



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

FELIPE TORRES DANTAS

**Avaliação clínica e de mediadores inflamatórios antes e após
tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes portadoras de
câncer de mama com periodontite previamente à quimioterapia**



Ribeirão Preto/SP
2021

FELIPE TORRES DANTAS

**Avaliação clínica e de mediadores inflamatórios antes e após
tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes portadoras de
câncer de mama com periodontite previamente 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 obtenção de título de Doutor em Periodontia.

Orientadora: Prof. Dra. Daniela Bazan Palioto

Ribeirão Preto/SP

2021

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

Dantas, Felipe Torres

Avaliação clínica e de mediadores inflamatórios antes e após tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes portadoras de câncer de mama com periodontite previamente à quimioterapia, 2021.

83 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Palioto, Daniela Bazan.

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANTAS, F. T. Avaliação clínica e de mediadores inflamatórios antes e após tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes portadoras de câncer de mama com periodontite previamente à quimioterapia. 2021. 83f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

À minha mãe **Moema** (*in memoriam*),

Por ser exemplo único de amor incondicional, honestidade, humildade e perseverança na minha vida. Por nunca ter sido oposta às minhas escolhas e ter acreditado no meu potencial, vibrado comigo a cada conquista e lutado sempre ao meu lado. Serei grato eternamente à essa guerreira que nunca mediu esforços para me ver bem e feliz. Você foi capaz de abrir mão dos próprios sonhos para que eu realizasse os meus. Hoje tenho certeza que olha por mim de um outro plano e encontra-se feliz porque essa vitória também é sua. Te amarei para sempre. MUITO OBRIGADO!

Ao meu irmão **Fredy**,

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

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

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

À minha esposa **Ana Tereza (Teka)**,

Por ser o meu porto seguro e fonte inesgotável de inspiração, carinho, amor e compreensão. Muito obrigado por ter caminhado ao meu lado durante esses anos. Foram muitos momentos difíceis mas eu nunca me senti sozinho porque eu tenho você comigo. Obrigado por me dar o maior presente do mundo, nosso **Henrique**. Eu renasci quando ele nasceu.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Aos meus amigos, **Fernanda e Victor**, por assumirem o papel de família enquanto eu estava em Ribeirão Preto e sempre me apoiarem.

Ao amigo **Lucão**, pela amizade e pela torcida de sempre. Não posso esquecer dos excelentes pratos preparados por ele e das boas conversas.

Em especial, à minha orientadora **Professora Daniela Bazan Palioto** pelas oportunidades que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Quando ela precisou se afastar para realizar o pós-doc no exterior, confiou em mim e delegou responsabilidades que me fizeram amadurecer. Naquele momento eu me questionava se daria conta e ela sempre dizia “você vai conseguir; vai dar certo sim; qualquer coisa, peça ajuda; deixe tudo pronto porque, quando as oportunidades da vida aparecem, elas não esperam.” E foi assim que aconteceu, e eu estava lá mais maduro do que quando comecei esse desafio. Obrigado por me apoiar no momento mais delicado da minha vida, quando pensei em desistir de tudo. Muito Obrigado.

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

Ao **Prof. Márcio Grisi** pela inúmeras oportunidades oferecidas tanto na FORP-USP quanto na sua Clínica particular. Aprender novas abordagens e tecnologias para tratamento das doenças periodontais, ao seu lado, foi uma experiência única.

Aos docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, **Prof. Hélio Humberto Angotti Carrara** e **Prof. Francisco José Candido dos Reis** por me acolherem e assumirem o compromisso para a realização deste trabalho. Obrigado pelas grandes trocas de conhecimentos.

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

À minha turma do doutorado, **Sérgio Lago, Luiz Fernando, Karine Figueredo, Bárbara Masalskas e Catarina Tahim**, pela amizade e companheirismo durante essa jornada. Tenho muito orgulho de ter feito parte dessa turma. Obrigado por tudo, galera!

Ao irmão que o doutorado me deu, **Uislen Cadore**, pela amizade verdadeira durante esses anos. Obrigado por ser sempre presente e estar disposto a ajudar sem medir esforços. Tenho muito orgulho de ter um amigo como você, com o coração gigante e cheio de empatia. Obrigado por ser grande companheiro na busca da nossa evolução espiritual. Que venham novas conquistas para nós.

Ao amigo, **Pedro Félix**, por toda ajuda durante essa jornada, pela paciência de me ensinar mil vezes o que eu não sabia e por colaborar enquanto eu estava longe de Ribeirão. E pela companhia nos momentos de lazer junto com a amiga **Karine Figueredo**, a qual levarei sempre comigo. Obrigado a vocês dois!

Aos amigos da pós-graduação em Periodontia da FORP-USP, **Kelly Vargas Marcos Invernici, Paula Pessôa, Mariana Sales, Cristine Borges, Gustavo Vieira, Kleber Suzuki e Marília Reis**, por todo apoio e amizade durante esta trajetória.

A todos os funcionários da FORP-USP, em especial à **Dani**, peça fundamental da Clínica de Pós-graduação e que se tornou uma grande amiga, de coração bom e sempre disposta a ajudar. Muito obrigado!

À **Dulce e Dani**, secretárias do departamento de CTBMF e Periodontia, por todo carinho e ajuda. Em especial a **Bel**, por todas as vezes que precisei e ela estava de coração aberto para me ajudar e desejar coisas boas. Sem vocês o nosso trabalho diário seria muito mais difícil. Obrigado!

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

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

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

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

A **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pela minha bolsa de doutorado.

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

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

*“ De vez em quando é preciso caminhar sob o ardido do sol.
Só para recolher do varal a peça que nos pertence.”*

Padre Fábio de Melo

RESUMO

DANTAS, Felipe Torres. **Avaliação clínica e de mediadores inflamatórios antes e após tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes portadoras de câncer de mama com periodontite previamente à quimioterapia**. 83f. il. 2021. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Departamento de CTBMF e Periodontia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2021.

RESUMO

Muitas evidências científicas têm demonstrado impacto positivo da terapia periodontal não cirúrgica (TPNC) no controle da infecção/inflamação local e sistêmica, seja em pacientes normosistêmicos quanto naqueles sistemicamente comprometidos, representado pela melhora dos parâmetros clínicos periodontais e redução nos níveis de marcadores inflamatórios no fluido crevicular gengival (FCG), saliva e soro. Desta forma, este trabalho objetivou avaliar parâmetros clínicos periodontais e mediadores inflamatórios no FCG e soro, antes e após tratamento periodontal não cirúrgico, em pacientes com câncer de mama e periodontite, previamente à quimioterapia. Dezesete mulheres com diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal invasivo foram submetidas à avaliação dos parâmetros clínicos periodontais (índice de placa – IP, sangramento à sondagem – SS, profundidade de sondagem – PS, nível clínico de inserção – NCI) e submetidas a TPNC, centrada na raspagem e alisamento radicular (RAR), dentro de um intervalo de 24 horas. No início do estudo (*baseline*), antes da TPNC, foram coletadas amostras de fluido do microambinete tumoral (MT), FCG e sangue periférico (soro) para dosagem dos marcadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-17, pela metodologia LUMINEX. Além disso, sete dias após a RAR novas amostras de FCG e soro foram obtidas e analisadas. Foi possível identificar as quatro citocinas nos três ambientes avaliados no *baseline*. Após uma semana da TPNC, os níveis do TGF- β foram diminuídos significativamente no FCG e no soro ($p < 0,05$), enquanto as concentrações da IL-17 foram estatisticamente reduzidas no FCG ($p < 0,05$). Apesar de os níveis séricos da IL-17, bem como as concentrações da IL-1 β e TNF- α no FCG e soro não apresentarem diferença estatisticamente significativa, observou-se uma tendência à redução das mesmas. Diante disso, concluiu-se que a TPNC diminuiu marcadores inflamatórios locais e sistêmicos e pode ser uma ferramenta importante na abordagem multidisciplinar de mulheres com câncer de mama e periodontite antes da quimioterapia.

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

ABSTRACT

DANTAS, Felipe Torres. **Clinical and inflammatory mediators evaluation before and after non-surgical periodontal treatment in breast cancer patients with periodontitis before chemotherapy.** 83 pp. il. 2021. Thesis (Doctor) Dissertation – School of Dentistry of Ribeirão Preto, Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2021.

ABSTRACT

Scientific evidence has demonstrated the positive impact of non-surgical periodontal therapy (NSPT) on the control of local and systemic infection/inflammation in normosystemic and systemically compromised patients. These findings are represented by the improvement of periodontal clinical parameters and inflammatory markers reduction in the gingival crevicular fluid (GCF), saliva, and serum. Thus, this study aimed to evaluate periodontal clinical parameters and inflammatory mediators in GCF and serum, before and after non-surgical periodontal treatment, in patients with periodontitis and breast cancer before chemotherapy. Seventeen women with histopathological diagnosis of invasive ductal carcinoma were submitted to the evaluation of clinical periodontal parameters (plaque index – PI, bleeding on probing – BOP, probing depth – PD, clinical attachment level – CAL) and submitted to NSPT, focused scaling and root planing (SRP), within a 24-hour interval. At the beginning of the study (*baseline*), before NSPT, samples of tumor microenvironment (TM) fluid, GCF, and peripheral blood (serum) were collected before the NSPT for the determination of inflammatory markers (IL-1 β , TNF- α , TGF- β , and IL-17) using the LUMINEX methodology. In addition, seven days after SRP, new GCF and serum samples were obtained and analyzed. It was possible to identify the four cytokines in the three environments evaluated at *baseline*. After one week of NSPT, TGF- β levels were significantly decreased in GCF and serum ($p < 0.05$), while IL-17 concentrations were statistically reduced in GCF ($p < 0.05$). Although IL-17 serum levels and concentrations of IL-1 β and TNF- α in the GCF and serum showed a tendency to decrease, no statistical significance was observed. In conclusion, NSPT decreased local and systemic inflammatory markers and may be an important tool in the multidisciplinary approach of women with breast cancer and periodontitis before chemotherapy.

Keywords: Periodontitis; Breast cancer; Inflammation; Immune system; Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Coleta do fluido crevicular gengival. A) Remoção da placa supragengival. B) Coleta de FCG com tiras de Periopaper® (Oralflow Inc., Amityville, NY, EUA). C) Corte das tiras de Periopaper®. D) Tiras de Periopaper® armazenadas em frascos esterilizados tipo *eppendorf*..... 48
- Figura 2** - *Box-plot* dos valores das citocinas presentes no FCG analisadas no *baseline* e após uma semana..... 57
- Figura 3** - *Box-plot* dos valores das citocinas presentes no soro analisadas no *baseline* e após uma semana..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise descritiva das variáveis avaliadas (Média e desvio padrão/Mediana e intervalo interquartil).....	54
Tabela 2 - Distribuição do grau do tumor, RE, RP, HER2 dos participantes.....	55
Tabela 3 - Análise descritiva dos níveis das citocinas avaliadas nos diferentes ambientes no <i>baseline</i> (Média e desvio padrão/Mediana e intervalo interquartil).....	55
Tabela 4 - Níveis das citocinas no <i>baseline</i> , após uma semana da TPNC e a diferença (Δ) entre os dois tempos em FCG e soro (Média e desvio padrão).....	56

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética.....	78
Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
Anexo C - Artigo Científico Submetido para Publicação no Periódico <i>Supportive Care in Câncer</i>	82
Anexo D - Comprovante De Submissão do Artigo Científico ao Periódico <i>Anticancer Research</i>	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Periodontia
CO	Câncer oral
DP	Doença periodontal
FCG	Fluido crevicular gengival
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Fn	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
IFN-γ	Interferon-gama
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IL-1α	Interleucina-1 alfa
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IP	Índice de placa
mg/dL	Miligrama por decilitro
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinase de matriz, do inglês, <i>matrix metalloproteinase</i>
NCI	Nível clínico de inserção
nm	Nanômetro
°C	Grau <i>Celsius</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Proteína C-reativa
pg/mg	Picograma por miligrama
pg/mL	Picograma por mililitro
PS	Profundidade de sondagem
SS	Sangramento à sondagem
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator de crescimento tumoral-beta

Th1	Linfócitos T <i>helper</i> -1
Th17	Linfócitos T <i>helper</i> -17
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> -2
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
Treg	Linfócitos T-regulatórios
USP	Universidade de São Paulo
\leq	Menor ou igual a (símbolo matemático)
\geq	Maior ou igual a (símbolo matemático)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1 Inflamação e Periodontite.....	28
2.2 Inflamação e Câncer de Mama.....	30
2.3 Associação entre Doença Periodontal e Câncer.....	33
2.4 Terapia Periodontal Não Cirúrgica (TPNC).....	35
3 PROPOSIÇÃO.....	38
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Aspectos éticos.....	41
4.2 Cálculo do tamanho da amostra.....	41
4.3 Seleção dos pacientes.....	42
4.4 Delineamento do estudo.....	43
4.5 Calibração do examinador.....	44
4.6 Coleta dos parâmetros clínicos.....	45
4.7 Terapia Periodontal Não Cirúrgica (TPNC).....	45
4.8 Coleta dos parâmetros clínicos e histológicos do tumor de mama....	46
4.9 Coleta das amostras.....	47
4.9.1 Fluido Crevicular Gengival.....	47
4.9.2 Microambiente tumoral.....	48
4.9.3 Sangue Periférico (soro).....	49
4.10 Processamento das amostras.....	50
4.10.1 Fluido Crevicular Gengival.....	50
4.10.2 Microambiente tumoral e Sangue Periférico.....	51
4.11 Análises estatísticas.....	52
5 RESULTADOS.....	53
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença crônica multifatorial associada a um biofilme disbiótico sendo responsável pela destruição progressiva do aparato de inserção dental (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar). Dentre suas principais características, destacam-se a perda no nível clínico de inserção, perda óssea alveolar avaliada radiograficamente, presença de bolsa periodontal e sangramento gengival. Esta doença de alta prevalência tem sido comumente relacionada à perda dentária, com impactos negativos na função mastigatória, na estética, na saúde geral e qualidade de vida, comportando-se como um significativo problema de saúde pública (PAPAPANOU et al., 2018; CATON et al., 2018).

