-0.2357	-0.1881	-0.1957	0.2652
PD 180 days	0.1042	-0.3025	-0.1134	0.0707	-0.0030	-0.3667	-0.2115	-0.0654	0.3545
CAL baseline	-0.0778	0.2613	0.5447*	0.1664	-0.2636	0.1194	0.2909	0.1428	-0.2226
CAL 45 days	0.2703	0.0241	-0.0996	0.5902*	0.1570	-0.0377	-0.2543	-0.2045	0.2332
CAL 180 days	0.1242	-0.3942	-0.2354	0.0787	0.0953	-0.4981*	-0.2619	-0.0242	0.4080
PI baseline	0.3437	-0.3692	0.0664	0.0461	0.3533	-0.4174	-0.1291	0.1321	-0.0694
PI 45 days	0.0577	0.1424	0.3661	-0.0758	0.0919	0.1085	0.3224	0.3842	-0.3051
PI 180 days	0.3302	-0.1410	0.3769	0.1659	0.4535*	-0.1123	-0.1274	0.1357	0.2450
GI baseline	-0.0105	-0.1461	0.2102	0.1838	0.0760	-0.0649	0.0610	-0.1785	-0.2644
GI 45 days	-0.0060	0.1265	0.1591	-0.0758	0.1523	0.0168	0.3326	0.3743	-0.3500
GI 180 days	0.3202	-0.2298	0.1431	0.1672	0.2072	-0.1665	0.0851	0.1989	0.4234

PD = Probing pocket depth, CAL= Clinical attachment

*Statistically significant

Figure legend

Figure 1. Boxplots with median and 95% confidence interval of INF- γ , IL-10, IL-1 β , IL-2, TNF- α , and TGF- β for the P group and CAN/P group at different time periods in periodontal pockets. (*) significant difference when compared to the baseline ($p < 0.05$), (†) significant difference 45 days versus 180 days ($p < 0.05$), (‡) significant difference between experimental groups at the same time of analysis ($p < 0.05$)

Figure 2. Boxplots with median and 95% confidence interval of IL-17, IL-6 and IL-4 for the P group and CAN/P group at different time periods in periodontal pockets. No statistically significant differences between groups and times of periods ($p > 0.05$).

ANEXO D: Artigo científico submetido para publicação no periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*

The impact of chemotherapeutic treatment on the oral microbiota of cancer patients - A systematic review

Kelly Rocio Vargas Villafuerte^a, Cristhiam de Jesus Hernandez Martinez^b, Felipe Torres Dantas^a, Helio Humberto Angotti Carrara^c, Francisco José Candido dos Reis^d, Daniela Bazan Palioto^e

^a PhD student, department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo- USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

^b MDS student, department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo- USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

^c Professor doctor, department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Brazil.

^d Associate professor, department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Brazil.

^e Associate professor, department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo- USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Daniela B. Palioto, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP. Avenida do Café, S / N, 14040-904 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Tel: (+55)16-33154136 Fax: (+55)16-33154788. Email: dpalioto@forp.usp.br

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest and no financial support for this article of review was required.

Abstract word count: 198, manuscript word count: 2163, Number of references: 60, number of figures: 01, number of tables: 05, number of supplementary elements: 0.

Abstract:

Objective: Chemotherapy is a type of systemic treatment that inhibits neoplastic cells (cancer), producing immunosuppression and may lead to changes in the oral mucosa, and consequently in the oral microbiota. The aim of this systematic review was to analyze, in the scientific literature, evidence of the impact of chemotherapy in the oral microbiota

Methods: The authors conducted a survey in the electronic databases PubMed / Medline, SCIELO, LILACS, Science Direct, Web of Science and Cochrane Library for studies that discuss the change of oral microbiota in cancer patients during chemotherapy. Articles published in English were included until July 2017. The quality of the study was assessed using the Ottawa-Newcastle scale.

Results: Of 5252 papers potentially relevant to this review, 17 studies were included in this study. Of these studies, fifteen studies used culture techniques and one of them used genetic-sequencing. The most frequently observed were aerobic gram negative (*Klebsiella spp*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas spp*), anaerobic gram-negative (*Veillonella spp*, *Capnocytophaga*) and Gram-positive bacteria (*Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*).

Conclusions: Patients with cancer during chemotherapy present a more complex oral microbiota under favorable conditions for their development during immunosuppression and these may be responsible for different serious local or systemic pathologies.

Keywords: Oral microbiota; Oral flora; Neoplasms; chemotherapy.

Introduction

Malignant neoplasms cause death worldwide, which can affect different organs and tissues of the human body, as well as individuals in varying age groups. The patients affected by these changes usually undergo some therapeutic modalities such as surgery, radiotherapy, hormone therapy and chemotherapy, acting alone or in combination. However, chemotherapy is, for the majority, the first-choice treatment, used in about 70% of the cases^{1,2}.

Often, the drugs used in chemotherapy induce side effects in the oral cavity that can cause important systemic complications³⁻⁵. Among these complications, we highlight the changes in biofilm composition, mucositis, and exacerbation or worsening of periodontal disease^{3, 6, 7}. Studies report⁸⁻¹⁰ that anaerobic bacteria such as *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) and *Prevotella intermedia* (Pi) associated with periodontal disease (PD) and periodontal abscess, are increased after two weeks of chemotherapy, leading to an imbalance in the buccal ecosystem^{10, 11}. However, other factors related to the host, such as smoking, diet, socioeconomic factors, could contribute to the patterns of oral microbial succession during chemotherapeutic treatment¹².

It is estimated that changes in the oral microbiota may account for about 25% to 50% of the cases of septicemia in cancer patients presenting neutropenia, with species of *streptococci* of the *viridans* group, most often isolated in blood cultures¹³.

Most of the bacterial do not cause damage in healthy conditions. Although, in patients with malignancies, the delicate homeostasis between host defense and commensal bacteria could be disturbed by the cancer itself, by the cancer-related secondary immunodeficiency, or by prophylactic antibacterial. The disrupted homeostasis might contribute to the oral mucosal tissue breakdown following chemotherapy. In addition, the chemotherapeutics can be bacteriostatic, thus affecting the oral bacterial community in these patients¹⁴. Several studies have identified oral mucositis as an independent risk factor for the development of bacteremia

and systemic infections, involving anaerobic bacteria and other species that are not normally found in the oral cavity¹⁵. The occurrence of bacteremia represents a threat to the life of these individuals, as it may result in increased morbidity and mortality^{8, 9, 12, 16}.

