



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS INTEGRADAS**

KARINE LIMA KIDO DE CARVALHO

**QUANTIFICAÇÃO DE *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS E *PORPHYROMONAS*
GINGIVALIS EM PACIENTES DESDENTADOS IRRADIADOS
EM CABEÇA E PESCOÇO: CASO CONTROLE**

Cuiabá, MT
2016

KARINE LIMA KIDO DE CARVALHO

**QUANTIFICAÇÃO DE *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS E *PORPHYROMONAS*
GINGIVALIS EM PACIENTES DESDENTADOS IRRADIADOS
EM CABEÇA E PESCOÇO: CASO CONTROLE**

Dissertação apresentada à Unic, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Evaristo Ricci Volpato.

Cuiabá, MT
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais para Catalogação na Publicação (CIP)

C331e Carvalho, Karine Lima Kido de.
Quantificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes desdentados irradiados em cabeça e pescoço: Caso controle. / Karine Lima Kido de Carvalho - Cuiabá- MT, 2016.
73 f. : il.

Dissertação (Mestre em Ciências Odontológicas) -Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas, Universidade de Cuiabá – UNIC.
Orientador Prof. Dr. Luiz Evaristo Ricci Volpato

1. Radioterapia. 2. Doença Periodontal. 3. Edêntulos. I. Título.

CDU 615.849:616.314.1

Normalização e Ficha Catalográfica

Valéria Oliveira dos Anjos
Bibliotecária – CRB1/1713

KARINE LIMA KIDO DE CARVALHO

**QUANTIFICAÇÃO DE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* E
PORPHYROMO NAS GINGIVALIS EM PACIENTES DESDENTADOS
IRRADIADOS EM CABEÇA E PESCOÇO: CASO CONTROLE**

Dissertação apresentada à UNIC no Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Luiz Evaristo Ricci Volpato
UNIC

Membro Titular: Prof. Dr. Alexandre Meireles Borba
UNIC

Membro Titular: Prof. Dr. Paulo Sérgio Silva Santos
FOB-USP

Conceito Final: _____

Cuiabá, 29 de abril de 2016.

Dedico esse trabalho a minha amada família:
às minhas vidas Matheus, João Guilherme,
Eduardo, e meus pais maravilhosos Cleimir e
Kenji Kido!

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho ao Grandioso Pai Celestial, que me ilumina proporcionando as forças necessárias para a caminhada diária, protegendo-me, aparando-me e intuindo-me sempre. A Ele, a minha eterna gratidão.

Aos meus pais, por terem me dado todo apoio necessário para que eu pudesse seguir sempre em busca dos meus ideais, me fortalecendo e me impulsionando sempre adiante. O meu muitíssimo obrigada a esse amor incondicional, ao auxílio diário na educação dos meus filhos, enfim, sem vocês eu não conseguiria alcançar as minhas aspirações.

Às vidas que Deus me presenteou e que eu tanto amo! Matheus e João Guilherme, obrigada filhos queridos pela compreensão, pelo incentivo e por tantas vezes que deixei de dar-lhes a atenção mais que merecida, pois tinha que estudar e me dedicar ao projeto do mestrado que tanto almejei fazer! Vocês são as minhas forças, o meu alicerce, o meu viver.

Ao meu marido, obrigada por ser o meu porto seguro, a força que eu preciso para sempre seguir em frente! Amo-te muito.

Ao meu melhor amigo, meu conselheiro, o meu irmão amado, “Kinho”, obrigada pelas palavras proferidas sempre no momento certo, pela força e incentivo aos meus estudos e por abrandar o meu coração nos momentos mais difíceis.

À minha cunhada, irmãzinha querida, Juliana, que tanto me apoiou e ajudou nesta caminhada, muito obrigada.

Aos meu sobrinhos e afilhados amados, obrigada pela compreensão e paciência pela minha ausência e pouco tempo para dar-lhes a atenção devida.

À minha madrinha amada Suzana que me auxiliou muito com as correções na dissertação. O meu muito obrigada!

Aos meus colegas e amigos do mestrado, obrigada pelo companheirismo nesta bela caminhada do saber, em especial aos amigos queridos “Zé Marcos e Nick”!

À nossa querida técnica laboratorial, Andressa Ricci, gratidão pela atenção, explicações, paciência e carinho para comigo, por esse tempo tão curto em que trabalhamos juntas. Aprendi a admirá-la e respeita-la por ser o que és: coração grandioso e profissional competente!

Meus sinceros agradecimentos a todos os pacientes, colaboradores e alunos da iniciação científica que participaram deste projeto.

Ao Reitor da Universidade de Cuiabá – UNIC, Rui Fava.

Ao Pró Reitor Acadêmico da Universidade de Cuiabá – UNIC, José Cláudio Percin.

Ao Pró Reitor Administrativo e Diretor de unidade da Universidade de Cuiabá – UNIC, Fernando Ciriaco Dias Neto.

Ao Diretor de Pós-Graduação Stricto Sensu da Kroton, Prof. Dr. Helio Suguimoto.