O fator etiológico primário da periodontite é o biofilme subgengival formado, principalmente, por bactérias anaeróbicas gram-negativas produtoras de uma série de fatores de virulência. Estes fatores atuam diretamente na destruição dos tecidos do periodonto, assim como interferem na resposta imunológica do hospedeiro, ativando leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, que produzem e secretam mediadores inflamatórios, caracterizando sua imunopatogênese (HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2012; HAJISHENGALLIS, CHAVAKIS, LAMBRIS, 2020) Existe um grande número de evidências relevantes da associação entre periodontite e outras condições sistêmicas como, por exemplo, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares e intercorrências gestacionais (LINDEN, LYONS, SCANNAPIECO, 2013). Isso pode ser explicado porque as bactérias periodontais e os mediadores inflamatórios não ficam restritos ao nível gengival e, ao entrarem na corrente sanguínea, disseminam-se pelo organismo, causando impacto mensurável na inflamação sistêmica (VAN DYKE & VAN WINKELHOFF, 2013; VAN DYKE, BARTOLD, REYNOLDS, 2020).

Dentre as condições sistêmicas associadas à periodontite, ainda é desconhecida sua possível ligação com o câncer de mama, o qual se caracteriza como um processo desordenado que se inicia quando uma célula normal sofre mutação genética, podendo invadir, por metástase, outras partes do corpo. Atualmente, tem sido sugerido que a inflamação associada ao câncer é similar àquela vista em inflamações crônicas. Em tecidos neoplásicos são encontrados macrófagos ativados,

neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células *natural killers* (NK), linfócitos TCD4⁺ (LTCD4⁺) e TCD8⁺ (LTCD8⁺) específicos e imunoglobulinas, citocinas, proteases extracelulares, fatores pró-angiogênicos e quimiocinas. Esses fatores-chave da inflamação podem ter papel na supressão do tumor por estímulo da resposta imune antitumoral, porém, mais frequentemente, parecem estimular o desenvolvimento do câncer (PENDYALA *et al.*, 2013).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (BRASIL, 2020), o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres, contemplando 25% dos novos casos de câncer a cada ano. Esta neoplasia tem baixa incidência antes dos 35 anos de idade e, após esta faixa etária, este índice cresce rápida e progressivamente, especialmente, após os cinquenta anos.

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

O tratamento da periodontite consiste na prevenção primária, evitando a formação do biofilme bacteriano ou eliminando-o, por meio de intervenções mecânicas. A terapia periodontal não cirúrgica (TPNC) é composta por raspagem e alisamento radicular (RAR) e faz uso de ferramentas manuais e ultrassônicas para a remoção de placa supra e subgingival, cálculo, fatores de virulência e outros fatores de retenção do biofilme. A TPNC promove reduções de profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, com consequente controle da infecção e inflamação local e sistêmica. Os resultados de estudos intervencionais demonstram que, quanto melhor a resposta clínica periodontal, maiores serão as reduções de níveis séricos de alguns marcadores inflamatórios. Estudos que relatam, após terapia periodontal, melhora nos parâmetros clínicos periodontais, melhora no fluxo do fluido crevicular gengival e diminuição de bactérias periodontopatogênicas em sítios subgingivais, encontraram diminuição de níveis séricos de proteína C-reativa, TNF- α , IL-6 e outras

citocinas e marcadores inflamatórios (BOKHARI et al., 2009; DAG et al., 2009; PRADEEP et al., 2009; RENVERT et al., 2009; SHIMADA et al., 2010; DUARTE et al., 2010; TUTER et al., 2010; RADAFSHAR et al., 2010; KAMIL et al., 2011; LINDEN, LYONS, SCANNAPIECO, 2013; VAN DYKE & VAN WINKELHOFF, 2013; AL-HAMOUDI et al., 2020).

Recentemente, Vargas-Villafuerte et al. (2021) demonstraram que a TPNC é capaz de reduzir marcadores inflamatórios em mulheres com câncer de mama e periodontite, o que pode evitar exacerbação da doença periodontal, bem como, prevenir quadros de sepses diante de uma imunossupressão causada pela quimioterapia (VARGAS-VILLAFUERTE et al., 2018). Além disso, a redução nos marcadores séricos, alcançada pela tratamento da periodontite, pode ser entendida como especialmente importante, quando precedida da quimioterapia, uma vez que poderia contribuir com uma resposta mais favorável à terapia antitumoral, melhorando, assim, o prognóstico dessas mulheres. Por isso, há necessidade de estudos intervencionais nessa temática.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Inflamação e Periodontite

Investigações no campo da periodontia atual têm proposto um novo modelo de patogênese, no qual a periodontite é iniciada por uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica, ao invés de patógenos periodontais específicos. Nesta sinergia polimicrobiana, diferentes membros ou combinações de genes específicos dentro da comunidade desempenham papéis distintos que convergem para formar e estabilizar uma microbiota provocadora de doença. Um dos requisitos fundamentais para uma comunidade potencialmente patogênica envolve a capacidade de certas espécies, denominadas “patógenos-chave”, para modular a resposta do hospedeiro de maneira que prejudica a vigilância imunológica e pende a balança da homeostase para disbiose (HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2012).

A imunopatogênese da periodontite é decorrente do constante influxo de leucócitos em direção ao sulco gengival (KORNMAN, PAGE, TONETTI, 1997), sendo o caminho migratório orientado pela ação de inúmeros mediadores inflamatórios (MUKAIDA et al., 1992), dentre esses, uma variedade de citocinas produzidas por diferentes tipos celulares. As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que orquestram as respostas imunes e inflamatórias. Essas proteínas envolvem as interleucinas (IL), os interferons (IFN), fatores de necrose tumoral (TNF), fatores estimuladores de colônia e fatores de crescimento. Tem sido postulado que um perfil de citocinas características de uma resposta linfocitária Th1/Th2, individualmente ou em combinação, pode modular a resposta do hospedeiro frente à infecção periodontal. O balanço Th1/Th2, além de depender do estágio da doença, pode estar relacionado a uma resposta imune com características destrutivas ou de homeostasia tecidual (protetora) (TENG, 2002).

A principal função das células T auxiliares é amplificar a resposta imune. Em geral, as citocinas Th1 favorecem o desenvolvimento de uma resposta imune celular, promovendo inflamação excessiva e dano tecidual, enquanto citocinas Th2 favorecem uma resposta imune humoral, mediada por anticorpos e relacionada a reparo tecidual.

As principais citocinas produzidas pelas células Th1, participantes na dinâmica das doenças periodontais, são IL-2, INF- γ e TNF, sendo consideradas citocinas pró-inflamatórias. Sob as mesmas condições, as células Th2 produzem, principalmente, a IL-4, IL-10 e TGF- β , citocinas anti-inflamatórias e a IL-6, pró-inflamatória. Além dessas, existem citocinas pró-inflamatórias originadas de outras células como a IL-1 β , produzida por linfócitos B, macrófagos, monócitos, células NK e células dendríticas (KINANE, 2000; EBERSOLE et al., 2013).

Em uma revisão da literatura atual, Cheng et al. (2020) discutem sobre papel da IL-1 β na destruição periodontal, destacando sua forte ação sobre a reabsorção óssea e a indução da produção de proteinases que degradam o tecido, além do poder de modular doenças sistêmicas. Os autores mostram que esta citocina é um potencial alvo terapêutico e bloqueá-la pode trazer benefícios à terapia periodontal. A IL-1 β recruta células inflamatórias, facilita a degranulação de leucócitos polimorfonucleares, aumenta a síntese de prostaglandinas e metaloproteinases de matriz (MMP), inibe a síntese de colágeno e ativa linfócitos B e T, amplificando a resposta imune e, conseqüentemente, a destruição tecidual (IACOPINO & CUTLER, 2000; GRAVES & COCHRAN, 2003; SANCHEZ et al., 2013).

O TNF- α encontra-se presente em altos níveis no fluido crevicular gengival e nos tecidos periodontais doentes, tanto em estudos clínicos quanto em modelos animais, desempenhando um papel central nesse processo inflamatório. Esta citocina tem um forte potencial para aumentar a reabsorção óssea e a degradação de tecido conjuntivo ao estimular a produção de prostaglandinas (PGE-2) e colagenases (HERALGI et al., 2011; LIAO et al., 2014). Sua produção é feita, principalmente, por macrófagos e monócitos, porém, outras células participam da sua síntese como linfócitos T e B, células NK e células não-imunes, a exemplo dos fibroblastos, osteoblastos e células tumorais (MACCALLI, SCARAMUZZA, PARMIANI, 2009). Associado a isso, este marcador age na ativação de células endoteliais vasculares permitindo a adesão de linfócitos e extravasamento para o sítio da infecção. O TNF- α , juntamente com outras citocinas, como IL-1 β , induz produção de MMP, havendo maior evidência da ação destas citocinas na destruição tecidual (BEKLEN et al., 2007).

O fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) é uma citocina multifuncional que regula o crescimento, proliferação e diferenciação celular. Esta proteína pertence ao grupo das células T reguladoras (Treg), regula a indução e a

atividade das células T efetoras controlando respostas imunes exacerbadas (DUTZAN et al., 2009), sendo também importante no metabolismo do tecido conjuntivo durante a periodontite. Apresenta papel modulador, desregula a transcrição de outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, TNF- α e MMP, aumenta o reparo cicatricial, acelera a remodelação de tecido conjuntivo e promove angiogênese. A ausência de TGF- β , provavelmente, contribui para a maior destruição periodontal (BABEL et al., 2006). Portanto, maiores níveis de TGF- β no FCG 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 doença (CARDOSO et al., 2008). O TGF- β tem sido associado a um marcador de progressão da doença periodontal. Em 2014, Khalaf, Lönn & Bengtsson encontraram níveis elevados dessa citocina em fluido crevicular gengival, saliva e soro de pacientes acometidos por periodontite quando comparado a controles saudáveis.

Apesar de ser bem documentado o perfil linfocitário Th1/Th2 na modulação da resposta do hospedeiro frente a infecções periodontais, tem sido sugerido que as células Th17, uma terceira população de células T CD4⁺ efectoras, e a citocina IL-17, também desempenham papel crucial na imonopatogênese da doença periodontal. A relação Th17/IL-17 é associada a inflamação gengival e destruição óssea tanto em pacientes com periodontite quanto em modelos animais, bem como à maior severidade da periodontite (CHENG et al. 2014; LIN et al., 2014, AZMAN et al., 2014; CHITRAPRIYA et al., 2015). Moutsopoulos et al., 2012 relataram que a *Porphyromonas gingivalis*, importante patógeno periodontal, é capaz de induzir resposta Th17/IL-17 através de mecanismos que envolvem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6. Em 2019, Bunte & Beikler discutiram o papel da IL-17 na periodontite e sua correlação com doenças inflamatórias imunomediadas, a exemplo da psoríase, artrite reumatoide e doenças inflamatórias intestinais, destacando esta citocina como potencial alvo terapêutico nas referidas condições.

2.2 Inflamação e Câncer de Mama

A neoplasia mamária é uma doença crônica, de evolução imprevisível, resultante da interação de fatores genéticos e ambientais como, por exemplo, o estilo

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

As células inflamatórias são recrutadas para dentro dos processos neoplásicos e, inicialmente, são potentes promotores tumorais por criarem um ambiente favorável para o crescimento do tumor, facilitando a instabilidade genômica e promovendo a angiogênese. Mais tarde, nesse processo, as células malignas redirecionam mecanismos inflamatórios em favor da expansão neoplásica e metástase. Os LTCD8⁺ e as células NK são as principais células efetoras envolvidas na imunidade antitumoral, as quais atuam na eliminação das células alteradas, principalmente, por ativação de mecanismos apoptóticos e/ou lise por citotoxicidade. Além disso, os LTCD4⁺ são ativados por reconhecimento de antígenos na superfície de fagócitos e liberam muitas citocinas e mediadores inflamatórios. A produção dessas biomoléculas estabelece uma estreita comunicação entre a imunidade inata e adaptativa. Dentre os principais mediadores solúveis na inflamação relacionada ao câncer de mama, estão: IL-2, IFN- γ , interleucinas da família IL-1 (IL-1 α e IL-1 β), TNF, IL-6, TGF- β e IL-17 (NICOLINI, CARPI, ROSSI, 2006; FABRE et al., 2018).

Nesse contexto, interleucinas da família IL-1 (IL-1 α e IL-1 β) são, frequentemente, expressas em linhagens de células do câncer de mama e no microambiente tumoral. Estas citocinas agem por mecanismos autócrinos e parácrinos que contribuem para atividades pró-tumorigênicas como, por exemplo, angiogênese, proliferação e invasão tumoral local. Além disso, provém crescimento do tumor e metástase por induzir vários genes pró-metastáticos. A associação das interleucinas IL-1 β e IL-6, também, estimula a proliferação das células malignas da mama por ativação de enzimas catalisadoras no tecido, que levam a produção de estrógeno. Esse tipo de câncer é hormônio-dependente e isso favorece o seu desenvolvimento (SNOUSSI et al., 2005; NICOLINI, CARPI, ROSSI, 2006; TULOTTA et al., 2018).

Recentemente, por meio de um estudo *in vitro* e *in vivo*, Eyre et al. (2019) destacaram que a IL-1 β é uma citocina muito importante na metástase do câncer de mama para o osso, uma vez que a mesma participa da ativação de vias intracelulares cruciais nesse processo de disseminação. Diante disso, os autores forneceram forte justificativa para considerar a utilização de inibidores da via de sinalização envolvendo a IL-1 β como estratégia terapêutica adjuvante e, assim, prevenir metástase óssea. Os achados de Tulotta et al. (2019) corroboram com os dados discutidos acima, e estes autores reafirmam que níveis elevados de IL-1 β têm sido associados a pior prognóstico do câncer de mama, por estarem envolvidos nos mecanismos pró-metastáticos. Desta maneira, a inibição farmacológica desta citocina é vista como promissora para prevenção de metástase.

A citocina TNF- α é uma das moléculas pró-inflamatórias mais encontradas no microambiente tumoral, no soro e no plasma de mulheres com câncer de mama, sendo secretadas por células do estroma, principalmente, por macrófagos associados a tumores e pelas próprias células cancerosas, participando ativamente de todas as fases do desenvolvimento do câncer, como a proliferação, sobrevivência, transição epitelial-mesenquimal, metástase e recorrência. Por muito tempo, foram atribuídas apenas características antitumorais para essa citocina, uma vez que a mesma demonstrou capacidade de promover destruição da vascularização local, causando necrose indireta de células tumorais, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, facilitando o acúmulo de drogas quimioterápicas no local do tumor e a indução de apoptose. Por outro lado, atualmente, tem sido discutido o seu forte papel pró-tumorigênico, por exacerbar processos inflamatórios que contribuem na expansão tumoral e metástase (MARTÍNEZ-REZA et al., 2017; CRUCERIU et al., 2020). Para Liu et al. (2016), esta citocina tem papel crítico na migração do tumor, proliferação, degradação da matriz, metástase tumoral, invasão e angiogênese. Em 2017, Ma e colaboradores encontraram níveis séricos elevados de TNF- α em pacientes com câncer de mama grau 3, quando comparado a controles saudáveis, e esses achados foram correlacionados a presença de metástase em linfonodos.