The objective of this work is to evaluate the changes in oral microbiota or oral flora (quantitative and qualitative) during chemotherapy in studies published up to this year. The following focused question was addressed: (1) "Is there evidence that cancer patients on chemotherapy, the oral microbiota is more complex or pathological"?

Methods

The text of the review was structured in accordance with PRISMA guidelines (Item for Preferential Reports for Systematic Evaluations and Meta-Analyzes).

Inclusion Criteria

Type of studies (1) Observational studies (i. e., case- control, and cohort or cross- sectional studies), only studies published in English were considered eligible for inclusion.

Participants/Population: Patients diagnosed with malignant cancer (hematological cancer or solid tumors) on the use of chemotherapy drugs.

Outcome measures: Primary measures are changes in the oral microbiota of Gram positive or Gram-negative bacteria.

Exclusion Criteria: (1) Studies evaluating oral complications during chemotherapy (i. e., mucositis); (2) studies using other types of neoplastic therapy (example: radiotherapy, chemoradiotherapy, hormone therapy); (3) studies evaluating the effects of antimicrobial and antibiotic treatment in patients with cancer; (4) Patients with other systemic diseases or autoimmune diseases.

Search Strategy: The search included all articles that were indexed in PubMed/Medline, SCIELO, LILACS, ScienceDirect, Web of Science, and Cochrane Library. We used the following search descriptors "oral flora" and "oral microbiota" each one combined with the terms "chemotherapy" OR "antineoplastic drugs" OR "neoplasms" OR "cancer". Were searched for articles published in English language up to July 2017.

Study selection: Two reviewers (K.R.V.V and C.H.M) screened independently titles and abstracts. The disagreements were resolved through discussion with a third reviewer (FTD). Studies that appeared to meet the inclusion criteria or those with insufficient information in the title and abstract to make a clear decision were selected for evaluation of the full report, which was independently performed by the same two reviewers in order to determine the eligibility of the study. The studies that met the inclusion criteria were submitted to validation and data extraction.

Data Extraction: The extracted relevant data from every study were: Name of author, year of publication, country, study design, characteristics of the participants, including type of cancer, type of cytotoxic drug, place of the sample, microbial technics, collection time, follow-up, bacteria isolated, sample size, outcome measures, authors' conclusions, and source of funding.

Quality assessment: Two authors (K.R.V.V. and C.H.M.) independently evaluated the quality of each study included using the Newcastle-Ottawa Quality assessment Scale (NOS)¹⁷, a quality score was calculated based on three major components: 1) quality of selection of study participants, 2) comparability, 3) exposure and outcome. With a maximum score of 9 points for case- control studies and with a maximum score of 10 points for cross- sectional studies. The quality of studies was divided into three categories: (1) high quality (total score: 7 to 9/10); (2) moderate quality (total score: 4 to 6); and (3) low quality (total score: 0 to 3).

Disagreements were resolved through bilateral discussion.

Results

Search results and excluded trials

A total of 5252 articles were identified by the database search strategy of which 2286 were excluded after removing duplicates. In total 2966 studies were screened, of these 2932 were excluded after review of the titles or abstracts. The full texts of the remaining 34 publications^{8, 14, 15, 18-47} were reviewed, and of these, 17 studies^{8, 12, 15, 18, 20, 28, 29, 32, 35-37, 40, 43, 45, 46, 48} were included, and 17^{14, 19, 21, 23, 25-27, 30, 31, 33, 38, 39, 42, 44, 49-51} were excluded for different reasons (10^{14, 19, 22, 23, 30, 31, 39, 41, 42, 51} for not fulfilling the proposed inclusion criteria and 7 articles were excluded because were from other languages Hungarian, Polish, German, Italian^{21, 25-27, 33, 38, 44}) (Fig 1).

From 17 studies included, 11 case-control^{8, 20, 28, 29, 34, 35, 40, 43, 45, 46, 48} studies and 6 cross sectional studies^{12, 15, 18, 32, 36, 37}.

Study characteristics

The characteristics of the study included are shown in Table 1. The studies were published between 1984 and 2016. Five studies were from the USA, two studies from Denmark, two studies from Scotland, two France, one Sweden, one Israel, one United Kingdom, one England, one Italy and one Poland.

Of the 17 studies included in this systematic review, nine studies were specifically on hematologic malignancies, three studies were specifically on solid tumors, two studies did not mention the type of malignancy, and three studies included solid tumors and hematologic malignancies. A total of 360 patients with different types of malignancies among them, 251 patients with hematological malignancies (acute non-lymphocytic leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia, lymphocytic leukemia, chronic myelogenous

leukemia and lymphoma) and 108 patients with different diagnosis of solid tumors (small cell lung cancer, testicular cancer, breast cancer, colon cancer, prostate cancer and cervical cancer).

Seventeen studies that evaluated the microbial changes of cancer patients during chemotherapy 16 studies were evaluated using culture methods and one of them used 16S rRNA gene sequences from 24 to 25 clones for each sample. The most common sample was saliva and supra and subgingival plaques. A considerable variation was observed between the studies in relation to collection time and number of samples. (Table 2 and 3).

Chemotherapeutic drugs used

Of the studies included twelve studies specified the chemotherapeutic drugs used and the other five^{12, 20, 34, 43, 46} did not specify. The chemotherapeutic used were: Cytosine arabinoside³⁶, aclarubicin⁵², cytarabine⁵², daunorubicin⁵³, vincristine, asparaginase⁵³, cyclophosphamide^{24, 28, 54},²⁹FRALLE 93 protocol, LAME 91 protocol⁸, epirubicin or methotrexate^{24, 28, 29}, 5-fluorouracil^{24, 29, 40, 55}, Docetaxel and oxaliplatin⁵⁵, adriamycin^{15, 29, 40}, cytoxan¹⁵, vinblastine⁴⁰, methotrexate⁴⁰, UMCC protocols³⁷.

Quality evaluation

Agreement on elements of quality scores was consistent between the 2 examiners. The mean quality score of two reviewers from 17 studies was 5.87 (moderate quality). Of the 11 case-control studies included in this SR, three studies received a score of 07 points out of a total of 9 points (high methodological quality); five received a score of 6 points and three received a score of 5 points (moderate quality). Of the six cross-sectional studies, quality, four studies received a score of 6 and two studies received a score of 5 (moderate quality) (Table 4 and 5).