À Coordenadora de Pesquisa e Pós-Graduação - Stricto Sensu da Universidade de Cuiabá – UNIC, Lucélia de Oliveira Santos.

Ao Coordenador do Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas da Universidade de Cuiabá – UNIC, Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia da Universidade de Cuiabá – UNIC, Fábio Luís Miranda Pedro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Evaristo Ricci Volpato, gratidão pela paciência e tranquilidade que sempre me passou em especial nos dias tensos e de fortes emoções com a proximidade da defesa. Suas palavras carregadas de sabedoria e carinho acalentaram a minha alma. Meu muito obrigada!

À Prof^a. Dr^a. Alessandra Nogueira Porto, obrigada pelas explicações e orientações no fim desta caminhada!

Aos Professores do mestrado, por muito contribuírem com meu crescimento nesta jornada, em especial ao amigo querido desde a infância, “Borbinha” e hoje meu professor, Dr. Alexandre Borba! Tenho muito orgulho do ser humano e profissional que é! Obrigada pela atenção e carinho de sempre!

À secretária do Programa de Mestrado da Universidade de Cuiabá, Cátia Balduino Ferreira, por estar sempre disposta a contribuir com o possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo apoio concedido por meio do processo número 156662/2014.

“A tarefa não é ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê”
Arthur Schopenhauer

RESUMO

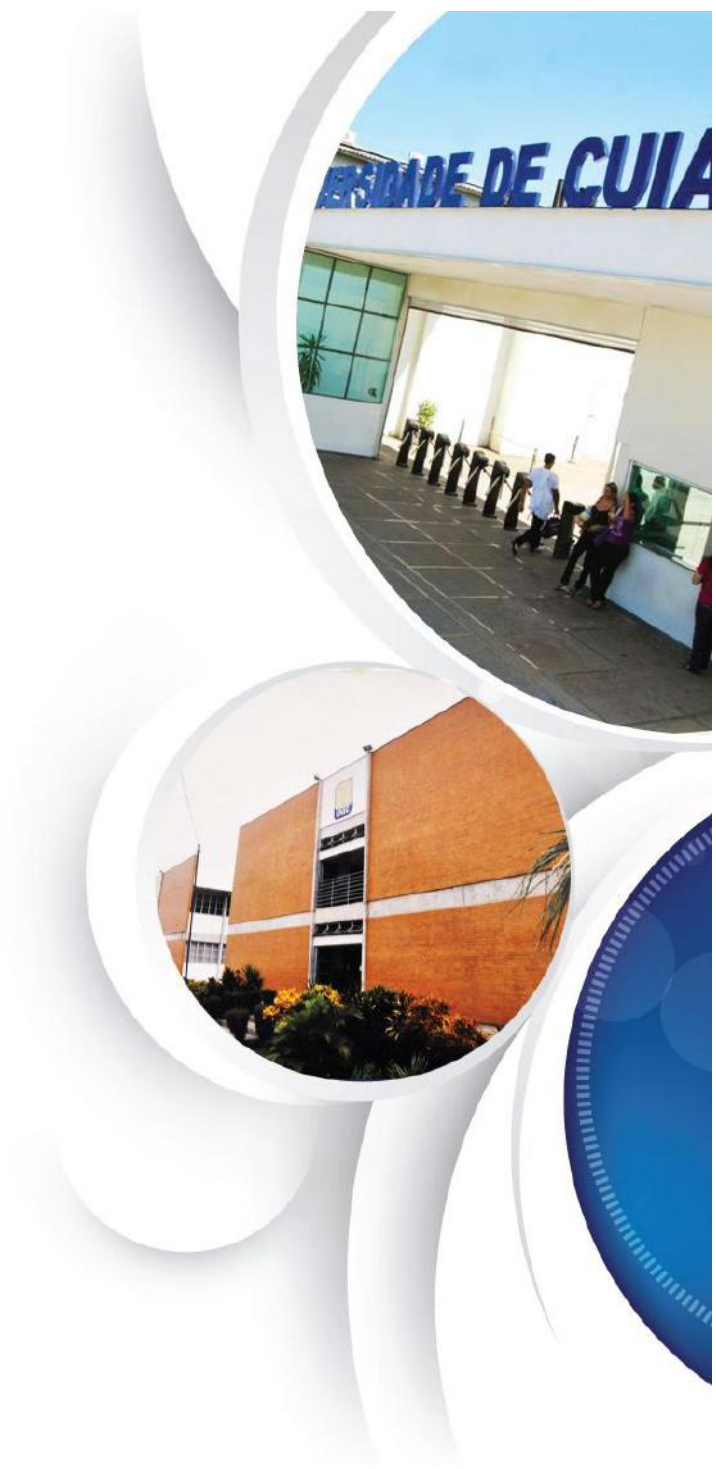


RESUMO

CARVALHO, K. L. K. **Quantificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes desdentados irradiados em cabeça e pescoço**: caso controle. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade de Cuiabá – UNIC, Cuiabá, 2016.