O TGF- β é uma citocina multifuncional que atua inibindo a tumorigênese mamária ao induzir diretamente as células epiteliais da mama a sofrerem parada do ciclo celular ou apoptose, em estágios iniciais da doença. Entretanto, eventos genéticos e epigenéticos, que ocorrem durante a tumorigênese mamária, normalmente, inativam a sua atividade de supressão tumoral e conferem a esta

citocina atividades de promoção do tumor, incluindo a capacidade de estimular a invasão do câncer, angiogênese, evasão do sistema imunológico e metástases, incluindo em osso e pulmão (MOSES & BARCELLOS-HOFF, 2011; DRABSCH & DIJKE, 2011; IMAMURA, HIKITA & INOUE, 2012). Para Pendyala et al. (2013) essa molécula tem papel importante nos mecanismos de evasão da vigilância imunológica pelo câncer. Essas proteínas são expressas por células tumorais e agem inibindo linfócitos e modificando a expressão de moléculas de adesão endoteliais, o que diminui o influxo de células inflamatórias para o ambiente tumoral, diminuindo a inflamação e, conseqüentemente, a resposta imune local.

Recentemente, Li et al. (2020) discutiram sobre a imunoterapia do câncer e destacaram que o bloqueio de sinalização do TGF- β , direcionado em células T auxiliares, pode suprimir a progressão do câncer, por mecanismos que envolvem a reorganização da vascularização local e, conseqüentemente, a hipóxia e morte celular. Khoshakhlagh et al. (2019) também defendem a ideia de que a supressão da via TGF- β , usando inibidores biológicos ou farmacológicos, é uma nova abordagem terapêutica potencial para o tratamento do câncer de mama.

Estudos têm demonstrado que níveis elevados de células Th17 no microambiente do câncer de mama e, conseqüentemente, da citocina pró-inflamatória IL-17, estão associados ao aumento do risco de metástase e pior prognóstico (CHEN et al., 2013; COFFELT et al., 2015; BASTID et al., 2020). Recentemente, Song, Wei & Li (2021) reafirmaram que a inflamação crônica pode desencadear uma série de eventos moleculares, levar à transformação maligna, inibir a imunidade antitumoral e, finalmente, levar à ocorrência de metástase. Nesse contexto, os autores discutiram o papel crucial da IL-17 nesses processos. Fabre et al. (2018), em uma revisão da literatura, discutiram sobre a família da IL-17 no câncer de mama e levantaram questões a respeito dessa citocina ser um potencial alvo terapêutico em terapias antitumorais, uma vez que a mesma tem atividades pró-tumorigênicas ao estimularem a angiogênese, inibir apoptose e acelerar expansão tumoral.

2.3 Associação entre Doença Periodontal e Câncer

Evidências científicas sugerem que a doença periodontal (DP) é associada a um aumento do risco de vários cânceres, especialmente orais, pulmonares,

gastrointestinais, próstata, cabeça e pescoço, hematológicos e mama. Entretanto, a relação da DP e risco para câncer de mama ainda necessita de novas investigações. O que se tem discutido é que mecanismos imunoinflamatórios podem ser os responsáveis por essa associação (JIA et al., 2020; GÜVEN et al., 2019). Em 2011, um estudo longitudinal prospectivo, com 3.273 indivíduos, avaliou a associação entre DP e a incidência de câncer de mama e encontrou maior incidência dessa neoplasia nos pacientes que tinham DP e algum dente molar perdido na mandíbula (5,5%), quando comparados com indivíduos com DP, mas sem dente molar perdido (0,5%). Assim, os pesquisadores defenderam o paradigma infecção/inflamação crônica *versus* risco de câncer (SÖDER et al., 2011).

Em 2016, um estudo de coorte acompanhou 73.737 mulheres pós-menopausa, por um período de 6,7 anos e mostrou um significativo aumento do risco de câncer de mama invasivo entre mulheres que reportaram história de doença periodontal. Os autores discutem que a presença de periodontopatógenos na região do tumor mamário e mediadores da inflamação crônica tem papel ativo na carcinogênese e poderia explicar essa associação (FREUDENHEIM et al., 2016). Um ano depois, uma coorte com 65.869 mulheres no período pós-menopausa relata que doença periodontal aumenta o risco de câncer total entre as mulheres mais velhas, independentemente do tabagismo e, nesse contexto, a DP foi associada a 1,13 vezes o risco de câncer de mama (NWIZU et al., 2017). Em um estudo de caso-controle na população brasileira, Sfreddo e colaboradores (2017) encontraram que mulheres com diagnóstico de periodontite tinham de duas a três vezes mais chances de desenvolverem câncer de mama do que mulheres sem periodontite.

Uma metanálise atual, Shao e colaboradores (2018) encontraram que a DP aumenta em 1,22 vezes o risco de câncer de mama e que a terapia periodontal é uma ferramenta valiosa para prevenção dessa neoplasia mamária. Os autores reafirmam que o impacto sistêmico da inflamação/infecção periodontal (mediadores inflamatórios e bactérias) estaria envolvido na plausibilidade biológica que suportam esses achados. Os dados de outra metanálise, também, encontraram aumento de 1,18 vezes na susceptibilidade ao câncer de mama entre aquelas que apresentam DP, discutindo os mesmos aspectos levantados anteriormente (SHI et al., 2018).

Apesar de muitos estudos apontarem um aumento do risco de câncer de mama em pacientes com doença periodontal, Jia et al. (2020) não encontraram uma associação clara entre essas duas doenças. Entretanto, os autores destacam que

existe muita heterogeneidade em fatores que podem interferir nesses resultados e, por isso, novos estudos são necessários. Michaud et al. (2018), também, não encontraram associação positiva entre periodontite e câncer de mama, apesar de relatarem fortes associações com o risco de câncer de pulmão e colorretal.

Curiosamente, em um estudo transversal do tipo caso-controle, Amódio et al. (2014) avaliaram o efeito do câncer de mama e de seu tratamento na saúde oral em 48 mulheres pós-menopausa com câncer de mama (casos) comparadas com 48 mulheres sem histórico de câncer (controles). Observou-se que as pacientes com câncer e DP apresentaram maior número de dentes ausentes (média de 16 dentes remanescentes), maiores índices de placa e índice gengival quando comparadas com as pacientes que apresentavam DP sem o câncer. Achados atuais, também, encontraram menor número de dentes em mulheres com câncer de mama, durante tratamento quimioterápico, quando comparado a controles saudáveis (USTAOĞLU et al., 2021).

2.4 Terapia Periodontal Não-Cirúrgica (TPNC)

Na literatura atual, foram encontrados poucos estudos clínicos que analisaram o impacto da TPNC em paciente com periodontite e câncer de mama. Em 2016, Vargas-Villafuerte e colaboradores avaliaram parâmetros clínicos periodontais e níveis séricos de proteína C-reativa (PCR), antes e após TPNC, entre mulheres com periodontite, acometidas ou não por câncer de mama. Os autores observaram que as pacientes com neoplasia maligna responderam menos a TPNC, apresentando mais bolsas residuais e ausência de redução dos níveis de PCR. Esses achados podem ser atribuídos ao impacto da quimioterapia no retardo de processos da cicatrização tecidual e, dessa maneira, a TPNC seria bem indicada previamente ao tratamento quimioterápico, para que os tecidos respondam positivamente e, conseqüentemente, controle infecção/inflamação local e sistêmica. Willershausen et al. (2019) mostraram que mulheres após quimioterapia para o câncer de mama apresentam um pior estado de saúde bucal, principalmente, mais dentes perdidos, quando comparadas a controles saudáveis. Esses achados reforçam a importância de intervenções

odontológicas precoces para prevenir doenças orais e, conseqüentemente, a perda dos dentes.

Por outro lado, no decorrer dos últimos anos, foram encontradas fortes evidências científicas do impacto positivo que a TPNC, especialmente a RAR, exerce no controle da infecção/inflamação local e sistêmica, seja em pacientes normosistêmicos quanto naqueles sistemicamente comprometidos, representado pela melhoria dos parâmetros clínicos periodontais, diminuição na contagem de bactérias periodontopatogênicas e redução dos níveis de marcadores inflamatórios no fluido crevicular gengival (FCG), saliva e soro (BOKHARI et al., 2009; DAG et al., 2009; PRADEEP et al., 2009; RENVERT et al., 2009; SHIMADA et al., 2010; DUARTE et al., 2010; TUTER et al., 2010; RADAFSHAR et al., 2010; KAMIL et al., 2011; LINDEN, LYONS, SCANNAPIECO, 2013; VAN DYKE & VAN WINKELHOFF, 2013; AL-HAMOUDI et al., 2020).

Shirmohammadi et al. (2013), ao compararem a técnica da desinfecção bucal completa em estágio único com a RAR por quadrante, em pacientes com periodontite, observaram que ambas as técnicas foram capazes de melhorar parâmetros clínicos periodontais (sangramento à sondagem, nível clínico de inserção, profundidade de sondagem e índice gengival) e reduzir níveis séricos dos marcadores inflamatórios IL-17 e IL-1 β . Nile et al. (2016) relataram, pela primeira vez, uma diminuição significativa em proporção sérica de IL-17A/IL-17E, após 25 semanas da TPNC, e correlacionaram esses achados ao processo cicatricial dos tecidos periodontais, com conseqüente melhoria dos parâmetros clínicos. Mais recentemente, Mohammad (2020) associou o gel de curcumina, com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antibacterianas, a RAR e, observou que, após um mês da TPNC, os parâmetros clínicos melhoraram e os níveis séricos de IL-1 β e TNF- α estavam diminuídos mais expressivamente no grupo que utilizou o gel. Entretanto, resultados positivos também foram observados nos pacientes que receberam apenas a RAR. Vale ressaltar que, no início do estudo, o autor comparou o nível desses mediadores inflamatórios com um grupo controle saudável e percebeu que os pacientes acometidos pela periodontite expressavam níveis séricos maiores desses marcadores.

Toker e colaboradores (2008) encontraram melhora nos parâmetros clínicos periodontais e redução de níveis de IL-1 β em FCG de paciente com periodontite agressiva, quando comparados a controles saudáveis, após RAR. Com o uso de terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) adjuvante à RAR, Dominguez et al. (2010)

mostraram que houve uma diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no FCG de pacientes com periodontite. De maneira semelhante, em fumantes e não fumantes com periodontite, Pamuk et al. (2017) observaram que os níveis de TGF- β em FCG diminuíram significativamente após TPNC. Em 2018, Mastrangelo e colaboradores mostraram que a RAR foi capaz de reduzir IL-1 β em FCG após 10 e 30 dias da TPNC e que as reduções foram mais significativas quando TFDa foi utilizada como adjuvante a raspagem.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto da TPNC, centrado na RAR, sobre os níveis dos mediadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-17 no FCG e no soro de mulheres com câncer de mama e periodontite, previamente à quimioterapia.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 *Objetivo geral*

Avaliar parâmetros clínicos periodontais e mediadores inflamatórios locais e sistêmicos, antes e após tratamento periodontal não cirúrgico, em pacientes com periodontite e câncer de mama, previamente à quimioterapia.

3.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar parâmetros clínicos periodontais (índice de placa – IP, sangramento à sondagem – SS, profundidade de sondagem – PS, nível clínico de inserção – NCI) e número de dentes, em mulheres com câncer de mama e periodontite, antes do tratamento periodontal não cirúrgico (TPNC).
- Identificar a presença dos marcadores inflamatórios IL-17, TNF- α , IL-1 β e TGF- β no microambiente tumoral (MT), no fluido crevicular gengival (FCG) e soro, antes do TPNC e da quimioterapia.
- Analisar os níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-17, TNF- α e IL-1 β) e a citocina anti-inflamatória TGF- β , no FCG e no soro, em pacientes com periodontite e de câncer de mama, antes (*baseline*) e após uma semana do TPNC, previamente ao tratamento quimioterápico.
- Descrever as características clínicas e histológicas do tumor de mama (tipo, grau histológico, presença de receptores para estrógeno e progesterona e da proteína HER2).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) – Universidade de São Paulo (USP) e aprovado sob o protocolo nº 37030514.7.0000.5419 (**Anexo A**). Após a aprovação, as pacientes foram convidadas a participar, como voluntárias, da pesquisa e, ao concordarem, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo B**), o qual possuía informações detalhadas a respeito da pesquisa (objetivos, benefícios, riscos e desconfortos). As informações coletadas foram mantidas sob sigilo, assim como as identidades foram preservadas.

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). O tamanho da amostra foi determinado assegurando 80% de poder nas análises dos dados, considerando uma diferença significativa de 1 mm (δ) com intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0.05$) e desvio padrão (σ) de 1.0 mm, nas médias de Nível Clínico de Inserção. O cálculo foi baseado na fórmula $n = \{2[(\sigma)^2/(\delta)^2]\} \times (Z_\alpha + Z_\beta)^2$. Foi levada em consideração a média de desistência de pacientes em estudos prévios (aproximadamente 20%) (NOVAES et al., 2012; ANDRADE et al., 2013; MOREIRA et al., 2015). Além disso, foram usados como referências dados do estudo de Becerik et al. (2012), o qual investigou citocinas em fluido crevicular gengival e proteínas de fase aguda no plasma de pacientes com diferentes doenças periodontais. Dessa forma, foi estabelecido um tamanho amostral adequado de vinte pacientes.