DISCUSSION

Summary of the Main Results

Of the seventeen studies included in this systematic review, five studies were conducted in pediatric patients, who observed a higher proportion of gram-positive cocci (*S. viridans* and *S. mutans*) and gram-negative (*Capnocytophaga*) during chemotherapy. The other twelve studies were conducted in adult patients, the bacteria in largest proportion during chemotherapeutic treatment were aerobic gram-negative (*Klebsiella spp*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas spp*), gram-negative anaerobic (*Veillonella spp*.) and Gram-positive bacteria (*Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*).

Quality of the Evidence and Potential Biases in the Review Process

The heterogeneity of the studies, did not allow comparisons between the results, therefore, the meta-analyzes of these data may be questionable due to potential bias. This systematic review was based on non-interventional observational studies, where eleven studies were case-control and six cross-sectional studies, fourteen of them of moderate quality and three of high quality of evaluation. Which differed from the type of participants, cancer diagnosis, and type of chemotherapeutic drugs, sample site, collection and number of samples that may explain most of the discrepancies between the studies. In addition, case-control studies may have differed in terms of oral hygiene practices, socioeconomic status, or smoking habits.

Of the studies included in this systematic review, five studies were conducted in pediatric patients and twelve studies in adult patients. Of these, all pediatric patients^{8,28,34,35,43} were included in an oral hygiene program, which consisted of the instruction of brushing and use of chlorhexidine 0.2% from 1 to 4 times a day. One study⁴⁶ in adult patients used

chlorhexidine twice daily. The use of antiseptics, such as chlorhexidine, may help reduce plaque index, gingival index and reduce *Streptococcus mutans* counts in cancer patients⁵⁶.

In relation to the use of antibiotics and antifungal drugs, seven studies^{8, 18, 20, 32, 35, 43, 46} used antibiotics in combination of antifungal in cases of fever and suspected septicemia, one study²⁸ used antifungal drugs and another study³⁷ included the use of antibiotics in relation to the occurrence of acute periodontal infection. In general, 52.9% of cancer patients used antibiotics in combination of antifungal drugs; these drugs may have altered the microbial profile, which may be an important confounding factor.

Another important factor to be reported is evaluation of the oral cavity, where it was observed that only one study¹⁵ examined the presence or absence of caries, gingivitis and periodontitis before and during chemotherapy treatment. Two other studies^{18, 24} have conducted oral inspection for the presence of infections or diagnosis of acute candidiasis and presence of erythematous or pseudomembranous lesions.

Of the cross-sectional studies, three studies^{12, 36, 37} evaluated patients with cancer and periodontal disease, observing that patients with cancer and periodontal disease presented an increase of gram-negative bacteria (*Veillonella sp*, *Neisseria sp* and *Enteric basilli*) and gram-positive bacteria (*Staphylococcus* and *Streptococcus*) during chemotherapy treatment. Studies have shown that *Veillonella sp.*, are detected predominantly in individuals with poor oral hygiene⁵⁷, and influencing the development of gingivitis, caries and periodontitis⁵⁸. However, species such as *Neisseria* usually comprise part of the bacterial flora of the oropharynx^{59, 60}, although these may occasionally act as opportunistic pathogens causing multiple infections, which can lead to septicemia and lead to death⁶⁰.

In relation to the isolated bacteria, three studies^{8, 28, 35} in pediatric patients isolated gram positive, gram-negative bacteria, one study³⁴ specifically evaluated gram-positive bacteria, and another study⁴³ specifically evaluated gram-negative bacteria. In the study of O

'Sullivan et al³⁵ gram negative bacteria isolated were in only seven of the subjects, of which, three were isolated during the treatment phases, two during the stages of infection and two during the maintenance period. These results could be observed with caution due to the small number of patients investigated.

Two studies^{20, 32} in adult patients specifically isolated gram- negative bacteria. Of these, Galili et al²⁰, oral bacterial cultures were obtained during hospitalization, where a greater number of gram- negative aerobic bacteria *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp* was shown in the group of patients submitted to chemotherapy. The acquisition of these microorganisms in the nosocomial environment is an important factor to be questionable in relation to the other studies.

Another important bias factor is the lack of reports on the number of samples per patient, as well only one study that used methods that are more sensitive and fifteen studies were through microbiological techniques of culture in broth. Although evaluating the microbiome using genetic sequencing methods has sufficient sensitivity to find differences in the samples, the amount of the population has been greatly reduced.

Conclusion: Despite the limitations of the study it can be concluded: Cancer patients may present a more complex oral microbiota under favorable conditions for their development during immunosuppression and these may be responsible for different serious local or systemic pathologies.

References

1. Hespanhol FL, Tinoco EM, Teixeira HG, Falabella ME, Assis NM. [Buccal manifestations in patients submitted to chemotherapy]. *Cien Saude Colet*. 2010;15 Suppl 1:1085-1094.
2. Sonis ST, Fazio RC, Fang L. Principles and practice of oral medicine (In portuguese): Guanabara Koogan; 1996.
3. Singh N, Scully C, Joyston-Bechal S. Oral complications of cancer therapies: prevention and management. *Clin Oncol*. 1996;8:15-24.
4. Mealey BL. Periodontal implications: medically compromised patients. *Ann Periodontol*. 1996;1:256-321.
5. BRAZIL. Ministry of Health. National Program of Breast Cancer Control. National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva July 2014.
6. De Conno F, Ripamonti C, Sbanotto A, Ventafridda V. Issues in symptom control. Part 4. Oral complications in patients with advanced cancer. *J Pain Symptom Manage*. 1989;4:20-30.
7. Kroetz FM, Czulniak GD. Alterações bucais e condutas terapêuticas em pacientes infanto-juvenis submetidos a tratamentos anti-neoplásicos (Oral alterations in juvenile patients submitted to radiotherapy and chemotherapy). *Cien Biol Saude*. 2003;9.
8. Sixou JL, De Medeiros-Batista O, Gandemer V, Bonnaure-Mallet M. The effect of chemotherapy on the supragingival plaque of pediatric cancer patients. *Oral Oncol*. 1998;34:476-483.
9. Epstein JB, Chow AW. Oral complications associated with immunosuppression and cancer therapies. *Infect Dis Clin North Am*. 1999;13:901-923.
10. Stringer AM, Logan RM. The role of oral flora in the development of chemotherapy-induced oral mucositis. *J Oral Pathol Med*. 2015;44:81-87.