A radioterapia é a abordagem não cirúrgica mais amplamente utilizada para tratar cânceres de cabeça e pescoço. No entanto, doses elevadas de radiação podem resultar em várias sequelas, que se manifestam durante ou após a conclusão da terapia. Assim, este trabalho quantificou as bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes desdentados irradiados em cabeça e pescoço (grupo caso) e comparou os resultados com um grupo de pacientes sem câncer e não irradiados (grupo controle). Informações como idade, presença de saburra, fluxo salivar e biofilme foram coletados entre os pacientes de ambos os grupos. A presença de saburra lingual foi analisada clinicamente. A sialometria foi analisada pela técnica da saliva estimulada por ação mastigatória com parafina. Amostras microbiológicas foram coletadas das mucosas jugal, labial e dorso lingual. Posteriormente as amostras foram processadas e analisadas em qPCR para detectar a presença e quantificar as bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Houve diferença estatística para a quantidade das bactérias entre 24 indivíduos do grupo caso e 26 do grupo controle; com relação à saburra, houve significância apenas para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; e para o volume salivar e *Porphyromonas gingivalis* teve o maior volume no grupo caso, enquanto *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* teve maior quantidade no grupo controle. Na análise de regressão linear constatou-se que o grande responsável pela diferença na quantidade dos periodontopatógenos foi a variável grupo. Não foi encontrada diferença estatística na quantidade das bactérias entre pacientes completamente desdentados daqueles com 12 ou menos dentes. Assim, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* estiveram presentes em quantidades significativas nos pacientes de ambos os grupos, estando em maior quantidade nos pacientes do grupo controle.

Palavras-chave: Neoplasias de cabeça e pescoço. Radioterapia. Boca edêntula. *Porphyromonas gingivalis*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.



ABSTRACT

ABSTRACT

CARVALHO, K. L. K. **Quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in irradiated edentulous patients in head and neck: if control.** 2016. 73 f. Dissertation (Master's Degree in Integrated Dental Clinic) - Post-Graduate Program, University of Cuiabá - UNIC, Cuiabá, 2016.

Radiation therapy is the non-surgical approach most widely used to treat head and neck cancers. However, high doses of radiation may result in different sequelae, which may manifest during or after completion of therapy. This work quantified *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in head and neck irradiated edentulous patients (case group) and compared the results with a group of patients without cancer and non-irradiated (control group). Information such as age, presence of coating, salivary flow and biofilm were collected from the patients of both groups. The presence of tongue coating was examined clinically. Sialometry was analyzed by the stimulated technique by chewing paraffin. Microbiological samples were collected from buccal and labial mucosa and tongue dorsum. Subsequently the samples were processed and analyzed by qPCR for detecting the presence and quantifying *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. There was statistical difference in the amount of bacteria among the 24 individuals in the case group and the 26 in the control group; with respect to the coating, there was significance for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; and for salivary volume, *Porphyromonas gingivalis* had the highest volume in the case group, while *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was more abundant in the control group. In linear regression analysis it was found that the main responsible for the difference in the amount of periodontal pathogens was the variable group. There was no statistical difference in the amount of bacteria between completely edentulous patients from those with 12 or fewer teeth. So *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* were present in significant amounts in patients of both groups, with a greater quantity in control patients.

Keywords: Head and neck neoplasms. Radiotherapy. Edentulous mouth. *Porphyromonas gingivalis*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Apresentação das cepas bacterianas	28
Tabela 2 - Descrição dos primers e sondas de DNA utilizadas para cada microrganismo do estudo.	29
Tabela 3 - Análise da quantidade de <i>A. actynomicetemcomitans</i> e <i>P. gingivalis</i> segundo o grupo de pacientes (irradiados e não irradiados), a presença de saburra e o volume de saliva.....	34
Tabela 4 - Análise do tipo Regressão linear da quantidade de <i>A. actynomicetemcomitans</i> e <i>P. gingivalis</i> com relação a grupo de pacientes, à saburra e ao volume salivar.	34
Tabela 5 - Comparação da quantidade de <i>A. actynomicetemcomitans</i> e <i>P. gingivalis</i> em pacientes completamente desdentados e em pacientes com menos de doze dentes de cada grupo e da população total utilizando o teste de Mann-Whitney.	35



LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Película de parafina	26
Figura 2 - Swab	27
Figura 3 - Tubo, tipo <i>ependorf</i>	27
Figura 4 - Freezer - 80°C.....	30
Figura 5 - qPCR - StepOne™.....	30



LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ANOVA	Análise de Variância
°C	Grau Celsius
CA	Câncer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Gy	Gray
HIV	Vírus da imunodeficiência humana <i>Human immunodeficiency vírus</i>
Mm	Milímetro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
Min	Minutos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>P.g</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa Real-Time Polymerase Chain Reaction
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotações por Minuto
Seg	Segundos
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Um	Universal
RT	Radioterapia
QT	Quimioterapia