4.3 Seleção dos pacientes

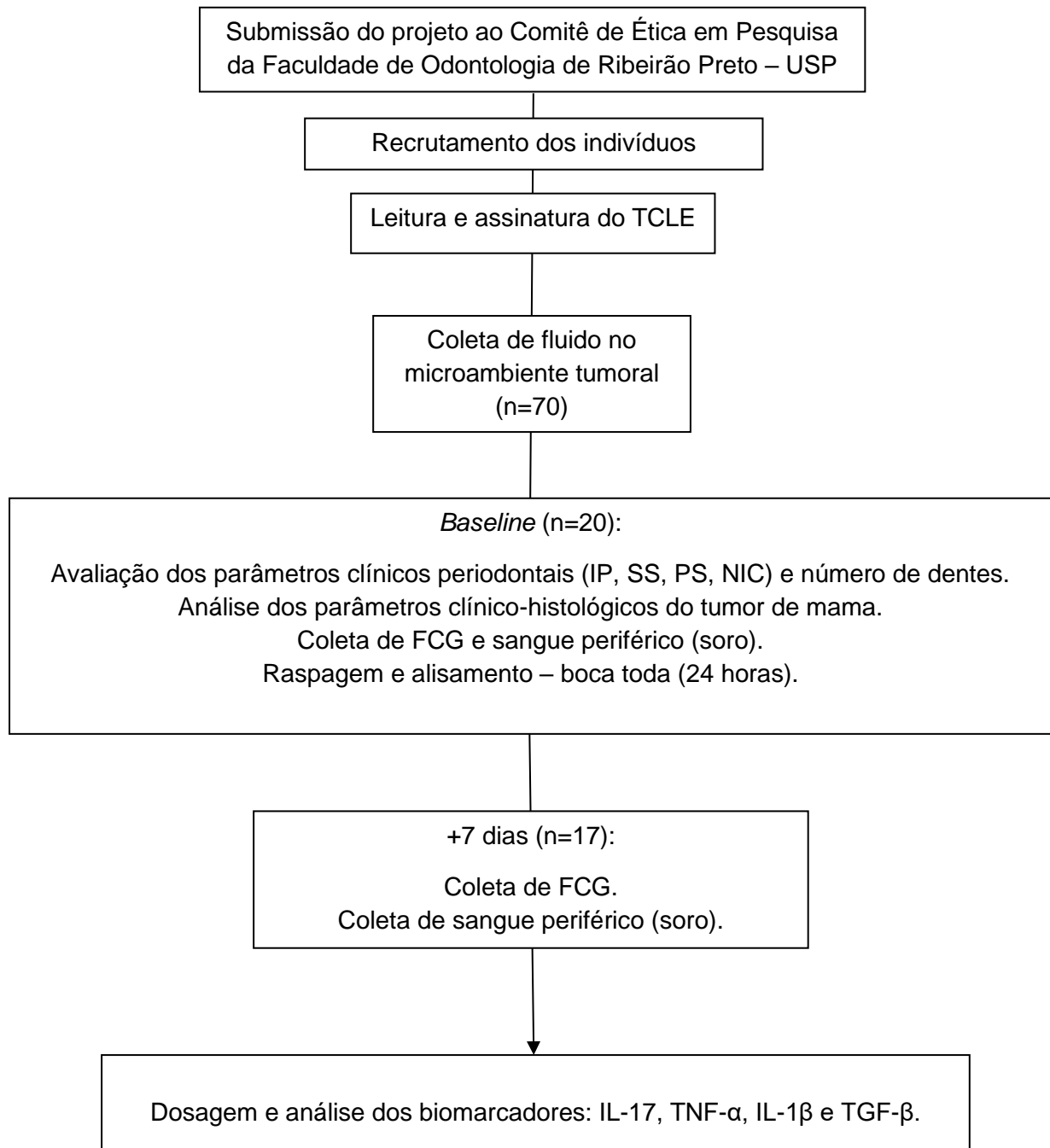
Foram convidadas inicialmente, 70 pacientes do gênero feminino, voluntárias, com idades entre 35 e 70 anos, diagnosticadas com câncer de mama pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Das 70 pacientes, 20 iniciaram o estudo, entretanto, apenas 17 seguiram o delineamento do estudo. Estas participantes, além do câncer de mama, apresentavam periodontite, de acordo com a classificação internacional das doenças periodontais adotada pela Academia Americana de Periodontologia (AAP) (ARMITAGE, 2000).

Como critério de inclusão, todas as participantes deveriam apresentar no mínimo 10 dentes presentes, excluindo-se terceiros molares e dentes indicados para exodontia. Foram consideradas pacientes com periodontite aquelas que apresentavam perda de inserção clínica ≥ 5 mm e profundidade de sondagem ≥ 5 mm em sítios proximais de, no mínimo, dois dentes não adjacentes (TONNETTI & CLAFEY, 2005). Em alusão a nova classificação das doenças periodontais, o quadro clínico periodontal deveria ser compatível, no mínimo, com periodontite estágio III (PAPAPANOU et al., 2018).

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

As pacientes receberam todo o tratamento periodontal na Clínica do Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo – FORP/USP.

4.4 Delineamento do estudo



As pacientes foram convidadas para participar desse estudo no momento da realização da biópsia para a confirmação do câncer de mama. Durante a realização da biópsia, foram coletadas as amostras do fluido do microambiente tumoral. Os

parâmetros clínicos e histológicos referentes ao câncer foram obtidos após laudo final da biópsia.

Os parâmetros clínicos periodontais (IP, SS, PS, NCI) e os fluidos biológicos (FCG e soro) foram avaliados no *baseline*, que correspondeu ao momento inicial do estudo, no qual o tratamento periodontal não cirúrgico (TPNC) também foi realizado. Além disso, sete dias após a TPNC foram coletadas amostras de FCG e soro. A TPNC foi realizada dentro de um intervalo de 24 horas por um profissional especialista em Periodontia. Vale ressaltar que as coletas do *baseline*, o TPNC e as coletas após sete dias aconteceram previamente ao tratamento quimioterápico e/ou cirúrgico para o tumor da mama.

O sangue periférico foi coletado e processado imediatamente pela equipe da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), para a obtenção do soro, o qual foi armazenado a -80°C até o momento da análise laboratorial.

Muitas desistências ocorreram no decorrer do estudo, por diferentes motivos, como dificuldade de comparecer às consultas ou questões psicológicas referentes ao enfrentamento do câncer de mama.

4.5 Calibração do examinador

O índice Kappa foi utilizado para avaliar a calibração do examinador para coleta dos parâmetros clínicos periodontais, a fim de mensurar a concordância diagnóstica intra-examinador. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para critérios de diagnóstico, o índice aceitável de concordância de Kappa deve ser maior ou igual a 0,85 (OMS, 1997). Para isso, foram selecionadas 10 pacientes, com pelo menos 1 par de dentes com profundidade de sondagem ≥ 5 mm. Cada paciente foi examinada duas vezes por meio de sonda periodontal Carolina do Norte (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA), com um intervalo de 48 horas entre o primeiro e segundo exame, a fim de se obter a confiabilidade diagnóstica intra-examinador.

4.6 Coleta dos parâmetros clínicos

Os parâmetros clínicos foram avaliados utilizando a sonda milimetrada Carolina do Norte (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA).

O Índice de Placa (IP) foi avaliado de forma dicotômica e, de acordo com a presença ou ausência de biofilme visível na margem gengival das quatro faces do dente (vestibular, lingual/palatina, mesial e distal), expressa em porcentagem (O'LEARY, DRAKE, NAYLOR, 1972). Também, de maneira dicotômica, o Sangramento à Sondagem (SS) foi expresso em porcentagem e representou presença ou ausência de sangramento em seis sítios por dente, três por vestibular (mesio-vestibular, vestibular e disto-vestibular) e três por lingual/palatina (mesio-lingual/palatina, lingual/palatina e disto-lingual/palatina), até 15 segundos após a realização da profundidade de sondagem (AINAMO & BAY, 1975).

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

4.7 Terapia Periodontal Não Cirúrgica

Inicialmente, todas as participantes participaram de um programa de higiene oral de acordo com suas necessidades específicas. Neste programa, as mulheres receberam instruções para um efetivo autocontrole de placa bacteriana, incluindo informações sobre a técnica de escovação de Bass (Bass, 1954) e limpeza interproximal com fio dental e escovas interdentais. Elas foram também orientadas a utilizarem escovas de cerdas macias e motivadas a escovar o dorso da língua pelo menos uma vez ao dia.

Após as orientações de higiene oral, as participantes foram submetidas à RAR da boca toda, em um intervalo de 24 horas, com instrumentos manuais (Curetas Gracey, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e ultrassônicos. Para finalizar, foi realizado polimento coronário com taças de borracha em todos os elementos dentários presentes na cavidade bucal e aplicação tópica de flúor. Todos os procedimentos da terapia periodontal foram realizados por um periodontista.

Ao final do estudo, todas as mulheres foram encaminhadas para um programa de Terapia Periodontal de Suporte (TPS), no qual as consultas aconteceram a cada três meses.

4.8 Coleta dos parâmetros clínicos e histológicos do tumor de mama

Foram coletados dados dos prontuários eletrônicos e manuais do HCFMRP-USP. Foi registrado o tipo de tumor e seu grau histológico, o qual pode assumir grau 1, 2 ou 3, baseado na diferenciação em relação às células mamárias normais, sendo o grau 1 (bem diferenciado) representado por células com aparência normal e sem crescimento rápido, grau 2 (moderadamente diferenciado) com características mistas e o grau 3 (pouco diferenciado) com células anormais de crescimento rápido e agressivo. Associado a isso, foi observada, nas células malignas, a expressão de receptores para estrógeno (RE) e progesterona (RP), hormônios que estimulam o seu crescimento, e a expressão da proteína HER2.

4.9 Coleta das amostras

4.9.1 Fluido crevicular gengival (FCG)

A placa supragengival nos sítios da coleta foi removida (**Figura 1A**) e, estes, cuidadosamente secos com jatos de ar, posteriormente, isolados com roletes de algodão estéreis, para que não houvesse interferência da saliva. As amostras do FCG foram obtidas a partir de 4 sítios interproximais específicos (dois dentes anteriores e dois dentes posteriores), sendo coletadas 3 amostras de cada sítio, com a utilização de tiras de Periopaper® (Oralflow Inc., Amityville, NY, EUA), totalizando 12 tiras por paciente. Os sítios de coleta tiveram a profundidade de sondagem ≥ 5 mm e sangramento à sondagem positivo, sendo os mesmos sítios utilizados como referência em todos os tempos de coleta. As tiras foram cuidadosamente inseridas junto à margem do sulco gengival, permanecendo por um período de 30 segundos (**Figura 1B**), em seguida colocadas em frascos esterilizados tipo *eppendorf* e encaminhadas para armazenamento a uma temperatura de -80°C , assim permanecendo até o momento da quantificação laboratorial (**Figuras 1C e 1D**). As tiras de papel absorvente que apresentaram sangue foram descartadas.

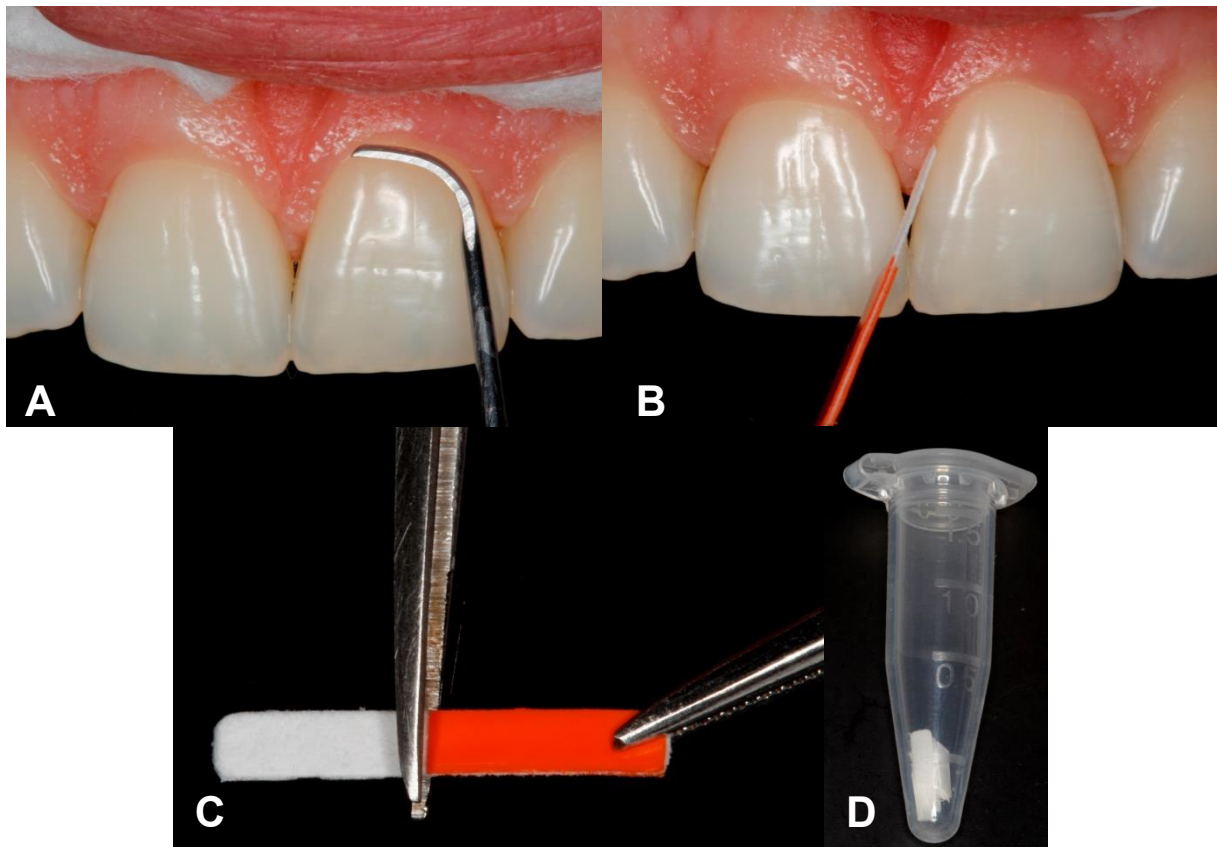


Figura 1: A) Remoção da placa supragengival. B) Coleta de FCG com tiras de Periopaper® (Oralflow Inc., Amityville, NY, EUA). C) Corte das tiras de Periopaper®. D) Tiras de Periopaper® armazenadas em frascos esterilizados tipo *ependorf*.