11. Meurman JH. Oral microbiota and cancer. *J Oral Microbiol.* 2010;2.
12. Reynolds MA, Minah GE, Peterson DE, et al. Periodontal disease and oral microbial successions during myelosuppressive cancer chemotherapy. *J Clin Periodontol.* 1989;16:185-189.
13. Ahmed R, Hassall T, Morland B, Gray J. Viridans streptococcus bacteremia in children on chemotherapy for cancer: an underestimated problem. *Pediatr Hematol Oncol.* 2003;20:439-444.
14. Napenas JJ, Brennan MT, Bahrani-Mougeot FK, Fox PC, Lockhart PB. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:48-59.
15. Napenas JJ, Brennan MT, Coleman S, et al. Molecular methodology to assess the impact of cancer chemotherapy on the oral bacterial flora: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109:554-560.
16. Vidal AM, Sarria JC, Kimbrough RC, 3rd, Keung YK. Anaerobic bacteremia in a neutropenic patient with oral mucositis. *Am J Med Sci.* 2000;319:189-190.
17. Wells G, Shea B. B; O'Connell, D.; et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of non randomized studies in meta-analysis 2014.
18. Bergmann OJ. Alterations in oral microflora and pathogenesis of acute oral infections during remission-induction therapy in patients with acute myeloid leukaemia. *Scand J Infect Dis.* 1991;23:355-366.
19. Bergmann OJ, Kilian M, Ellegaard J. Potentially pathogenic microorganisms in the oral cavity during febrile episodes in immunocompromised patients with haematologic malignancies. *Scand J Infect Dis.* 1989;21:43-51.
20. Galili D, Donitza A, Garfunkel A, Sela MN. Gram-negative enteric bacteria in the oral cavity of leukemia patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;74:459-462.

21. Gismondo MR, Romeo MA, Serra A, Arcidiacono A, La Mantia I. [Changes in aerobic bacterial flora in the oral cavity of subjects with neoplasms of the head and neck area undergoing antineoplastic therapy]. *G Bacteriol Virol Immunol*. 1982;75:383-389.
22. Galili D, Tagger N, Sela MN, Garfunkel AA. Surveillance of oral cultures for Enterobacteriaceae during bone marrow transplantation. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995;31:58-62.
23. Hu X, Zhang Q, Hua H, Chen F. Changes in the salivary microbiota of oral leukoplakia and oral cancer. *Oral Oncol*. 2016;56:e6-8.
24. Jensen SB, Mouridsen HT, Bergmann OJ, Reibel J, Brunner N, Nauntofte B. Oral mucosal lesions, microbial changes, and taste disturbances induced by adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106:217-226.
25. Knothe H. [Change of bacterial flora during chemotherapy (author's transl)]. *MMW, Munch Med Wochenschr*. 1976;118:521-524.
26. Krzeminski Z, Majda-Stanislawski E. [Quantitative changes of bacterial flora from the oral cavity and throat in children with acute lymphoblastic leukemia]. *Med Dosw Mikrobiol*. 1993;45:229-231.
27. Lelkes K. [Effect of chemotherapy on the gingival flora]. *Fogorv Sz*. 1976;69 Suppl:436-438.
28. Lucas VS, Beighton D, Roberts GJ. Changes in the oral streptococcal flora following irradiation/chemotherapy for bone marrow transplantation. *Adv Exp Med Biol*. 1997;418:185-187.
29. Main BE, Calman KC, Ferguson MM, et al. The effect of cytotoxic therapy on saliva and oral flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984;58:545-548.

-
30. Mantadakis E, Danilatou V, Christidou A, Stiakaki E, Kalmanti M. Capnocytophaga gingivalis bacteremia detected only on quantitative blood cultures in a child with leukemia. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22:202-204.
 31. Metgud R, Gupta K, Gupta J. Exploring bacterial flora in oral squamous cell carcinoma: a microbiological study. *Biotech Histochem*. 2014;89:153-159.
 32. Minah GE, Rednor JL, Peterson DE, Overholser CD, Depaola LG, Suzuki JB. Oral succession of gram-negative bacilli in myelosuppressed cancer patients. *J Clin Microbiol*. 1986;24:210-213.
 33. Nagy K, Sonkodi I, Kovacs A, Szoke I, Mari A, Nagy E. [Microbial study of the surface of malignant tumors of the oral cavity]. *Fogorv Sz*. 1998;91:281-284.
 34. Olszewska K, Mielnik-Blaszczak M. An Assessment of the Number of Cariogenic Bacteria in the Saliva of Children with Chemotherapy-Induced Neutropenia. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25:11-19.
 35. O'Sullivan EA, Duggal MS, Bailey CC, Curzon ME, Hart P. Changes in the oral microflora during cytotoxic chemotherapy in children being treated for acute leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993;76:161-168.
 36. Peterson DE, Minah GE, Reynolds MA, et al. Effect of granulocytopenia on oral microbial relationships in patients with acute leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990;70:720-723.
 37. Peterson DE, Minah GE, Overholser CD, et al. Microbiology of acute periodontal infection in myelosuppressed cancer patients. *J Clin Oncol*. 1987;5:1461-1468.
 38. Pompei R, Ingianni A, Cagetti MG, Rizzo A, Cotti S. Evaluation of the opportunistic microbial flora and of some antimicrobial factors in the oral cavity of leukaemic patients. *Microbios*. 1993;75:149-157.