SUMÁRIO



SUMÁRIO

1	QUANTIFICAÇÃO DE <i>AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS</i> E <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> EM PACIENTES DESDENTADOS IRRADIADOS EM CABEÇA E PESCOÇO: CASO CONTROLE	20
1.1	INTRODUÇÃO.....	22
1.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
1.2.1	População do estudo.....	24
1.2.2	Exame clínico.....	26
1.2.3	Análise salivar.....	26
1.2.4	Análise microbiológica.....	26
1.2.5	Extração e quantificação do DNA.....	27
1.2.6	Confecção dos <i>primers</i>, detecção e quantificação microbiana (real time qPCR).....	28
1.2.7	Análise Estatística	31
1.3	RESULTADOS	33
1.4	DISCUSSÃO.....	37
1.5	CONCLUSÃO	41
1.6	REFERÊNCIAS	43
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	47
2.1	CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.....	47
2.2	RADIOTERAPIA	48
2.3	EFEITOS ADVERSOS BUCAIS DA RT EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO.....	50
2.4	RADIOTERAPIA E SALIVA.....	52
2.5	MICROBIOTA BUCAL	53
2.6	REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA	58
	ANEXO	58
	ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	64
	APÊNDICES.....	65
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .	69
	APÊNDICE B - IDENTIFICAÇÃO E HÁBITOS SOCIAIS	71
	APÊNDICE C – LESÃO NEOPLÁSICA	72
	APÊNDICE D - ANÁLISE BUCAL	73



1 QUANTIFICAÇÃO DE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* E *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* EM PACIENTES DESDENTADOS IRRADIADOS EM CABEÇA E PESCOÇO: CASO CONTROLE.



1.1 INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

A radioterapia é a modalidade de tratamento primária usada para pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Muitos pacientes são submetidos a altas doses de radiação em áreas que abrangem a mucosa bucal e glândulas salivares, levando a efeitos deletérios, como a hipo-salivação, mucosite, xerostomia, candidíase, cárie de radiação e osteorradionecrose, que por sua vez conduzem a uma diminuição na qualidade de vida do paciente (WALKER, 2011; SHAO et al., 2011; AGARWAL, 2012; DEVI; SINGH, 2014). O efeito da radiação ionizante sobre os tecidos bucais é cumulativo e muitas vezes irreversível (LIESHOUT; BOTS, 2014).

Além do efeito direto da radiação ionizante sobre a microbiota, os microrganismos também são influenciados pela redução acentuada na taxa de fluxo salivar e alteração dos hábitos alimentares do paciente, contribuindo para um desequilíbrio nesse microecossistema que desempenha papel fundamental na manutenção da saúde (HU et al., 2013; SHAO et al., 2011; WALKER et al., 2011).

Estudos anteriores analisaram a ocorrência de periodontopatógenos em pacientes irradiados, entretanto foram analisados apenas pacientes dentados (ALMSTÅHL et al., 2008; SHAO et al., 2011). Sabe-se que a ocorrência de periodontopatógenos específicos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* independe da presença de dentes no indivíduo (SACHDEO et al., 2008) e ambas têm a capacidade de se infiltrarem nos tecidos e induzir infecções em outros sítios do organismo em pacientes imunodebilitados (VAN WINKELHOFF, SLOTS, 1999), como é o caso dos pacientes irradiados (MEURMAN; UTTAMO, 2008; MEURMAN, 2010).

Como os cânceres de cabeça e pescoço têm maior incidência entre pessoas acima de sessenta anos (PARKIN et al., 2005; JILANI et al., 2012; DEVI; SINGH, 2014) cujo índice de edentulismo é alto (SACHDEO et al., 2008) e muitos desses pacientes apresentam pobre saúde bucal, muitas vezes levando à indicação de exodontias previamente ao início do tratamento radioterápico (AGARWAL, UPADHYAY, 2012; DEVI, SINGH, 2014) é fundamental que se conheça o impacto provocado pela radioterapia nesses pacientes.

Assim, o objetivo deste trabalho foi detectar e quantificar os periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes desdentados e irradiados em cabeça e pescoço e comparar com o grupo de pacientes sem câncer, não submetidos ao tratamento radioterápico.



1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar o objetivo proposto, foi realizado estudo observacional do tipo caso controle. Antes da realização do estudo, o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá, ligado ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, tendo recebido o parecer favorável sob o número 1.216.207 (Anexo A).

1.2.1 População do estudo

Os pacientes submetidos à radiação em cabeça e pescoço (grupo caso) foram selecionados por conveniência no Hospital de Câncer de Mato Grosso (HCMT) em Cuiabá, MT, Brasil e foram avaliados entre novembro e dezembro de 2015. Já os pacientes sem câncer e não irradiados (grupo controle), foram selecionados após a conclusão das coletas no grupo caso. Buscou-se selecionar pacientes da mesma faixa etária dos pacientes do grupo caso, entretanto, sem histórico de tratamento prévio com radioterapia, em um centro de convivência de idosos do mesmo município. Os pacientes do grupo controle foram examinados entre dezembro de 2015 e janeiro de 2016.