4.9.2 Fluido do microambiente tumoral (MT)

Durante a realização da *core biopsy*, pela equipe médica do Hospital das Clínicas, foram removidos fragmentos do tecido tumoral mamário, com uma agulha de calibre grosso acoplada a uma pistola especial. Este procedimento foi guiado por ultrassom e realizado sob anestesia local. A *core biopsy* permite visualizar na tela do equipamento de imagem, em tempo real, a área a ser biopsiada, a agulha, e o seu trajeto até a região da alteração, além da quantidade de tecido que deve ser retirada. Após localização da área a ser biopsiada, foi feita assepsia da pele e, em seguida, o trajeto da agulha de biópsia foi anestesiado. Posteriormente, foi realizada uma pequena incisão na pele com bisturi, para facilitar a introdução da agulha de biópsia. Os fragmentos foram obtidos por movimentos da agulha dentro da lesão, a cada incursão, a agulha foi retirada e o fragmento colhido em um frasco. Esse procedimento

foi repetido, no mínimo, por 4 vezes ou até que se obtivesse quantidade suficiente de tecido para análise. Ao término do procedimento, foi feita a compressão local, a fim de evitar sangramento da área biopsiada, e aproximação das bordas da incisão com um curativo. Este procedimento não necessitou de internação.

Após a remoção de cada fragmento do tecido, antes de ser armazenado em um frasco, o material biopsiado foi colocado sobre uma gaze estéril e as amostras de fluido foram obtidas com a utilização de tiras de Periopaper® (Oralflow Inc., Amityville, NY, EUA). De cada fragmento foi feita uma coleta, totalizando 4 amostras por paciente. As tiras foram cuidadosamente inseridas junto ao fragmento tecidual, permanecendo por um período de 15 segundos e, em seguida, colocadas em frascos esterilizados tipo *ependorf*. Estas amostras foram armazenadas a uma temperatura de -80°C, até o processamento laboratorial.

4.9.3 Sangue periférico (soro)

De cada paciente, nos tempos de coleta (*baseline* e após sete dias), foram coletados, a vácuo, 10mL de sangue periférico, por punção venosa, em tubos de coleta (BD Biosciences) contendo gel separador e nenhum tratamento de superfície. As coletas respeitaram as normas de biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) e foram realizadas por profissionais devidamente treinados e capacitados, na referida faculdade. Depois da punção, as amostras ficaram em temperatura ambiente por uma hora para retração do coágulo. Após esse período, as mesmas foram levadas à uma centrífuga e submetidas a 3000 rpm (rotação por minuto), durante 8 minutos. Alíquotas de 1,5mL de soro foram transferidas, por meio de pipetas, para frascos esterilizados tipo *ependorf* devidamente identificados, os quais foram armazenadas a uma temperatura de -80°C até o momento das análises.

4.10 Processamento das amostras

4.10.1 Fluido crevicular gengival (FCG)

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

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

Para quantificação de citocinas (IL-17, TNF-α, IL-1β e TGF-β), foram utilizados kits disponíveis comercialmente (HTH17MAG-14K e TGFBMAG-64K-01 – Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) em um analisador MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a placa filtro foi umedecida com o *washing buffer* e, em seguida, a solução foi aspirada dos poços. *Beads* magnéticas revestidas com os anticorpos monoclonais para os analitos foram

adicionadas aos poços. As amostras e padrões foram transferidas para os poços e incubadas *overnight* (16-18 horas), a 4°C. Os poços foram lavados novamente e uma mistura de anticorpos secundários biotinilados foi adicionada. Após a incubação por uma hora, adicionou-se, aos poços, a Estreptavidina R-ficoeritrina, sendo este conjunto incubado por mais uma hora. Após lavagem para a remoção de reagentes não-ligados, foi adicionado *sheath fluid* (Luminexs, MiraiBio, Alameda, CA, USA) aos poços. As placas foram, então, analisadas pelo MAGPIX®, obtendo-se a intensidade de fluorescência média. Amostras abaixo do limite de detecção foram registradas como zero. Todas as amostras foram analisadas individualmente e os níveis de citocinas foram estimados a partir de uma curva polinomial de quinto grau utilizando-se o *software* xPONENT® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA). Os resultados foram apresentados em pg/mL.

Após essas análises, os valores encontrados para cada uma das citocinas (pg/mL) foram padronizados pelo volume das amostras (mL). Assim, os resultados para IL-17, TNF- α , IL-1 β e TGF- β estão expressos em pg/mL.

4.10.2 Microambiente tumoral e soro

As amostras de fluido do microambiente tumoral seguiram o mesmo padrão de processamento do FCG: descongelamento, adição de inibidor de protease, centrifugação, obtenção do sobrenadante, quantificação da proteína total e análise com os kits HTH17MAG-14K e TGFBMAG-64K-01 (Milliplex™ map, Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA). As amostras de soro foram submetidas diretamente a quantificação da proteína total e análise com os referidos kits no MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA), como descrito anteriormente. De maneira semelhante, os valores encontrados foram padronizados pelo volume das amostras e os resultados expressos em pg/mL.

4.11 Análise estatística

As análises foram realizadas com *software* SPSS 22.0 (*Statistical Package for Social Sciences*) e os gráficos foram obtidos no *software* GraphPad Prism 5.0 para *Windows*). O paciente foi considerado como a unidade estatística (n=17) e o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi adotado.

Na análise descritiva foram informados dados das variáveis analisadas através de média, desvio padrão, mediana, intervalo interquartil, frequência absoluta e seus respectivos percentuais. Por se tratar de uma amostra não probabilística, foram utilizados testes não paramétricos. O teste de Wilcoxon é substituído do teste T pareado com o intuito de verificar se existe diferença na média de postos em dados pareados.

Os gráficos foram apresentados em *box-plot*. Estes apresentam valores reais de cada uma das variáveis avaliadas. No *box-plot*, podemos observar o 1º, 2º e 3º quartis, bem como valores de mínimo e máximo de cada uma das variáveis. Em caso de normalidade dos dados o 2º quartil é exatamente igual a mediana e a média de cada variável.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Todas as 17 participantes passaram por avaliação clínica periodontal, coleta de fluido do MT, de FCG e de sangue periférico (soro) de forma padronizada, sem necessidade de adaptação metodológica. Não foram observadas reações adversas a esses procedimentos. As desistências e recusas iniciais foram motivadas por questões psicológicas relacionadas ao enfrentamento do câncer de mama e pela dificuldade de comparecimento à FORP-USP. A análise descritiva das variáveis avaliadas está presente na **Tabela 1**. A média de idade das pacientes foi de 52 anos e o número de dentes foi em torno de 22 unidades dentárias. Os parâmetros clínicos periodontais (IP, SS, PS e NCI) foram compatíveis com periodontite estágio III generalizada grau B (**Tabela 1**).

Tabela 1: Análise descritiva das variáveis avaliadas (n=17).

Variáveis	$\mu \pm \sigma^*$	Md (IQ)**
Idade	52,47 \pm 9,88	50,00 (44,50 – 59,00)
Número de dentes	22,06 \pm 7,47	23,00 (19,00 – 28,00)
IP baseline	67,00 \pm 24,09	75,00 (43,00 – 86,00)
SS baseline	67,00 \pm 21,08	65,00 (51,00 – 84,00)
PS mm baseline	3,64 \pm 0,33	3,61 (3,44 – 3,99)
NCI mm baseline	3,92 \pm 0,34	3,90 (3,64 – 4,05)

*Média e desvio padrão; **Mediana (intervalo interquartil); IP: índice de placa; SS: sangramento à sondagem; PS: profundidade de sondagem; NCI: nível clínico de inserção.

Todas as mulheres (n=17) estavam no climatério e tiveram diagnóstico primário de carcinoma ductal invasivo. A maioria (n=14) tinha estágio do tumor grau 2 no momento do diagnóstico, assim como tinha receptores para estrógeno e progesterona (RE n=14 / RP n=10) positivos e o gene HER2 negativo (n=10) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Distribuição do grau, RE, RP, HER2 dos participantes avaliados (n=17).

Variáveis	n (%)
Grau	
1	2 (11,80)
2	14 (82,40)
3	1 (5,90)
RE	
Não	4(23,50)
Sim	13 (76,50)
RP	
Não	7 (41,20)
Sim	10 (58,80)
HER2	
Não	10(58,80)
Sim	7 (41,20)

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2.

No início do estudo foi possível identificar os quatro marcadores inflamatórios estudados (IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-17) nos três ambientes (MT, FCG e soro). Na **Tabela 3**, é possível observar a análise descritiva de cada um deles.

Tabela 3: Análise descritiva dos níveis das citocinas avaliadas nos diferentes ambientes no *baseline*.

Variáveis	$\mu \pm \sigma^*$	Md(IQ)**
MT		
TGF- β	2801,47 \pm 6359,69	703,50 (516,00 – 1569,75)
IL-17	15,95 \pm 2,87	15,25 (13,85 – 18,17)
IL- β	8,06 \pm 2,61	7,15 (6,40 – 8,70)
TNF- α	23,16 \pm 54,83	5,15 (4,27 – 14,87)
FCG		
TGF- β	323,65 \pm 84,44	344,00 (241,00 – 344,00)
IL-17	13,51 \pm 2,57	12,60 (11,38 – 15,03)
IL- β	186,37 \pm 200,24	106,53 (36,93 – 327,00)
TNF- α	14,29 \pm 7,09	14,57 (7,92 – 19,67)
SORO		
TGF- β	68299,41 \pm 10839,53	69299,41 (60720,00 – 80160,00)
IL-17	3,42 \pm 2,48	2,50 (2,20 – 3,66)
IL- β	1,73 \pm 1,24	1,43 (1,00 – 2,01)
TNF- α	6,14 \pm 2,93	6,05 (3,49 – 7,21)

*Média e desvio padrão; **Mediana (intervalo interquartil); MT: microambiente tumoral; FCG: fluido crevicular gengival; Valores em pg/mL.

Após uma semana da RAR, foi possível observar que os níveis do TGF- β e IL-17 reduziram, significativamente, no FCG ($p < 0,05$). Associado a isso, as concentrações do TGF- β apresentaram redução no soro ($p < 0,05$). Em relação aos níveis de IL-1 β e TNF- α , no FCG, e as concentrações séricas de IL-1 β , TNF- α e IL-17, não foram observadas reduções significativas ($p > 0,05$). A **Tabela 4** descreve os níveis das citocinas antes e depois da TPNC, destacando a diferença entre os dois tempos.

Tabela 4: Níveis das citocinas no *baseline*, após uma semana da TPNC e a diferença (Δ) entre os dois tempos em FCG e soro.

Variáveis	Baseline*	Uma semana*	Δ^*	p-valor
FCG				
TGF- β	323,65 \pm 84,44	243,88 \pm 11,88	79,76 \pm 84,54	0,004 [†]
IL-17	13,51 \pm 2,57	11,60 \pm 1,00	1,91 \pm 2,85	0,018 [†]
IL- β	186,37 \pm 200,24	97,98 \pm 62,31	88,39 \pm 211,40	0,255
TNF- α	14,29 \pm 7,09	13,06 \pm 10,64	1,22 \pm 7,30	0,381
SORO				
TGF- β	68299,41 \pm 10839,53	19151,31 \pm 9383,78	49148,10 \pm 10894,42	0,000 [†]
IL-17	3,42 \pm 2,48	3,21 \pm 2,83	0,21 \pm 0,77	0,109
IL- β	1,73 \pm 1,24	1,71 \pm 1,28	0,01 \pm 0,14	0,572
TNF- α	6,14 \pm 2,93	6,07 \pm 2,87	0,07 \pm 1,04	0,850

*Média e desvio padrão; [†]Estatisticamente Significante (Teste de Wilcoxon, $p < 0,005$); TPNC: terapia periodontal não cirúrgica; FCG: fluido crevicular gengival; Valores em pg/mL.

As **Figura 2** e a **Figura 3** mostram gráficos em *box-plot* com valores de cada uma das variáveis avaliadas (IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-17), no *baseline* e uma semana após a TPNC, no FCG e no soro, respectivamente. A diferença estatística encontrada se representada pelo $p < 0,05$.

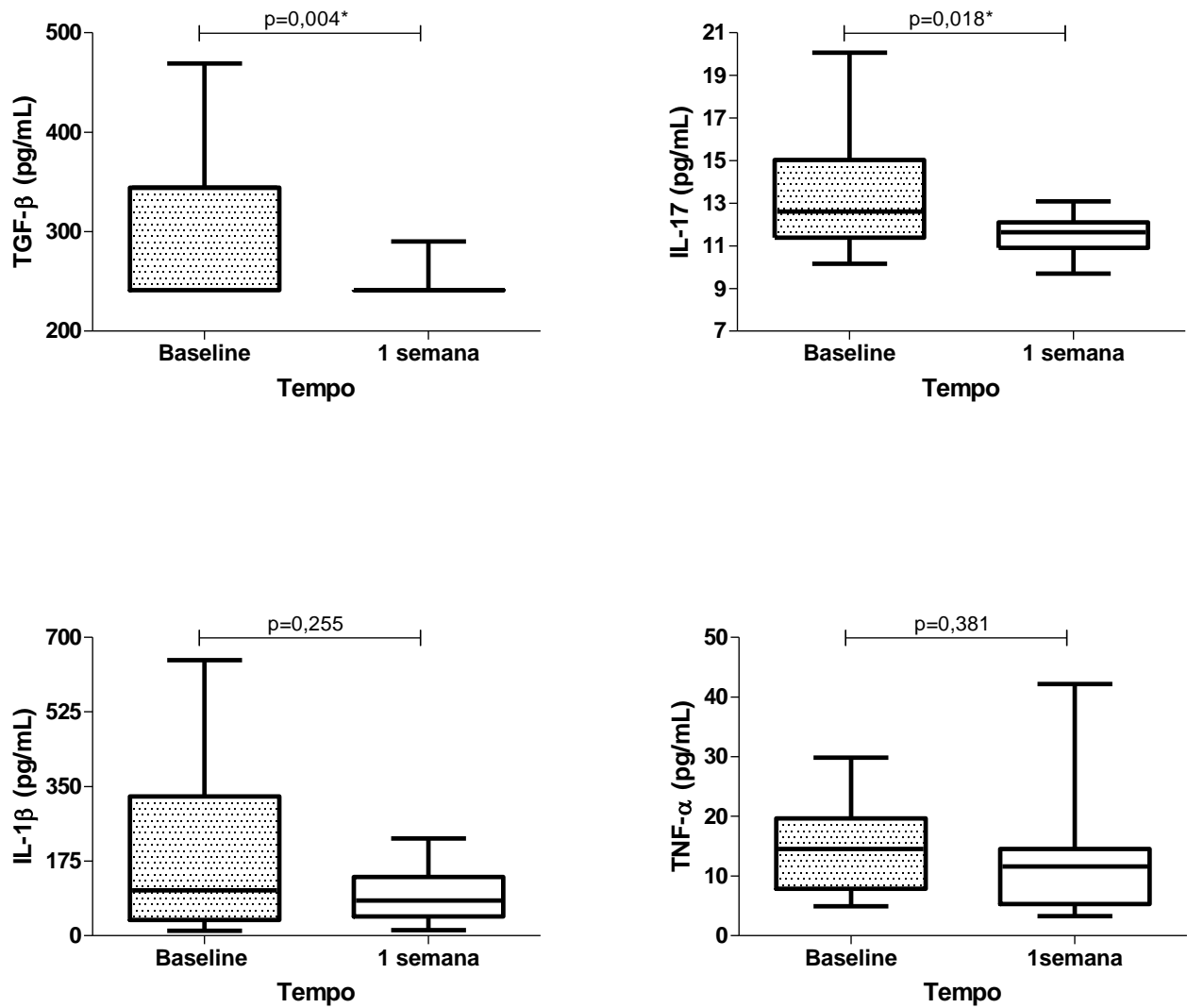


Figura 2: *Box-plot* dos valores das citocinas presentes no FCG analisadas no *baseline* e após uma semana. (*diferença estatisticamente significante [$p < 0,05$]).