-
39. Rice DH, Weimert TA. Altered bacterial flora and clinical course with intraoral cancer. *Laryngoscope*. 1978;88:1861-1863.
 40. Samaranayake LP, Calman KC, Ferguson MM, et al. The oral carriage of yeasts and coliforms in patients on cytotoxic therapy. *J Oral Pathol*. 1984;13:390-393.
 41. Schmidt BL, Kuczynski J, Bhattacharya A, et al. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PloS one*. 2014;9:e98741.
 42. Sixou JL, de Medeiros-Batista O, Bonnaure-Mallet M. Modifications of the microflora of the oral cavity arising during immunosuppressive chemotherapy. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996;32B:306-310.
 43. Sixou JL, Aubry-Leuliette A, De Medeiros-Battista O, et al. Capnocytophaga in the dental plaque of immunocompromised children with cancer. *Int J Paediatr Dent*. 2006;16:75-80.
 44. Torino M. [Relations between oral flora and drug therapy]. *Arch Stomatol*. 1989;30:869-893.
 45. Vozza I, Caldarazzo V, Ottolenghi L. Changes in microflora in dental plaque from cancer patients undergoing chemotherapy and the relationship of these changes with mucositis: A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20:e259-266.
 46. Wahlin YB, Granstrom S, Persson S, Sjostrom M. Multivariate Study of Enterobacteria and Pseudomonas in Saliva of Patients with Acute-Leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1991;72:300-308.
 47. Wang Y, Xue J, Zhou X, et al. Oral microbiota distinguishes acute lymphoblastic leukemia pediatric hosts from healthy populations. *PloS one*. 2014;9:e102116.
 48. Jensen ML, Thymann T, Cilieborg MS, et al. Antibiotics modulate intestinal immunity and prevent necrotizing enterocolitis in preterm neonatal piglets. *Am J Physiol. Gastrointest Liver Physiol*. 2014;306:G59-71.

49. Galili D, Tagger N, Sela MN, Garfunkel AA. Surveillance of Oral Cultures for Enterobacteriaceae during Bone-Marrow Transplantation. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995;31B:58-62.
50. Schmidt BL, Kuczynski J, Bhattacharya A, et al. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PloS one.* 2014;9:e98741-e98741.
51. Wang Y, Xue J, Zhou XD, et al. Oral Microbiota Distinguishes Acute Lymphoblastic Leukemia Pediatric Hosts from Healthy Populations. *PloS one.* 2014;9.
52. Bergmann OJ. Alterations in oral microflora and pathogenesis of acute oral infections during remission-induction therapy in patients with acute myeloid leukaemia. *Scand J Infect Dis.* 1991;23:355-366.
53. O'Sullivan EA, Duggal M, Bailey C, Curzon M, Hart P. Changes in the oral microflora during cytotoxic chemotherapy in children being treated for acute leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol..* 1993;76:161-168.
54. Lucas KG, Brown AE, Armstrong D, Chapman D, Heller G. The identification of febrile, neutropenic children with neoplastic disease at low risk for bacteremia and complications of sepsis. *Cancer.* 1996;77:791-798.
55. Voza I, Caldarazzo V, Ottolenghi L. Changes in microflora in dental plaque from cancer patients undergoing chemotherapy and the relationship of these changes with mucositis: A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20:e259.
56. Meurman JH, Laine P, Murtomaa H, et al. Effect of antiseptic mouthwashes on some clinical and microbiological findings in the mouths of lymphoma patients receiving cytostatic drugs. *J Clin Periodontol.* 1991;18:587-591.
57. Mashima I, Theodorea CF, Thaweboon B, Thaweboon S, Nakazawa F. Identification of Veillonella Species in the Tongue Biofilm by Using a Novel One-Step Polymerase Chain Reaction Method. *PloS one.* 2016;11:e0157516.

58. Al-Ahmad A, Wunder A, Ausschill TM, et al. The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol.* 2007;56:681-687.
59. Liu G, Tang CM, Exley RM. Non-pathogenic *Neisseria*: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. *Microbiology.* 2015;161:1297-1312.
60. Johnson A. The pathogenic potential of commensal species of *Neisseria*. *J Clin Pathol.* 1983;36:213-223.

Figure legends

Fig 1. The flow chart of study

Table legends

Table 1. Characteristics of included studies.

Table 2. Children participants, type of cancer, samples, microbial technics, collection time, bacteria isolated and main results.

Table 3. Adult participants, type of cancer, samples, microbial technics, collection time, bacteria isolated and outcome measures.

Table 4. Quality ratings for the case-control studies included on the basis of Newcastle-Ottawa quality assessment scale (n=10).

Table 5. Quality ratings for the cross- sectional studies included on the basis of Newcastle-Ottawa quality assessment scale (n=06)

Table 1: Characteristics of included studies

<i>Study</i>	<i>Country</i>	<i>Study design</i>	<i>Follow- up</i>	<i>Sample Size (baseline)</i>	<i>Source of Funding</i>
Main et al. 1984	Scotland	Case-control	12 week	N=58 (24 male and 34 female) Age Range: Not mentioned Mean age of the test group: 49 years Mean age of the control group: 25 years	Not mentioned
Samaranayake et al. 1984	Scotland	Case-control	3 months	N=40(17 males and 23 female) Age Range: 17-68 years Mean age of the test group:50 years Mean age of the control group:46 years	Not mentioned
Minah et al. 1986	EE.UU	Cross-sectional	14 days	N=17 (not mentioned) Age range: Not mentioned Mean age 49.4 years	Supported by Public Health Service grants RO1 DE 06516 and DE 07204 from the National Institute of Dental Research
Peterson et al. 1987	EE.UU	Cross-sectional	14 days	N= 24 (10 males and 14 female) Mean age for the leukemic patients: 44.8± 15.5 years, and for solid tumors patients: 43.9± 11.0 years	Supported by National Institutes of Health Grants No. DE- 06516, DE-07204, and 1-P50-CA-32107-03.
Reynolds et al. 1989	EE.UU	Cross-sectional	14 days	N=21 (7 males and 14 females) Age range: 25-81 years Mean age: 51.0± 2.4 years	Not mentioned

Peterson et al. 1990	EE.UU	Cross-sectional	14 days	21 (7 men, 14 women) Age Range: 25-81 years Mean age: 51 years	Supported by national Institute for Dental Research grants DE06516, DE07204, DE07279.
Bergmann 1991	Denmark	Cross-sectional	13 months	10 (4 men, 6 women) Age Range: 31- 66 years Mean age: 41 years	Supported by the Danish Medical Council and grants from the Cancer Society- Denmark
Wahlin et al. 1991	Sweden	Case - control	21 days	N=112(48 males and 64 females) Age-range: 7-78 years Mean age of the test group:42 years Mean age of the control group: 39years	Supported by grants from the Swedish Dental Society and the Faculty of Odontology, University of Umeå
Galili et al. 1992	Israel	Case control	14 days	N= 28 (10 male and 18 female) Age Range 13- 55 years (mean not mentioned)	Not mentioned
O'Sullivan et al.1993	United Kingdom	Case control	12 months	N= 52 children test (20 male, 14 female) Control (not shown) Age Range 2 -14 years Median age: 5.28 years; 41% were under the age of 4 years	Supported by the child and dental health division of the pediatric department and oncology.
Lucas et al. 1997	England	Case control	125 days	N= 40 Age Range: not mentioned Mean age: 8.4 years	Supported by the charity of Jules Phorme
Sixou et al. 1998	France	Case control	21 days	N = 32 Age Range: not mentioned Mean age: 3±16 years.	Support by Langlois foundation for the fight against cancer.