Foram utilizados como critérios de inclusão para o grupo caso:

- Idade acima de 45 anos;
- Ter menos de 15 dentes
- Ter realizado o tratamento radioterápico em região de cabeça e pescoço, cuja área de radiação envolvesse a cavidade bucal e glândulas salivares maiores;
- O tratamento radioterápico ter sido concluído antes da pesquisa;
- Dose de radiação superior a 30 Gy;
- Sem uso de antibióticos nos últimos 30 dias.

Critérios de Inclusão para o grupo controle:

- Idade acima de 45 anos;
- Sem diagnóstico de câncer;
- Não ter realizado tratamento radioterápico;

- Ter menos de 15 dentes;
- Sem uso de antibióticos nos últimos 30 dias

Critérios de Exclusão:

- Ter realizado o tratamento radioterápico em outro município;
- Pacientes que se negaram a participar da pesquisa ou que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE);
- Pacientes imunossuprimidos por outras razões (HIV e transplantados).

Critérios de Exclusão para o grupo controle:

- Pacientes que se negaram a participar da pesquisa ou que não assinaram o TCLE;
- Pacientes imunossuprimidos por outras razões (HIV e transplantados).

Para este estudo foram considerados desdentados os pacientes com até 15 dentes naturais na cavidade bucal, adaptando o conceito habitualmente utilizado em pesquisas que quantificam periodontopatógenos em pacientes dentados que incluem apenas aqueles com a presença de no mínimo 15 ou 20 dentes naturais na cavidade bucal (CORTELLI et al., 2005; BORGIO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016). Entretanto, para avaliar se esse critério pode representar um viés na quantificação dos periodontopatógenos em relação a pacientes completamente desdentados, visto que os primeiros teriam superfícies rígidas e sulco gengival para serem colonizados pelas bactérias periodontopatogênicas, ao contrário dos últimos, será realizada a comparação entre os dois perfis de pacientes.

As coletas foram realizadas após a explicação da pesquisa e assinatura do TCLE (Apêndice A) pelos pacientes, sempre no período da manhã entre 8:30 e 12:00 h, pela mesma pesquisadora.

Os participantes foram questionados em relação à sua idade e uso de antibióticos nos últimos 30 dias.

Especificamente para o grupo caso, os dados referentes ao tipo histológico da lesão neoplásica, dose total da radioterapia e a realização de tratamento adjuvante (cirurgia, quimioterapia) (Apêndice B), foram levantados a partir de seus prontuários médicos.

1.2.2 Exame clínico

Foi realizado exame clínico bucal minucioso para coletar dados referentes a lesões em mucosa e o uso de próteses dentárias.

1.2.3 Análise salivar

Para análise do fluxo salivar, utilizou-se a técnica da análise da saliva estimulada, por ação mastigatória (EHSANI et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Cada paciente foi orientado a mascar uma película de parafina (Parafilm® - Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL) (Figura 1). Foi pedido ao paciente para expelir a saliva em um coletor graduado até o tempo determinado de 5 minutos (KAUFMAN; LAMSTER, 2002; EHSANI et al., 2013). Após esse tempo, houve o descarte da espuma para a correta medição do volume salivar.



Figura 1 - Película de parafina

1.2.4 Análise microbiológica

Foi realizada a coleta do biofilme com *swab* (Figura 2) (Absorve, Jiangsu Suyun Medical Materials CO LTD, Jiangsu, China) friccionado em mucosa jugal e labial, passando pelo vestibulo de ambos os arcos e inserido no tubo tipo *ependorf* (Figura 3) (Kasvi, Curitiba, PR - Brasil), que foi levado à caixa térmica com gelo imediatamente após a coleta. Em seguida foi coletada amostra microbiana do dorso

lingual, com o outro swab, passando 8 vezes com o movimento de trás para a frente em toda a extensão da língua que em seguida também foi inserido no mini tubo e levado ao gelo.

Ao término das coletas, as amostras foram levadas ao freezer do laboratório de biologia molecular da Universidade de Cuiabá (UNIC) e conservadas a -80°C (Figura 4) para posterior extração de DNA e análise da qPCR.