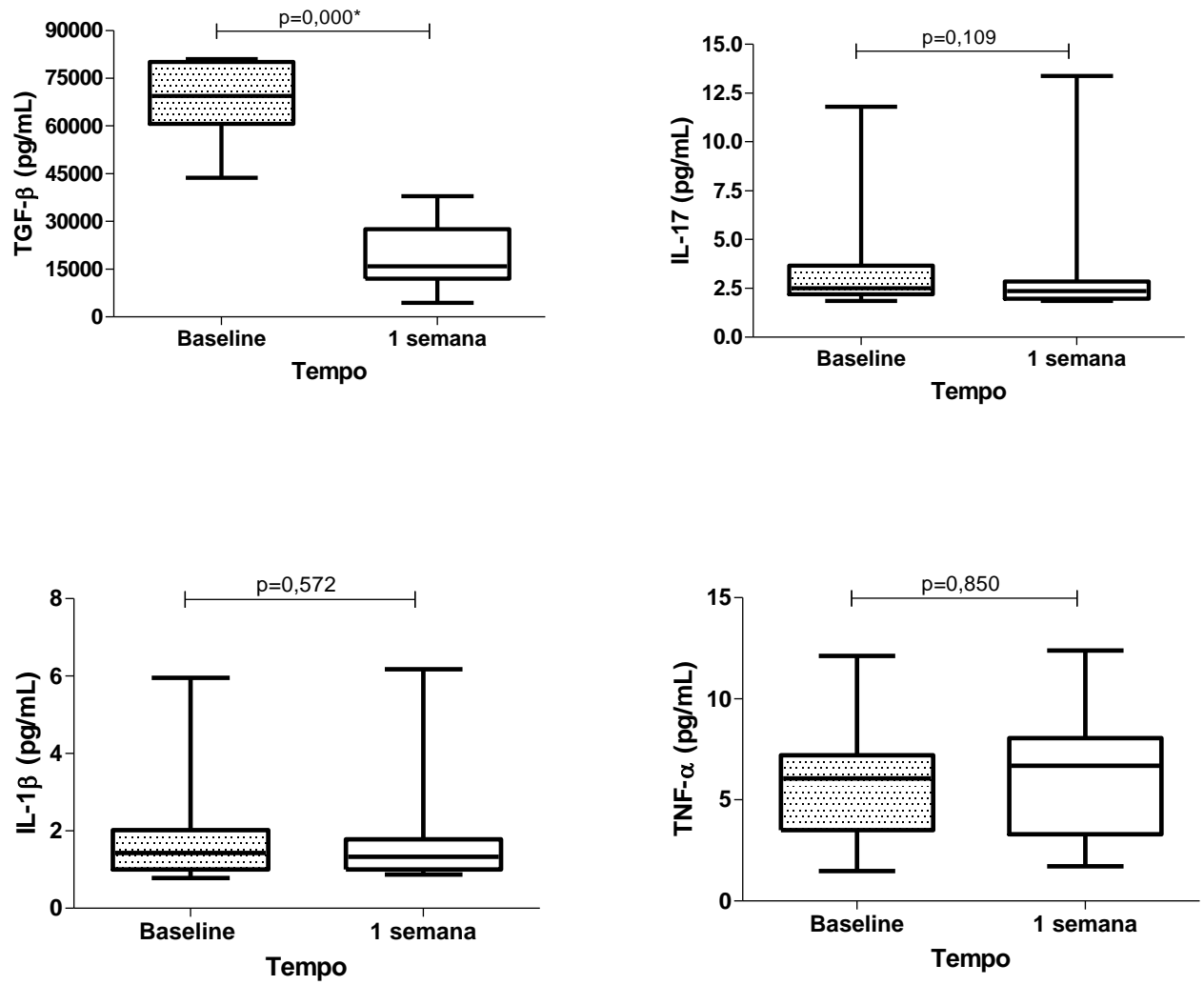


Figura 3: *Box-plot* dos valores das citocinas presentes no soro analisadas no *baseline* e após uma semana. (*diferença estatisticamente significativa [$p < 0,05$]).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo fornece informações importantes e inéditas sobre o impacto da TPNC na redução dos níveis de marcadores inflamatórios locais e sistêmicos em mulheres com câncer de mama e periodontite quando realizada antes da quimioterapia. Essa observação levanta duas perspectivas importantes que conduzem à sugestão de que o tratamento periodontal seja preferido antes da quimioterapia. A primeira, seria a questão de que a eliminação de focos de infecção/inflamação reduz substancialmente os riscos de os pacientes desenvolverem lesões agudas, como, por exemplo, a mucosite, e, conseqüentemente, possíveis bacteremias (sepse) durante o processo do tratamento antineoplásico (VARGAS-VILLAFUERTE et al., 2018; VARGAS-VILLAFUERTE et al., 2021). A segunda, mais diretamente relacionada aos resultados deste estudo, seria a questão de que uma diminuição sistêmica no nível de mediadores inflamatórios poderia ser entendida como coadjuvante importante para o terapia antitumoral, uma vez que tem sido discutido que a interferência em vias de sinalização mediada por citocinas pode trazer benefícios e prevenir possíveis metástases (FABRE et al., 2018; EYRE et al., 2019; TULOTTA et al., 2019; KHOSHAKHLAGH et al., 2019; LI et al., 2020; SONG, WEI & LI, 2021).

Os resultados alcançados mostraram que as concentrações do TGF- β e IL-17 foram estatisticamente reduzidas ($p < 0,05$), nas amostras de FCG, uma semana após a RAR. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Pamuk et al. (2017), o qual encontrou níveis de TGF- β diminuídos após TPNC ($p < 0,05$), em FCG de pacientes com periodontite. Escobar et al. (2018) observaram redução nos níveis de TGF- β , em FCG, após sete dias da RAR. Em relação a IL-17, Mistry et al. (2016), também, encontraram diminuições significativas dessa citocina, em FCG, após três meses da RAR, associada ou não a terapia fotodinâmica antimicrobiana. Reafirmando, assim, o protagonismo da TPNC no controle da inflamação local, independentemente da modalidade de tratamento.

Os níveis do TGF- β , também, estavam reduzidos no soro após TPNC ($p < 0,05$). Khalaf et al. (2014) mostraram que níveis de TGF- β estão mais elevados no soro, no FCG e na saliva de pacientes acometidos por periodontite quando comparados a controles saudáveis, e esse marcador pode influenciar desordens inflamatórias

sistêmicas. Altas concentrações desta citocina têm sido associadas com pior prognóstico do câncer de mama por estar envolvida em processos que estimulam promoção tumoral e metástases, como a angiogênese e evasão do sistema imune (MOSES & BARCELLOS-HOFF, 2011; DRABSCH & DIJKE, 2011; IMAMURA, HIKITA & INOUE, 2012). Recentemente, pesquisadores têm defendido a ideia de que bloqueios das vias de sinalização do TGF- β , por meio de inibidores biológicos ou farmacológicos, podem ser promissores para o campo da imunoterapia do câncer de mama (KHOSHAKHLAGH et al., 2019; LI et al., 2020). Diante disso, a terapia periodontal poderia se comportar como uma ferramenta positiva nesse processo, uma vez que a mesma tem impacto positivo mensurável na inflamação sistêmica (VAN DYKE & VAN WINKELHOFF, 2013; VAN DYKE, BARTOLD, REYNOLDS, 2020). Futuros estudos são necessários para esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos neste processo.

Em relação aos níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α , em FCG, foram observadas reduções, porém, sem significância estatística ($p > 0,05$). Dados anteriores encontraram diminuição significativa desses marcadores em fluido crevicular gengival após a TPNC, em pacientes normosistêmicos (TOKER et al., 2008; DOMINGUEZ et al., 2010; MASTRANGELO et al., 2018). Apesar da ausência de diferença, observamos uma tendência à redução desses marcadores. De maneira semelhante, as concentrações séricas de IL-1 β , TNF- α e IL-17 mostraram tendência à diminuição após uma semana da TPNC ($p > 0,05$). Estudos anteriores, com análise de parâmetros clínicos periodontais e biomarcadores em soro, antes e após TPNC, nos pacientes com periodontite sem alterações sistêmicas, encontraram melhora nos parâmetros clínicos e diminuição nos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-17 (SHIRMOHAMMADI et al., 2013; NILE et al., 2016; MOHAMMAD, 2020). Alterações sistêmicas causadas pelo câncer puderam justificar esses achados, bem como o tamanho da amostra do presente estudo.

Uma atenção especial deve ser dada a estes três marcadores inflamatórios (IL-1 β , TNF- α e IL-17), uma vez que os mesmos têm sido associados a processos que levam à expansão tumoral e metástase e, conseqüentemente, a um pior prognóstico da neoplasia maligna da mama (CHEN et al., 2013; COFFELT et al., 2015; MARTÍNEZ-REZA et al., 2017; TULOTTA et al., 2018; CRUCERIU et al., 2020; BASTID et al., 2020). Por isso, nos últimos anos, a comunidade científica tem proposto estratégias terapêuticas adjuvantes que visam bloquear vias de sinalização

intracelular mediadas por essas citocinas e, assim, prevenir metástase e melhorar o prognóstico do câncer (FABRE et al., 2018; EYRE et al., 2019; TULOTTA et al., 2019; SONG, WEI & LI, 2021). Dessa maneira, a TPNC, centrada na RAR, pode ser ferramenta importante para uma abordagem multidisciplinar em mulheres que apresentam câncer de mama e periodontite.

Interessantemente, o presente estudo dosou os quatro marcadores inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-17) em três ambientes distintos (MT, FCG e soro), sendo possível identificá-los tanto no início do estudo quanto uma semana após da terapia periodontal, nos casos do FCG e soro. Devido a questões éticas, amostras do MT só puderam ser obtidas no momento da realização da biópsia. Essas citocinas têm sido comumente relacionadas a imonopatogênese das duas doenças estudadas, a periodontite e o câncer de mama, e os dados do presente estudo corroboram com a ideia defendida pela literatura atual, de que a inflamação associada ao câncer é similar àquela vista em inflamações crônicas, principalmente, em relação as respostas Th1, Th2 e Th17 (KINANE, 2000; NICOLINI, CARPI, ROSSI, 2006; EBERSOLE et al., 2013; PENDYALA et al., 2013; CHENG et al. 2014; FABRE et al., 2018). Para Freudenheim et al. (2016), a presença de bactérias periodontopatogênicas na região do tumor mamário e mediadores da inflamação crônica tem papel ativo na carcinogênese e poderia explicar uma associação entre ambas as doenças. Güven et al. (2019) e Jia et al. (2020) destacaram que mecanismos imunoinflamatórios derivados de um perfil hiperinflamatório poderiam ser os responsáveis por aumentar as chances do desenvolvimento de câncer naqueles indivíduos que também apresentam doença periodontal.

Tanto a periodontite quanto o câncer de mama são doenças prevalentes em adultos acima dos 35 anos (OPPERMANN et al., 2015; BRASIL, 2021) . No presente trabalho, a média de idade geral das mulheres foi 52,4 anos. Optou-se por manter o mesmo padrão de idade na seleção das pacientes para evitar interferência deste fator nos resultados. Outro aspecto relevante foi o menor número de dentes na população estudada, média de 22 unidades dentárias. Muitos estudos que investigam a associação das doenças periodontais e câncer têm correlacionado a perda de dentes com o aumento do risco de neoplasias malignas (HUJOEL et al., 2003; SADIGHI SHAMAMI, AMINI, 2011; TANWIR, SADIA, DUASHAUKAT, 2012; JAVED & WARNAKULASURIYA, 2016; MICHAUD et al., 2016). Amódio et al. (2014) e Vargas-Villafuerte et al. (2016) também encontraram menos unidades dentárias

remanescentes em uma população com as mesmas características deste estudo. Nesse contexto, Michaud et al. (2008) sugerem que a DP pode ser um marcador de susceptibilidade do sistema imune e/ou pode afetar diretamente o risco de câncer. Entretanto, Söder et al. (2011) destacaram que a perda dentária pode ocorrer por outros motivos além da DP, como cáries e abscessos endodônticos, os quais também se caracterizam por infecção/inflamação crônica.

Os parâmetros clínicos periodontais, tais como PS, NCI, IP e SS auxiliam o Periodontista na avaliação da destruição dos tecidos periodontais, bem como no grau de inflamação que acomete estes tecidos, sendo fundamentais para um correto diagnóstico e tratamento das DP (O'LEARY, DRAKE, NAYLOR, 1972; AINAMO & BAY, 1975; COBB, 2002). Observou-se, nesse trabalho, que estes parâmetros caracterizavam um padrão similar de periodontite, representado por maiores valores de PS, NCI, PS e SS, quando comparados a indivíduos periodontalmente saudáveis (COBB, 2002). Ainda nesse contexto, ressalta-se que os resultados clínicos encontrados foram adaptados aos critérios estabelecidos pelo *Workshop Internacional para Classificação da Doença Periodontal*, de 2017 (PAPAPANOU et al., 2018). Dessa forma, as pacientes apresentaram diagnóstico de periodontite estágio III generalizada grau B. Vale destacar que, apesar de a periodontite ser associada a muitas condições sistêmicas, tais como, doença pulmonar, complicações na gravidez, baixo peso ao nascimento, diabetes, doença cardiovascular, doença renal crônica e artrite reumatóide (LINDEN, LYONS, SCANNAPIECO, 2013), não foram incluídas mulheres com outras doenças sistêmicas, além do carcinoma ductal invasivo, para evitar interferência nos resultados.