Sixou et al. 2006	France	Case control	21 days	N= 78 children (xx male, 14 xx female) Age Range 3 -15 years Median age of the test group: 8.8±3.9 years Median age of the control group: 8.2± 3.7 years	Support by Langlois foundation for the fight against cancer. .
Jensen et al. 2008	Denmark	Case control	12 mouths	N=76 Age Range: 28-69 Mean age of test group:45 Mean age of control group: 54 .	Supported by Denmark Cancer Society and Denmark Medical Council
Ńapenas et al. 2010	EE.UU	Cross- sectional	14 days	09 (All women) Mean age of 53.3 years (age range: Not shown)	Supported by grant from Charlotte- Mecklenburg- Foundation of health services
Vozza et al. 2015	Italy	Case control	07 days	N= 30 (16 male and 14 female) Age Range: 32- 59 years Mean age not mentioned	Supported by the University of Rome
Olszewska et al 2016	Poland	Case control	21 days	N=52(30 male and 22 female) Age Range: 3-18 years Mean age of the test group: 7.83 ± 3.86 years Mean age of control group: 8.19 ± 4.04 years	Not mentioned

Table 2: Children participants, type of cancer, samples, microbial technics, collection time, bacteria isolated and main results.

<i>Study</i>	<i>Participants</i>	<i>Type of cancer</i>	<i>Place of the samples</i>	<i>Microbial technics</i>	<i>Collection time</i>	<i>Bactéria isolated</i>	<i>Outcome measures of interest for the review</i>
O'Sullivan et al. 1993	Test group: N baseline= 34 N end of trial=33 Control group: N baseline =18 N end of trial=18	Acute myeloid leukemia=4 Acute lymphocytic leukemia= 30	Saliva	Culture	Before treatment commenced and then at monthly intervals, for 6 months and 1 year	<i>Acinetobacter junii</i> , <i>gram-negative bacillus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pasteurella haemolytica</i> . <i>Gram negative rods (unspecific)</i> <i>S. viridans</i> <i>S mutans</i> <i>Neisseria</i> <i>S. epidermis</i> <i>Micrococci</i> <i>Staphylococci</i> <i>Haemophilus</i> <i>Other Streptococci</i> <i>Gram-positive cocci</i> <i>Diphtheroid</i> <i>Bacillus alvei</i>	They observed that the levels of <i>S. mutans</i> during chemotherapy are lowered as compared with pre- or posttreatment levels and that despite increased carbohydrate intake; caries risk may well not be increased. There is no significant increase in the presence of gram-negative bacteria, <i>S. viridans</i> , <i>Haemophilus</i> , and <i>Candida</i> , which are known to cause serious systemic infection in immunocompromised children.
Lucas et al. 1997	Test group: N baseline =20 N end of trial=14 Control group: N baseline= 20 N end of trial=20	Leukemia=18 Immunological disorders=2	Saliva	Culture	Baseline and 7 days post-transplantation when the number of neutrophils are increased above $0.5 \times 10^9/l$ and 110-130 days after transplantation	<i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. vestibularis</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. parasanguis</i> <i>S. mutans</i> <i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. Intermedius</i> <i>Aerobic count</i> <i>Anaerobic count</i>	No difference in total anaerobic and aerobic counts between baseline and 119 days after transplantation, but their proportion significantly increased. Although the persistence of <i>S. oralis</i> group of the <i>viridans streptococci</i> is one of the most important results, as it is this particular group of the oral streptococci which are associated with some bacteraemias.
Sixou et al. 1998	Test group: N baseline=16 N end of trial=16	Acute lymphoid leukemia= 10 Acute myeloid	Supragingival plaque	Culture	First week of treatment (D1±D7), second week of treatment	<i>Capnocytophaga sp.</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Actinobacillus</i>	Patients with cancer had greater quantitative variations, with greater increases on days 14 and 21. The predominant bacteria were <i>Streptococcus</i>

	Control group: N baseline=16 N end of trial=13	leukemia=3, Lymphoma =3			(D8±D14) and third week of treatment (D15±D21).	<i>Actinomycetemocomitans</i> <i>Porphyromonas spp.</i> <i>Prevotella.Haemophilus aphrophilus</i> <i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Viridans streptococci</i>	<i>Viridans</i> , <i>Capnocytophaga</i> , and <i>Staphylococci</i> . Suggesting that different mechanisms occur during chemotherapy such as: uncontrolled recolonization of plaque and selection of multiresistant strains.
Sixou et al. 2006	Test group: N baseline=48 N end of trial=31 Control group: N baseline=30 N end of trial=30	Acute lymphoid leukemia =16 Acute myeloid leukemia =4 Lymphoma= 3 were the most common cancers. Other types of cancer were not mentioned.	Supragingival plaque	Culture	Day 0, after 1 week (day 7), 2 week (day 14), and 3 week (day 21).	<i>Capnocytophaga</i>	The prevalence of <i>Capnocytophaga</i> in dental plaque was identical in healthy patients and patients with cancer previously to immunosuppressive chemotherapy. It drops significantly in patients with neutropenic cancer after 2 to 3 weeks of immunosuppressive chemotherapy. These results show that the growth of this opportunistic pathogen is not favoured in neutropenic patients during a course of immunosuppressive chemotherapy.
Olszewska et al 2016	Test Group: N baseline=52 N end of trial=52 Control Group; N baseline=52 N end of trial=52	Hematologic neoplasms =37 and patients with solid tumors= 15	Saliva	Culture	Within the first 7 days of the chemotherapy cycle (T1), 7–21 days (T2), and 21–30 days from the start of chemotherapy (T3).	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Lactobacillus spp</i>	Significant increase in the number of bacteria <i>Streptococcus mutans</i> and <i>Lactobacillus spp</i> during episodes of neutropenia, frequently observed between day 7 and day 21 of the course of chemotherapy.