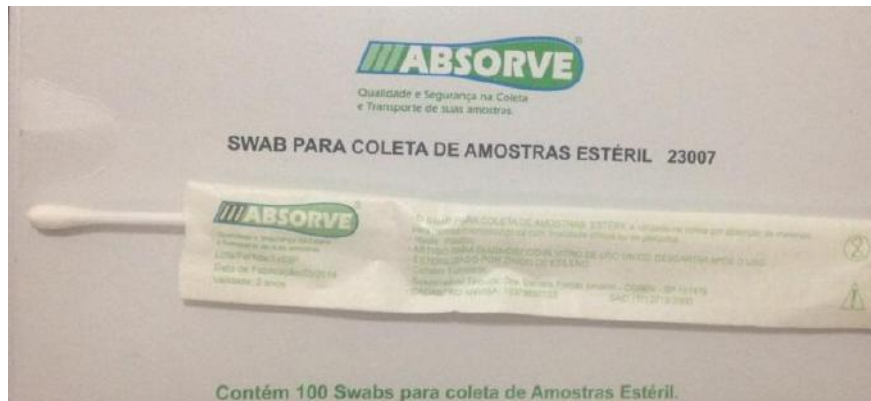


Figura 2 - Swab



Figura 3 - Tubo, tipo *eppendorf*

1.2.5 Extração e quantificação do DNA

Inicialmente as amostras de mucosa e língua de cada paciente foram combinadas em *pool*.

Para a avaliação microbiológica, a extração do DNA genômico foi realizada com auxílio do kit PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. O material foi previamente

homogeneizado em agitador mecânico por 60 segundos e 500 µL da amostra foram centrifugados (3 min x 12.000 rpm). Após remoção do sobrenadante, 180 µL de PureLink™ Genomic Digestion Buffer e 20 µL de Proteinase K foram adicionados aos tubos contendo a suspensão de células bacterianas (pellet) e cada minitubo foi incubado à 55°C por 90 min. Após estes procedimentos, 20 µL de RNase A foi adicionado ao lisado, esta solução foi agitada e incubada por 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer e 200 µL de etanol (100%) foram adicionados e o minitubo agitado por 5 seg até a formação de uma solução homogênea. Ao término deste processo, todo o lisado (aproximadamente 640 µL) foi transferido para uma coluna (contendo membrana de sílica -“PureLink™ Spin Column”) acoplado a um tubo de coleção, e este conjunto centrifugado à 12.000 rpm por 1 min. Em seguida, foram realizadas duas lavagens da membrana com 500 µL de *Wash Buffer 1* (12.000 rpm por 1 min) e *Wash Buffer 2* (12.000 rpm por 3 min). Finalmente, 100 µL de PureLink™ *Genomic Elution Buffer* foi utilizado na eluição do DNA fixado na membrana de sílica.

As cepas bacterianas foram provenientes da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Tabela 1) e foram cultivadas no laboratório de microbiologia da Universidade de Cuiabá.

Tabela 1 - Apresentação das cepas bacterianas

Bactérias	Cepas
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (P.g)	ATCC 33277
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (A.a)	ATCC 29522

1.2.6 Confecção dos *primers*, detecção e quantificação microbiana (real time qPCR)

Os primers empregados foram desenhados de acordo com a sequência específica altamente conservada do gene 16S do DNA ribossomal bacteriano de cada microrganismo envolvido e sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo-SP (Invitrogen Tech-LineSM) (Tabela 2). A busca das sequências alvo desejadas foi realizada por consulta ao NCBI Nucleotide Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) foi

utilizado para a confecção dos primers. A identificação e quantificação absoluta das bactérias de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* nas amostras clínicas foram realizadas através da PCR em tempo real pelo equipamento StepOne™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Figura 6), utilizando pares de primers específicos por sistema de amplificação com sondas TAQMAN® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em seguida, os mesmos foram testados, em relação à especificidade, empregando o programa NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A concentração dos primers, bem como, as condições ideais para o processo de amplificação (concentrações dos reagentes/determinação das temperaturas envolvidas) foram previamente estabelecidas para cada conjunto de primers Forward e Reverse incluídos no estudo.

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando uma solução de volume final 25 µL contendo 0,5 µL de concentração de cada primer, 0,5 µL de (200nmol) de sonda Taqman, 12,5 µL de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) 9 µL de água estéril e 2 µL de solução de DNA. A reação de amplificação foi realizada com as seguintes etapas: temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 10 min e amplificação por 40 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Após a reação da qPCR (Figura 5) foi feita a curva de dissociação (curva de Melting) com temperatura entre 60°C e 95°C para determinar a especificidade da reação da qPCR.

Todas as reações foram realizadas em placas MicroAmp optical 48-well e adesivos ópticos (Applied biosystems, Foster City, Ca, EUA). Os dados foram analisados utilizando o programa Step One™ (Applied biosystems, Foster City, Ca, EUA).

Tabela 2 - Descrição dos primers e sondas de DNA utilizadas para cada microrganismo do estudo.

Primer	Sequência (3'- 5')	Referência
<i>P.g</i> - TAMRA-VIC		
Reverse	CAA CCA TGC AGC ACC TACATAGAA	Saito et al. (2011)
Forward	ACCTTACCCGGGATTGAAATG	
Sonda	ATGACTGATGGTGAAAACCGTCTTCCCTTC	
<i>A.a</i> – TAMRA-FAN		
Reverse	TTC ATT CAC GCG GCA TGG C	Nonnenmacher et al. (2005)
Forward	CAA GTG TGA TTA GGT AGT TGG TGG G	
Sonda	ATC GCT AGC TGG TCT GAG AGG ATG GCC	
<i>P.g</i> - <i>Porphyromonas gingivalis</i> . <i>A.a</i> - <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>		



Figura 4 - Freezer - 80°C



Figura 5 - qPCR - StepOne™

Inicialmente, para a realização da curva padrão, foi utilizado o DNA extraído a partir da bactéria pura, onde foi realizada a leitura em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-vis, NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA) por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280nm. Obteve-se uma concentração inicial entre 0,5- 0,6 pg/ μ L de cada DNA bacteriano, em seguida realizou-se 8 diluições seriadas (10¹-10⁸) para confecção da curva padrão.