Os dados relacionados ao diagnóstico do câncer de mama mostraram que as pacientes tinham padrão semelhante da neoplasia, uma vez que 100% (n=17) apresentaram diagnóstico de carcinoma ductal invasivo (carcinoma invasivo de mama não especial) e ausência de metástase, no momento das coletas. Das 17 participantes, 82,40% (n=14) apresentavam grau histológico 2 (moderadamente diferenciado), 76,50% (n=13) RE positivo, 58,80% (n=10) RP positivo e 58,80% (n=10) HER2 negativo, o que sugere um curso mais favorável da doença. A presença de receptores (R-positivos) relaciona-se ao crescimento lento do tumor e melhor resposta à terapia hormonal quando comparada a ausência de receptores (R-negativos). Por outro lado, HER2-positivo correlaciona-se a crescimento rápido e agressivo do tumor (AGUIAR et al., 2013; BRASIL, 2021). Nesta pesquisa, optou-se por recrutar mulheres

diagnosticadas com câncer pela primeira vez e que não haviam sido submetidas a nenhum tratamento, como quimioterapia, radioterapia ou mastectomia, para evitar a interferência dessas terapias nas condições periodontais e sistêmicas, diminuindo o número de vieses e comprometimento dos resultados. O tratamento antineoplásico induz vários efeitos colaterais tanto na cavidade bucal quanto na condição sistêmica dos indivíduos. Por exemplo, durante a quimioterapia, a gengiva, bem como toda cavidade oral, pode ser afetada devido à estomatotoxicidade direta da droga quimioterápica, a qual pode induzir gengivite marginal e periodontite ou agravar condições periodontais pré-existentes, além do risco de complicações sistêmicas resultantes da imunossupressão (HESPANHOL et al., 2010; VARGAS-VILLAFUERTE et al., 2016).

Algumas limitações precisam ser levadas em consideração neste trabalho como, por exemplo, o pequeno tamanho da amostra que pode ter contribuído para os resultados encontrados nesse trabalho. No início do estudo, 70 mulheres foram convidadas para participar, porém muitas desistiram devido às questões psicológicas do enfrentamento ao câncer de mama e devido à dificuldade de comparecer às consultas odontológicas. Outra questão, foi a dificuldade do acompanhamento longitudinal, principalmente, pela desistência de muitas mulheres que sofreram os efeitos colaterais da quimioterapia. Diante disso, sugere-se que estudos futuros acompanhem, a longo prazo, os efeitos da TPNC em mulheres com câncer de mama e correlacionem os achados com o prognóstico e a resposta ao tratamento antineoplásico.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os quatro marcadores inflamatórios (TGF- β , IL-17, IL-1 β e TNF- α) foram identificados nos três ambientes avaliados. O tratamento periodontal não cirúrgico, centrado na raspagem e alisamento radicular, diminuiu os níveis de TGF- β no fluido crevicular gengival e no soro de mulheres com câncer de mama e periodontite, antes da quimioterapia. Associado a isso, os níveis de IL-17 também foram reduzidos no FCG dessas pacientes. Apesar de não serem observadas diferenças estatísticas nas concentrações séricas da IL-17, IL-1 β e TNF- α , estas mostraram uma tendência a diminuição após terapia periodontal. Diante desses achados, a TPNC pode ser uma ferramenta importante na abordagem multidisciplinar de mulheres com câncer de mama e periodontite, devendo ser preconizada antes de se iniciar a quimioterapia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGUIAR, F. N.; MENDES, H. N.; BACCHI, C. E.; CARVALHO, F. M. Comparison of nuclear grade and immunohistochemical features in situ and invasive components of ductal carcinoma of breast. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 35, n. 3, p. 97-102, Mar 2013.

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**, 25, n. 4, p. 229-235, Dec 1975.

AL-HAMOUDI, N.; ALSAHHAF, A.; AL DEEB, M.; ALRABIAH, M. *et al.* Effect of scaling and root planing on the expression of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-9, IL-10, and IL-13) in the gingival crevicular fluid of electronic cigarette users and non-smokers with moderate chronic periodontitis. **J Periodontal Implant Sci**, 50, n. 2, p. 74-82, Apr 2020.

AMÓDIO, J.; PALIOTO, D. B.; CARRARA, H. H.; TIEZZI, D. G. *et al.* Oral health after breast cancer treatment in postmenopausal women. **Clinics (Sao Paulo)**, 69, n. 10, p. 706-708, Dec 2014.

ANDRADE, P. F.; GARLET, G. P.; SILVA, J. S.; FERNANDES, P. G. *et al.* Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to an association of non-surgical and surgical periodontal treatment in modulation of gene expression: a human study. **J Photochem Photobiol B**, 126, p. 119-125, Sep 2013.

ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Northwest Dent**, v. 79, n. 6, p. 31-5, 2000 Nov-Dec 2000.

AWANG, R. A.; LAPPIN, D. F.; MACPHERSON, A.; RIGGIO, M. *et al.* Clinical associations between IL-17 family cytokines and periodontitis and potential differential roles for IL-17A and IL-17E in periodontal immunity. **Inflamm Res**, 63, n. 12, p. 1001-1012, Dec 2014.

BABEL, N. *et al.* Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 77, n. 12, p. 1978-83, Dec 2006.

BASS, C. C. An effective method of personal oral hygiene: part II. **J La State Med Soc.** v.106, p.100-12, 1954.

BEKLEN, A.; AINOLA, M.; HUKKANEN, M.; GURGAN, C. *et al.* MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. **J Dent Res**, 86, n. 4, p. 347-351, Apr 2007.

BECERIK, S. *et al.* Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 83, n. 10, p. 1304-13, Oct 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional do Controle do Câncer de Mama.** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoos_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/conceito_magnitude> Acesso em: 10 jan. 2021.

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

CATON, J. G.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T.; CHAPPLE, I. L. C. *et al.* A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Periodontol**, 89 Suppl 1, p. S1-S8, 06 2018.

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

CHENG, W. C.; HUGHES, F. J.; TAAMS, L. S. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 6, p. 541-9, Jun 2014.

CHENG, R.; BILLET, S.; LIU, C.; HALDAR, S. *et al.* Periodontal inflammation recruits distant metastatic breast cancer cells by increasing myeloid-derived suppressor cells. **Oncogene**, 39, n. 7, p. 1543-1556, 02 2020.

CHITRAPRIYA, M. N.; RAO, S. R.; LAVU, V. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. **J Indian Soc Periodontol**, v. 19, n. 1, p. 14-7, Jan-Feb 2015.

COBB, C. M. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. **J Clin Periodontol**, 29 Suppl 2, p. 6-16, May 2002.

COFFELT, S. B.; KERSTEN, K.; DOORNEBAL, C. W.; WEIDEN, J. *et al.* IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. **Nature**, 522, n. 7556, p. 345-348, Jun 18 2015.

CRUCERIU, D.; BALDASICI, O.; BALACESCU, O.; BERINDAN-NEAGOE, I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. **Cell Oncol (Dordr)**, 43, n. 1, p. 1-18, Feb 2020.

DAĞ, A.; FIRAT, E. T.; ARIKAN, S.; KADIROĞLU, A. K. *et al.* The effect of periodontal therapy on serum TNF-alpha and HbA1c levels in type 2 diabetic patients. **Aust Dent J**, 54, n. 1, p. 17-22, Mar 2009.

DOMÍNGUEZ, A.; GÓMEZ, C.; GARCÍA-KASS, A. I.; GARCÍA-NUÑEZ, J. A. IL-1beta, TNF-alpha, total antioxidative status and microbiological findings in chronic periodontitis treated with fluorescence-controlled Er:YAG laser radiation. **Lasers Surg Med**, 42, n. 1, p. 24-31, Jan 2010.

DRABSCH, Y.; TEN DIJKE, P. TGF- β signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 16, n. 2, p. 97-108, Jun 2011.

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

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

EBERSOLE, J. L.; DAWSON, D. R., 3RD; MORFORD, L. A.; PEYYALA, R. *et al.* Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. **Periodontol 2000**, 62, n. 1, p. 163-202, Jun 2013.

EYRE, R.; ALFÉREZ, D. G.; SANTIAGO-GÓMEZ, A.; SPENCE, K. *et al.* Microenvironmental IL1 β promotes breast cancer metastatic colonisation in the bone via activation of Wnt signalling. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 5016, 11 2019.

ESCOBAR, G. F.; ABDALLA, D. R.; BEGHINI, M.; GOTTI, V. B. *et al.* Levels of Pro and Anti-inflammatory Cytokines and C-Reactive Protein in Patients with Chronic Periodontitis Submitted to Nonsurgical Periodontal Treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**, 19, n. 7, p. 1927-1933, Jul 2018.

FABRE, J. A. S.; GIUSTINNIANI, J.; GARBAR, C.; MERROUCHE, Y. *et al.* The Interleukin-17 Family of Cytokines in Breast Cancer. **Int J Mol Sci**, 19, n. 12, Dec 2018.

FREUDENHEIM, J. L.; GENCO, R. J.; LAMONTE, M. J.; MILLEN, A. E. *et al.* Periodontal Disease and Breast Cancer: Prospective Cohort Study of Postmenopausal Women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 25, n. 1, p. 43-50, Jan 2016.

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

GÜVEN, D. C.; DIZDAR, Ö.; AKMAN, A. C.; BERKER, E. *et al.* Evaluation of cancer risk in patients with periodontal diseases. **Turk J Med Sci**, 49, n. 3, p. 826-831, 06 2019.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Mol Oral Microbiol**, 27, n. 6, p. 409-419, Dec 2012.

HAJISHENGALLIS, G; CHAVAKIS, T; LAMBRIS. J.D. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. **Periodontol 2000**, 84, n. 1, p.14-34, Oct 2020.

- HERALGI, R.; A, S.; S, A. M.; ASHIT, B. G. *et al.* Estimation Of Tumour Necrosis Factor-Alpha Levels In Gingival Crevicular Fluid In Periodontal Health And Disease In An Indian Population-A Clinical And Biochemical Study},. **International Journal of Contemporary Dentistry**, 2, p. 7, 2011.
- HESPANHOL, F. L.; TINOCO, E. M.; TEIXEIRA, H. G.; FALABELLA, M. E. *et al.* [Buccal manifestations in patients submitted to chemotherapy]. **Cien Saude Colet**, 15 Suppl 1, p. 1085-1094, Jun 2010.
- HUJOEL, P. P.; DRANGSHOLT, M.; SPIEKERMAN, C.; WEISS, N. S. An exploration of the periodontitis-cancer association. **Ann Epidemiol**, 13, n. 5, p. 312-316, May 2003.
- HUSSAIN BOKHARI, S. A.; KHAN, A. A.; TATAKIS, D. N.; AZHAR, M. *et al.* Non-surgical periodontal therapy lowers serum inflammatory markers: a pilot study. **J Periodontol**, 80, n. 10, p. 1574-1580, Oct 2009.
- IACOPINO, A. M.; CUTLER, C. W. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. **J Periodontol**, 71, n. 8, p. 1375-1384, Aug 2000.
- IMAMURA, T.; HIKITA, A.; INOUE, Y. The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. **Breast Cancer**, 19, n. 2, p. 118-124, Apr 2012.
- JAVED, F.; WARNAKULASURIYA, S. Is there a relationship between periodontal disease and oral cancer? A systematic review of currently available evidence. **Crit Rev Oncol Hematol**, 97, p. 197-205, Jan 2016.
- JIA, M.; WU, Z.; VOGTMANN, E.; O'BRIEN, K. M. *et al.* The Association Between Periodontal Disease and Breast Cancer in a Prospective Cohort Study. **Cancer Prev Res (Phila)**, 13, n. 12, p. 1007-1016, 12 2020.
- KAMIL, W.; AL HABASHNEH, R.; KHADER, Y.; AL BAYATI, L. *et al.* Effects of nonsurgical periodontal therapy on C-reactive protein and serum lipids in Jordanian adults with advanced periodontitis. **J Periodontal Res**, 46, n. 5, p. 616-621, Oct 2011.
- KHALAF, H.; LÖNN, J.; BENGTSSON, T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF- β 1 as a marker for disease progression. **Cytokine**, 67, n. 1, p. 29-35, May 2014.
- KHOSHAKHLAGH, M.; SOLEIMANI, A.; BINABAJ, M. M.; AVAN, A. *et al.* Therapeutic potential of pharmacological TGF- β signaling pathway inhibitors in the pathogenesis of breast cancer. **Biochem Pharmacol**, 164, p. 17-22, 06 2019.
- KINANE, D. F. Aetiology and pathogenesis of periodontal disease. **Ann R Australas Coll Dent Surg**, 15, p. 42-50, Oct 2000.

- KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontol** 2000, 14, p. 33-53, Jun 1997.
- LI, S.; LIU, M.; DO, M. H.; CHOU, C. *et al.* Cancer immunotherapy via targeted TGF- β signalling blockade in T. **Nature**, 587, n. 7832, p. 121-125, 11 2020.
- LINDEN, G. J.; LYONS, A.; SCANNAPIECO, F. A. Periodontal systemic associations: review of the evidence. **J Periodontol**, 84, n. 4 Suppl, p. S8-s19, Apr 2013.
- LIN, D.; LI, L.; SUN, Y.; WANG, W. *et al.* IL-17 regulates the expressions of RANKL and OPG in human periodontal ligament cells via TRAF6/TBK1-JNK/NF- κ B pathways. **Immunology**, Sep 2014.
- LIAO, C. H.; FEI, W.; SHEN, Z. H.; YIN, M. P. *et al.* Expression and distribution of TNF- α and PGE2 of periodontal tissues in rat periodontitis model. **Asian Pac J Trop Med**, 7, n. 5, p. 412-416, May 2014.
- LIU, D.; WANG, X.; CHEN, Z. Tumor Necrosis Factor- α , a Regulator and Therapeutic Agent on Breast Cancer. **Curr Pharm Biotechnol**, 17, n. 6, p. 486-494, 2016.
- MA, Y.; REN, Y.; DAI, Z. J.; WU, C. J. *et al.* IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. **Adv Clin Exp Med**, 26, n. 3, p. 421-426, 2017 May-Jun 2017.
- MACCALLI, C.; SCARAMUZZA, S.; PARMIANI, G. TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+ T lymphocytes) in the control of human tumors. **Cancer Immunol Immunother**, 58, n. 5, p. 801-808, May 2009.
- MARTÍNEZ-REZA, I.; DÍAZ, L.; GARCÍA-BECERRA, R. Preclinical and clinical aspects of TNF- α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer. **J Biomed Sci**, 24, n. 1, p. 90, Dec 2017.
- MASTRANGELO, F.; DEDOLA, A.; CATTONI, F.; FERRINI, F. *et al.* Etiological periodontal treatment with and without low-level laser therapy on IL-1 β level in gingival crevicular fluid: an in vivo multicentric pilot study. **J Biol Regul Homeost Agents**, 32, n. 2, p. 425-431, 2018 Mar-Apr 2018.
- MICHAUD, D. S.; KELSEY, K. T.; PAPATHANASIOU, E.; GENCO, C. A. *et al.* Periodontal disease and risk of all cancers among male never smokers: an updated analysis of the Health Professionals Follow-up Study. **Ann Oncol**, Jan 24 2016.
- MICHAUD, D. S.; LIU, Y.; MEYER, M.; GIOVANNUCCI, E. *et al.* Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. **Lancet Oncol**, 9, n. 6, p. 550-558, Jun 2008.
- MICHAUD, D. S.; LU, J.; PEACOCK-VILLADA, A. Y.; BARBER, J. R. *et al.* Periodontal Disease Assessed Using Clinical Dental Measurements and Cancer Risk in the ARIC Study. **J Natl Cancer Inst**, 110, n. 8, p. 843-854, 08 2018.

MISTRY, A.; PEREIRA, R.; KINI, V.; PADHYE, A. Effect of Combined Therapy Using Diode Laser and Photodynamic Therapy on Levels of IL-17 in Gingival Crevicular Fluid in Patients With Chronic Periodontitis. **J Lasers Med Sci**, 7, n. 4, p. 250-255, 2016.

MOHAMMAD, C. A. Efficacy of Curcumin Gel on Zinc, Magnesium, Copper, IL-1. **Biomed Res Int**, 2020, p. 8850926, 2020.

MOREIRA, A. L.; NOVAES, A. B.; GRISI, M. F.; TABA, M. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. **J Periodontol**, 86, n. 3, p. 376-386, Mar 2015.

MOSES, H.; BARCELLOS-HOFF, M. H. TGF-beta biology in mammary development and breast cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 3, n. 1, p. a003277, Jan 2011.

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

MUKAIDA, N.; HARADA, A.; YASUMOTO, K.; MATSUSHIMA, K. Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). **Microbiol Immunol**, 36, n. 8, p. 773-789, 1992.

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

NILE, C. J.; APATZIDOU, D. A.; AWANG, R. A.; RIGGIO, M. P. *et al.* The effect of periodontal scaling and root polishing on serum IL-17E concentrations and the IL-17A:IL-17E ratio. **Clin Oral Investig**, 20, n. 9, p. 2529-2537, Dec 2016.

NOVAES, A. B.; SCHWARTZ-FILHO, H. O.; DE OLIVEIRA, R. R.; FERES, M. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. **Lasers Med Sci**, 27, n. 2, p. 389-395, Mar 2012.

NWIZU, N. N.; MARSHALL, J. R.; MOYSICH, K.; GENCO, R. J. *et al.* Periodontal Disease and Incident Cancer Risk among Postmenopausal Women: Results from the Women's Health Initiative Observational Cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 26, n. 8, p. 1255-1265, 08 2017.

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

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

PAMUK, F.; LÜTFIOĞLU, M.; AYDOĞDU, A.; KOYUNCUOĞLU, C. Z. *et al.* The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of transforming growth factor-beta 1, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 in smoking and non-

smoking chronic periodontitis patients: A split-mouth, randomized control study. **J Periodontal Res**, 52, n. 5, p. 872-882, Oct 2017.

PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; DIETRICH, T. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Periodontol**, 89 Suppl 1, p. S173-S182, 06 2018.

PENDYALA, G.; JOSHI, S.; CHAUDHARI, S.; GANDHAGE, D. Links demystified: Periodontitis and cancer. **Dent Res J (Isfahan)**, 10, n. 6, p. 704-712, Nov 2013.

PRADEEP, A. R.; RAJ, S.; ARUNA, G.; CHOWDHRY, S. Gingival crevicular fluid and plasma levels of neuropeptide Substance-P in periodontal health, disease and after nonsurgical therapy. **J Periodontal Res**, 44, n. 2, p. 232-237, Apr 2009.

RADAFSHAR, G.; SHAD, B.; ARIAMAJD, E.; GERANMAYEH, S. Effect of intensive non-surgical treatment on the level of serum inflammatory markers in advanced periodontitis. **J Dent (Tehran)**, 7, n. 1, p. 24-30, 2010.

RENVERT, S.; LINDAHL, C.; ROOS-JANSÅKER, A. M.; LESSEM, J. Short-term effects of an anti-inflammatory treatment on clinical parameters and serum levels of C-reactive protein and proinflammatory cytokines in subjects with periodontitis. **J Periodontol**, 80, n. 6, p. 892-900, Jun 2009.

SADIGHI SHAMAMI, M.; AMINI, S. Periodontal Disease and Tooth Loss as Risks for Cancer: A Systematic Review of the Literature. **Iran J Cancer Prev**, 4, n. 4, p. 189-198, 2011.

SANCHEZ, G. A.; MIOZZA, V. A.; DELGADO, A.; BUSCH, L. Salivary IL-1beta and PGE2 as biomarkers of periodontal status, before and after periodontal treatment. **J Clin Periodontol**, 40, n. 12, p. 1112-1117, Dec 2013.

SFREDDO, C. S.; MAIER, J.; DE DAVID, S. C.; SUSIN, C. *et al.* Periodontitis and breast cancer: A case-control study. **Community Dent Oral Epidemiol**, 45, n. 6, p. 545-551, 12 2017.

SHAO, J.; WU, L.; LENG, W. D.; FANG, C. *et al.* Periodontal Disease and Breast Cancer: A Meta-Analysis of 1,73,162 Participants. **Front Oncol**, 8, p. 601, 2018.

SHI, T.; MIN, M.; SUN, C.; ZHANG, Y. *et al.* Periodontal disease and susceptibility to breast cancer: A meta-analysis of observational studies. **J Clin Periodontol**, 45, n. 9, p. 1025-1033, 09 2018.

SHIMADA, Y.; KOMATSU, Y.; IKEZAWA-SUZUKI, I.; TAI, H. *et al.* The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. **J Periodontol**, 81, n. 8, p. 1118-1123, Aug 2010.

SHIRMOHAMMADI, A.; BABALOO, Z.; ESKANDARI, A.; PURABBAS, R. *et al.* The Effects of One-Stage Full-Mouth Disinfection and Qua-drant-Wise Scaling and Root

Planing on Serum Levels of IL-17 and IL-1 β and Clinical Parameters (A randomized Controlled Trial Study). **J Dent (Tehran)**, 10, n. 3, p. 248-255, May 2013.

SNOUSSI, K.; STROSBURG, A. D.; BOUAOUINA, N.; BEN AHMED, S. *et al.* Genetic variation in pro-inflammatory cytokines (interleukin-1beta, interleukin-1alpha and interleukin-6) associated with the aggressive forms, survival, and relapse prediction of breast carcinoma. **Eur Cytokine Netw**, 16, n. 4, p. 253-260, Dec 2005.

SONG, X.; WEI, C.; LI, X. The potential role and status of IL-17 family cytokines in breast cancer. **Int Immunopharmacol**, 95, p. 107544, Jun 2021.

SÖDER, B.; YAKOB, M.; MEURMAN, J. H.; ANDERSSON, L. C. *et al.* Periodontal disease may associate with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 127, n. 2, p. 497-502, Jun 2011.

TANWIR, F.; SADIA, B.; DUASHAUKAT, B. Relationship between periodontal disease, tooth loss and cancer. **Pakistan Oral & Dental Journal**. 32 2012.

TENG, Y. T. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in Actinobacillus actinomycetemcomitans-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. **Infect Immun**, 70, n. 9, p. 5269-5273, Sep 2002.

TOKER, H.; POYRAZ, O.; EREN, K. Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol**, 35, n. 6, p. 507-513, Jun 2008.

TONETTI, M.S.; CLAFFEY, N.; EUROPEAN WORKSHOP IN PERIODONTOLOGY GROUP C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. **J Clin Periodontol**. v. 32, n. 6, p. 210-3, 2005.

TULOTTA, C.; LEFLEY, D. V.; FREEMAN, K.; GREGORY, W. M. *et al.* Endogenous Production of IL1B by Breast Cancer Cells Drives Metastasis and Colonization of the Bone Microenvironment. **Clin Cancer Res**, 25, n. 9, p. 2769-2782, 05 2019.

TÜTER, G.; SERDAR, M.; KURTIŞ, B.; WALKER, S. G. *et al.* Effects of scaling and root planing and subantimicrobial dose doxycycline on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-8, -13 and serum levels of HsCRP in patients with chronic periodontitis. **J Periodontol**, 81, n. 8, p. 1132-1139, Aug 2010.

USTAOĞLU, G.; GÖLLER BULUT, D.; ÜYETÜRK, Ü.; UYSAL, Ö. Evaluation of periodontal health in breast cancer patients undergoing tamoxifen or aromatase inhibitors drugs therapy: A cross-sectional study. **Spec Care Dentist**, 41, n. 1, p. 41-48, Jan 2021.

VAN DYKE, T. E.; VAN WINKELHOFF, A. J. Infection and inflammatory mechanisms. **J Periodontol**, 84, n. 4 Suppl, p. S1-7, Apr 2013.

VAN DYKE, T.E; BARTOLD, P.M; REYNOLDS, E.C. The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. **Front Immunol**, 11, n.511, p.1-9, Mar 2020.

VARGAS-VILLAFUERTE, K. R.; DANTAS, F. T.; MESSORA, M. R.; NOVAES, A. B. *et al.* Preliminary Results of Non-Surgical Periodontal Treatment in Patients With Breast Cancer Undergoing Chemotherapy. **J Periodontol**, 87, n. 11, p. 1268-1277, Nov 2016.

VARGAS-VILLAFUERTE, K. R.; MARTINEZ, C. J. H; DANTAS, F. T.; CARRARA, H. H. A. *et al.* The impact of chemotherapeutic treatment on the oral microbiota of patients with cancer: a systematic review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 126, n.6, p. 552-566, Jun 2018.

VARGAS-VILLAFUERTE, K. R.; DANTAS, F. T.; TABA JR, M.; MESSORA, M. R. *et al.* Effects of non-surgical periodontal therapy on the cytokine profile in gingival crevicular fluid of breast cancer patients with periodontitis undergoing chemotherapy. **Support Care Cancer**, 29, n.12, p. 7505-7513, Jun 2021.

WILLERSHAUSEN, I.; SCHMIDTMANN, I.; AZARIPOUR, A.; KLEDTKE, J. *et al.* Association between breast cancer chemotherapy, oral health and chronic dental infections: a pilot study. **Odontology**, 107, n. 3, p. 401-408, Jul 2019.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

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

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

Pesquisador: Daniela Bazan Palioto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37030514.7.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao 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: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP



Continuação do Parecer: 922.793

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

RIBEIRAO PRETO, 19 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-0251 **Fax:** (16)3602-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Endereço do participante-voluntário(a)
 Domiciliado (Rua, Avenida, Conjunto):
 Bloco/ N°/ Complemento:
 Bairro/ Cidade:
 Telefone:
 E- mail

Endereço do responsável pela pesquisa

Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

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

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

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

ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *SUPPORTIVE CARE IN CANCER*

22/11/2021 09:58

Gmail - Supportive Care in Cancer - Submission Notification to co-author - [EMID:b0049987d8addfef]



Felipe Torres <dantasft@gmail.com>

Supportive Care in Cancer - Submission Notification to co-author - [EMID:b0049987d8addfef]

1 mensagem

Editorial Office <em@editorialmanager.com>
Responder a: Editorial Office <editorjscc@mascc.org>
Para: Felipe Torres Dantas <dantasft@gmail.com>

22 de novembro de 2021 09:10

Re: "Effect of non-surgical periodontal therapy on levels of inflammatory markers in gingival crevicular fluid and serum of patients with breast cancer and periodontitis."

Full author list: Felipe Torres Dantas; Pedro Henrique Felix Silva; Hélio Humberto Angotti Carrara; Francisco Jose Candido dos Reis; Fabiani Gai Frantz; Michel Reis Messoria; Flávia Aparecida Chaves Furlaneto Messoria; Daniela Bazan Palioto

Dear Dr Felipe Dantas,

We have received the submission entitled: "Effect of non-surgical periodontal therapy on levels of inflammatory markers in gingival crevicular fluid and serum of patients with breast cancer and periodontitis." for possible publication in *Supportive Care in Cancer*, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr Daniela Bazan Palioto who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Supportive Care in Cancer

ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO AO PERIÓDICO *ANTICANCER RESEARCH*

21/11/2021 01:31

E-mail de Universidade de São Paulo - AR, Submission Acknowledgement



Felipe Torres Dantas <ftdantas@usp.br>

AR, Submission Acknowledgement

1 mensagem

liar-anticancer <editor@iiar-anticancer.org>
Responder a: liar-anticancer <editor@iiar-anticancer.org>
Para: Felipe Torres Dantas <ftdantas@usp.br>

21 de novembro de 2021 01:30

Thank you for submitting the manuscript, "A new method for obtaining tumor interstitial fluid applied to cytokine analysis in breast carcinoma samples" to AR.

Through the online journal management system you will be able to track its progress through the editorial process by [logging into your account](#).

If you have any questions please contact us.

This communication is confidential and intended solely for the individual(s) to whom, or entity to which it is addressed. If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any review, dissemination, distribution, copying or any use whatsoever of this communication is strictly prohibited. If you have received this communication in error please notify the sender at her e-mail address and delete the message and any attachments immediately. Internet communications cannot be guaranteed to be secure or error-free as they could be intercepted, corrupted or altered, therefore the sender does not accept any liability for any errors or omissions.