Table 3: Adult participants, type of cancer, samples, microbial technics, collection time, bacteria isolated and outcome measures.

<i>Study</i>	<i>Participants</i>	<i>Type of cancer diagnoses</i>	<i>Place of the samples</i>	<i>Microbial technics</i>	<i>Collection time</i>	<i>Bactéria isolated</i>	<i>Outcome measures of interest for the review</i>
Main et al. 1984	Test group: N baseline=38 N end of trial=38 Control group: N baseline= 20 N end of trial=20	Malignant tumors (Does not mention cancer site)	Saliva	Culture	Baseline, 4 weeks and 12 weeks	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella sp</i> <i>Candida spp</i>	The oral carriage rate of <i>Candida</i> increased from 70% to 80% during cytotoxic therapy. The carriage of <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , and such coliforms as <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella species</i> increased during cytotoxic therapy as compared with the control population. So a decrease in salivary flow was also observed in patients with cancer.
Samaranayake et al. 1984	Test group: N baseline=20 N end of trial=20 Control group: N baseline= 20 N end of trial=20	Malignant tumors (Does not mention cancer site)	Saliva	Culture	Baseline, one month and 3 months	<i>C. albicans</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C glabrata</i> <i>C. krtiseii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloaceae</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Proteus niirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia liquifaciens</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	A quantitative increase in the intra-oral carriage of <i>Candida species</i> and coliforms was observed during cytotoxic therapy. The most frequent yeast and the coliform isolated were <i>Candida albicans</i> and <i>Escherichia coli</i> , respectively.

Minah et al. 1986	N baseline=17 N end of trial=17	Acute non-lymphocytic leukemia = 9 and small-cell carcinoma of the lung = 8.	Oral rinse, Subgingival plaque, Supragingival plaque	Culture	Baseline and 14 days	<i>Pseudomonas pickettii</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas maltophilia</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Alcaligenes sp.</i>	Gram-negative bacilli (GNB) concentrations increased sharply during chemotherapy at 25 to 50% of the oral sites in both ANLL and SCC. Low levels of indigenous microflora were observed in most sites exhibiting GNB shifts. Although <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> were recovered from some sites, most GNB were nonpathogenic species of <i>Pseudomonas</i> ; <i>Pseudomonas pickettii</i> was the most frequently recovered.
Peterson et al. 1987	N baseline=24 N end of trial=24	Acute non-lymphocytic leukemia = 11 Acute lymphocytic leukemia = 2 Solid tumor = 11 (2 sarcoma, 2 small-cell carcinoma of the lung, 3 lymphoma, 2 testicular, and 2 breast carcinoma) with preexistent periodontal disease	Subgingival plaque	Culture	Baseline and 14 days	<i>Gram-negative bacilli</i> <i>Actinomyces sp</i> <i>Fusobacterium sp.</i> <i>Bacteroides sp.</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Staphylococcus sp</i> <i>P aeruginosa</i> <i>Neisseria sp</i> <i>Veillonella sp</i> <i>S. mutans</i> <i>Candida sp</i> <i>S epidermidis</i> <i>Bacteroides sp</i> Other gram-negative bacilli	Pathogens normally associated with infections in myelosuppressed cancer patients (<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>S aureus</i> , and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> predominated), as well as indigenous oral flora (<i>Veillonella sp</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Bacteroides sp</i>), are associated with acute periodontal infections during granulocytopenia.

Reynolds et al. 1989	N baseline= 21 N end of trial= 21	Acute non lymphocytic leukemia =21	Supra and subgingival plaque	Culture	Day 1 and day 14 (mid-chemotherapy)	<i>Enteric bacilli</i> <i>Staphylococcus sp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Black- pigmented Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus sp</i> <i>Neisseria sp</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Veillonella sp</i>	<i>Veillonella sp</i> recovered from supra and subgingival specimens in the highest proportion (15.5-23.22%) before and during chemotherapy. Subgingival plaque specimens showed proportional elevations at midchemotherapy in gram-negative <i>enteric bacilli</i> , <i>lactobacillus sp.</i> , <i>staphylococcus sp.</i> , and total yeast. Periodontal disease status and attachment loss were positively correlated with increases in the proportional recovery of <i>staphylococcus sp</i> from supragingival sites and total yeast from supra and subgingival sites.
Peterson et al. 1990	N baseline= 21 N end of trial= 21	Acute non-lymphocytic leukemia =21 with periodontal disease.	Supra and subgingival plaque Oral rinse	Culture	Baseline and day 14 (mid-chemotherapy)	<i>Neisseria sp.</i> <i>Gram negative: Enteric bacilli</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Veillonella sp.</i> <i>P. aeruginosa</i>	Higher amount of <i>Staphylococcus sp.</i> at supragingival sites after 14 days of chemotherapy treatment (midchemotherapy). Levels of total yeast were correlated positively with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> at subgingival sites both pre-chemotherapy and 14 days after chemotherapy (midchemotherapy). Significant correlations of <i>Veillonella sp.</i> with <i>Neisseria sp.</i> and Gram-negative <i>Enteric bacilli</i> were observed in both supragingival and subgingival plaque specimens' midchemotherapy.
Bergman 1991	N baseline=10 N end of trial=9	Acute myeloid leukemia=10	Saliva	Culture	Days 0, 1, 2, 4, 7, 14, 21 and 28	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterococcus. faecalis</i> <i>Moraxella sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Actinomyces sp.</i> <i>Micrococcaceae</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>S. aureus</i> <i>Neisseria sp.</i>	During antineoplastic treatment, the concentration of microorganisms in saliva doubled from day 0 to day 2, presumably because of a concurrent 64% decrease in the salivary flow rate. No changes in the relative proportion of individual microorganisms or acquisition of new microorganisms occurred during antineoplastic treatment.