A curva padrão (a qual possuía concentração conhecida) foi utilizada para

converter o score de Ct (Cycle treshold) obtidos com as amostras de fluido em números exatos de concentração de DNA.

Uma vez determinados os limites de quantificação, as amostras clínicas foram processadas juntamente com a curva padrão (controle positivo) respectivas de cada espécie bacteriana, em triplicatas e os valores médios foram utilizados para o cálculo dos níveis bacterianos. As reações foram realizadas respeitando-se uma eficiência de amplificação para a curva padrão entre 110% a 93% (slope =-3,10 a -3,50) e um coeficiente de correlação (R^2) \geq 0,98%. Para o ensaio da PCR em tempo real ter alta eficiência, a inclinação da curva padrão (slope) deve ser próxima de -3,30 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

O controle negativo foi realizado substituindo o DNA pela mesma quantidade de água estéril, a fim de checar possíveis contaminações.

1.2.7 Análise Estatística

Os parâmetros clínicos dos pacientes foram avaliados de acordo com o teste de Mann-Withney para duas amostras independentes, análise de correlação de Spearman e a regressão linear.

O teste de Mann-Withney foi utilizado para avaliar a associação da quantidade de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* e os grupos caso e controle e os pacientes com e sem saburra lingual. Já a análise de correlação de Spearman foi utilizada para correlacionar as duas bactérias com o volume salivar dos indivíduos. Para se entender o efeito separado de cada variável dado o resultado da outra, ou seja, entender qual das variáveis é realmente responsável por alterações em *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis*, foi desenvolvido um modelo de regressão linear, onde se avaliou separadamente as bactérias de cada grupo com o volume salivar e saburra.

Todos os testes de hipóteses desenvolvidos nesse estudo consideraram uma significância de 5%, ou seja, a hipótese nula foi rejeitada quando p-valor foi menor ou igual a 0,05.

1.3 RESULTADOS



1.3 RESULTADOS

A população do estudo foi composta por 50 indivíduos, sendo 24 do grupo caso, de pacientes submetidos à radioterapia e 26 do grupo controle, de indivíduos não irradiados. A média de idade foi de 69 anos (± 10), sendo de 65 anos ($\pm 9,4$) no grupo caso e 73 anos ($\pm 9,26$) no grupo controle. A dose total da radioterapia a que os pacientes do grupo caso foram submetidos variou de 40 a 70 Gy com a média de 66 Gy (± 9) e o término da radioterapia variou de 3 a 29 meses, com uma média de 11 meses (± 6).

Foi observada diferença estatisticamente significativa para a quantidade de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* entre os grupos caso e controle. Enquanto a quantidade de *A. actynomicetemcomitans* foi maior no grupo controle (p-valor $< 0,001$), a quantidade de *P. gingivalis* foi maior no grupo caso, de pacientes submetidos à radioterapia (p-valor $< 0,001$) (Tabela 3).

Quando se comparou a quantidade de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* em relação à presença de saburra lingual nos pacientes, foi observado que houve significância estatística somente para a *A. actynomicetemcomitans* (p-valor $< 0,004$), que esteve presente em maior quantidade entre os pacientes com saburra (Tabela 3).

Com relação à correlação entre a quantidade de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* e o volume de saliva, observou-se significância estatística em ambos os casos. Quanto maior foi o volume de saliva, maior foi o valor de *A. actynomicetemcomitans* (p-valor $< 0,001$) e menor foi o valor de *P. gingivalis* (p-valor $= 0,027$) (Tabela 3). O volume médio salivar do grupo caso foi de 0,69 mL e do grupo controle foi de 3,09 mL.

Tabela 3 - Análise da quantidade de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* segundo o grupo de pacientes (irradiados e não irradiados), a presença de saburra e o volume de saliva.

Variável	A.a		p-valor	P.g		p-valor
	Média	Desvio padrão		Média	Desvio padrão	
Grupo*						
Pacientes irradiados	2817	8718	<0,0001	3145	11297	0,0093
Pacientes não irradiados	133996	398545		60	195	
Saburra*						
Sem saburra	2194,6	4641,5	0,0038	2036,5	6791,3	0,337
Com saburra	92767,8	333385,7		1384,1	8291,5	
Volume de saliva**						
	R			R		
	0,51322		0,0001	-0,31347		0,0266

* Teste de Mann-Whitney

** Correlação de Spearman e Pearson

Como as informações referentes aos grupos de pacientes à saburra e ao volume de saliva estão relacionados entre si, para entender quais das variáveis são realmente responsáveis pelas alterações de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis*, foi desenvolvido um modelo de regressão linear. Observou-se que tanto para *A. actynomicetemcomitans* quanto para *P. gingivalis* o grande responsável pelas alterações é a variável grupo (p-valor <0,001), única co-variável significativa no modelo, sendo que o grupo caso apresentou menor valor de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* (tabela 4).