Wahlin et al.1991	Test group: N end of trial=24 Control group: N end of trial=83	Acute myelogenous leukemia=20 and acute lymphoblastic leukemia=9	Saliva	Culture	Baseline, once during each Intervals 1 to 3, days 4 to 6 days 7 to 10, days 11 to 15 and 16 to 21 days during the first treatment period.	<i>K. oxytoca</i> <i>K. pneumonia</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. agglomerans</i> <i>E. sakazaki</i> <i>Citrobacter sp.</i> <i>E. coli</i> <i>H. alvei</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. maltophilia</i> <i>A. calcoaceticus</i> <i>Aeromonas hydrophilia</i>	Of the patients with leukemia, almost 45% harbored gram-negative rods. Of healthy patients, 12% contained gram-negative rods. 51% contained 104 or more bacteria per milliliter of saliva. The most frequent gram-negative rods were <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> and <i>Pseudomonas species</i> . Only one patient harbored an <i>Aeruginosa</i> clone, while <i>P. maltophilia</i> was found in three of the patients.
Galili et al. 1992	Test group: N baseline= 16 N end of trial=16 Control group: N baseline= 12 N end of trial=12	Chronic myeloid leukemia =3, acute myelocytic leukemia =8, and acute lymphatic leukemia =5	Mucosa of the gingiva, palate, tongue, and cheeks.	Culture	Twice a weekly (14 days) hospitalization	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Klebsiella</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i> <i>Klebsiella species.</i> <i>Enterobacter</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. aerogenes</i> <i>Pseudomonas</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. species</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Acinetobacter species.</i>	Positive oral <i>Enterobacteriaceae</i> cultures were found in 15 of the 16 patients with leukemia (93.7%). Of 98 samples taken from all patients, 61 grew strains of enteric bacteria (62.2%). On the other hand, only 3 of the 16 hospitalized control subjects grew enteric bacteria (18.75%). The predominant bacteria were strains of <i>Klebsiella</i> (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , 29.5%, <i>Klebsiella sp.</i> , 12.2%, <i>Klebsiella oxytoca</i> , 1.0%), followed by enterobacter (<i>Enterobacter cloacae</i> , 15.7%, <i>Enterobacter aerogenes</i> , 3.1%, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 13.5%, <i>Pseudomonas sp.</i> , 2.1%), <i>Escherichia coli</i> (10.5%) and <i>Citrobacterfreundii</i> (8.4%)
Jensen et al. 2008	Test group: N baseline= 45 N end of trial=44 Control group: N baseline=31 N end of trial=31	Breast cancer=45	Saliva	Culture	Baseline, During chemotherapy (C) (in the second/third week after the sixth cycle of C), at 6 months and 1 year after C.	<i>S. mutans.</i> <i>Lactobacilli</i>	Qualitative changes in 45 patients with breast cancer and identified that the cancer patients had a more cariogenic oral microbiota (<i>Streptococcus mutans</i> and <i>Lactobacillus</i>), and a high index of plaque with greater inflammation when compared to the control group who did not receive chemotherapy.

Napenas et al. 2010	N baseline=9 N end of trial=9	Breast cancer =9	Buccal mucosa	The 16S ribosomal RNA (rRNA) gene	Baseline and 7 to 14 days later chemotherapy	A 16S rRNA gene clone library of 24 to 25 clones was constructed for each sample	From pre- and post-chemotherapy samples, 41 species were detected, with a predominance of <i>Gemella</i> and <i>Streptococcus</i> , most notably <i>G.</i> <i>haemolysans</i> and <i>S. mitis</i> , found in 66 and 173 clones, respectively. More than 85% of species have not been previously identified in chemotherapy patients. seven species (17%) appeared exclusively before chemotherapy, 25 (61%) exclusively after chemotherapy, and 9 (22%) both before and after chemotherapy. After chemotherapy, the number of species per patient increased by a mean of 2.6
Vozza et al. 2015	Test group: N baseline=15 N end of trial=15 Control group: N baseline= 15 N end of trial=15	Solid tumor = 15 (Lung cancer, colon cancer, prostate cancer, cervical cancer, breast cancer)	Supragingival plaque	Culture	Baseline (T0), T1 (1 day after chemotherapy) and T2 (7 days after chemotherapy)	<i>Granulicatella</i> spp. <i>F. Nucleatum</i> <i>Gemella</i> spp. <i>P. micros</i> <i>Actinobacillus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp <i>Leuconostoc</i> spp. <i>P. gingivalis</i>	Qualitative changes in 57% of the patients, the oral microflora consisted mainly of Gram-positive cocci (<i>Streptococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Granulicatella</i> spp. and <i>Gemella</i> spp.), while 43% of the bacterial flora had periodontal pathogenic species (<i>F.</i> <i>nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>Actinobacillus</i> spp. <i>E. Pep. Micros</i>). <i>Fusobacterium nucleatum</i> was the most frequently found bacterium and <i>Actinobacillus</i> was the least frequent. No significant differences were found in quantitative bacterial changes in any of the time intervals (T0, T1 and T2), compared between groups.

Table 4: Quality ratings for the case-control studies included on the basis of Newcastle-Ottawa quality assessment scale (n=10).

Study	Selection (score) R1	Selection (score) R2	Comparability (score) R1	Comparability (score) R2	Exposure/Outcome (score) R1	Exposure/Outcome (score) R2	Total Score R1	Total Score R2
Main et al. 1984	3	3	1	1	2	2	6	6
Samaranayake et al. 1984	2	2	1	1	2	2	5	5
Wahlin et al. 1991	3	3	1	1	2	2	6	6
Galili et al. 1992	2	2	1	1	2	2	5	5
O'Sullivan et al.1993	3	3	1	1	2	2	6	6
Lucas et al. 1997	2	2	1	1	2	2	5	5
Sixou et al. 1998	4	4	1	1	2	2	7	7
Sixou et al. 2006	4	4	1	1	2	2	7	7
Jensen et al. 2008	2	2	2	2	3	3	7	7
Vozza et al. 2015	2	2	1	1	2	2	6	6
Olszewska et al. 2016	3	3	1	1	2	2	6	6

Table 5: Quality ratings for the cross- sectional studies included on the basis of Newcastle-Ottawa quality assessment scale (n=06).

Study	Selection (score) R1	Selection (score) R2	Comparability (score) R1	Comparability (score) R2	Exposure/Outcome (score) R1	Exposure/Outcome (score) R2	Total Score R1	Total Score R2
Minah et al. 1986	2	2	1	1	2	2	5	5
Peterson et al. 1987	3	3	1	1	2	2	6	6
Reynolds et al. 1989	3	3	1	1	2	2	6	6
Peterson et al. 1990	3	3	1	1	2	2	6	6
Bergmann 1991	2	2	1	1	2	2	5	5
Napenas et al. 2010	2	2	2	2	2	2	6	6