Tabela 4 - Análise do tipo Regressão linear da quantidade de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* com relação a grupo de pacientes, à saburra e ao volume salivar.

Variável	Estimativa	Erro padrão	Estatística T	p-valor	p-valor (ANOVA)
A.a					
Grupo	-6,51	1,04	-6,24	<.0001	<0,0001
Saburra	1,27	1,08	1,17	0,2472	
Volume Salivar	-0,11	0,21	-0,54	0,5921	
P.g					
Grupo	-0,50	0,17	-2,91	0,0056	0,0169
Saburra	-0,07	0,18	-0,4	0,6933	
Volume Salivar	0,00	0,03	-0,11	0,9129	

Comparou-se também a presença e quantidade de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis*, entre os pacientes completamente desdentados, e aqueles com a presença de até 15 dentes. De fato, 12 dentes foi o número máximo encontrados entre os pacientes. Observou-se por meio do teste de Mann-Whitney que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as duas bactérias (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação da quantidade de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* em pacientes completamente desdentados e em pacientes com menos de doze dentes de cada grupo e da população total utilizando o teste de Mann-Whitney.

Grupo		Desdentado		A.a		p-valor	P.g		p-valor
		n (%)	Média	Desvio padrão	Média		Desvio padrão		
Caso	Sim	15 (62,50)	789	2330	0,2632	31	80	0,6376	
	Não	9 (37,50)	6198	13727		8334	17844		
Controle	Sim	19 (73,08)	171532	463279	0,3941	57	220	0,6482	
	Não	7 (26,92)	32112	37035		67	117		
Amostra completa	Sim	34 (68)	96204	352813	0,7017	46	171	0,3046	
	Não	16 (32)	17535	28730		4717	13703		

1.4 DISCUSSÃO



1.4 DISCUSSÃO

O câncer de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, representando cerca de 6% dos tumores sólidos e é responsável por 200 a 400 mortes por 100.000 pessoas ao ano (ORTH et al., 2014). A idade média de diagnóstico do câncer de cabeça e pescoço é a sexta década de vida, com predominância do sexo masculino (COGNETTI et al., 2008; YEH, 2010).

A radioterapia tem se mostrado eficaz no tratamento do câncer de cabeça e pescoço, aumentando significativamente a sobrevida dos pacientes tanto isoladamente (ORTH et al., 2014) como em combinação com cirurgia (YEH, 2010) ou quimioterapia (PIGNON et al., 2000). Embora protocolos tenham sido desenvolvidos para minimizar ou controlar as sequelas agudas e tardias da radioterapia na região de cabeça e pescoço (SCHIØDT; HERMUND, 2002), os efeitos diretos e indiretos da radiação nos tecidos bucais ainda são difíceis de serem geridos (VISSINK et al., 2003), dentre eles as mudanças na microbiota bucal (OTMANI, 2007; ZHANG et al., 2015). Dessa forma, pessoas idosas, que tiveram diagnóstico de câncer em cabeça e pescoço têm uma maior sobrevida, entretanto, com os efeitos locais e sistêmicos, muitos dos quais crônicos ou permanentes, da terapia antineoplásica, principalmente da radioterapia. Ressalta-se que na maior parte do mundo, esses indivíduos apresentam pouco ou nenhum dente funcional na boca (SILVA et al., 2011; HYBELS et al., 2016).

A composição da microbiota bucal comensal é controlada por interações complexas entre os microrganismos orais entre si, os tecidos do hospedeiro, a ação de lavagem mecânica e atividade antimicrobiana da saliva. Se um destes fatores estiver muito alterado, pode-se esperar alterações a ocorrer na microbiota bucal, e a doença se manifesta (HU et al., 2013). Dentre as bactérias componentes da microbiota bucal, poucas espécies têm sido associadas com a infecção do tecido periodontal. Há fortes indícios de que *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* sejam patógenos periodontais, quando estão presentes em número suficiente em hospedeiros susceptíveis (SILVA et al., 2015).

A *P. gingivalis* é uma bactéria anaeróbia gram-negativa com a capacidade de invadir células hospedeiras diferentes, incluindo células epiteliais gengivais, células epiteliais transformadas e células endoteliais (PARK et al., 2004). Já a *A. actinomycetemcomitans* é um microrganismo gram-negativo capnofílico encontrado

em lesões periodontais, associado com várias doenças infecciosas, como endocardite infecciosa (WANG et al., 2010), abscessos cerebrais e pulmonares, osteomielite, patologias cardiovasculares, doenças periodontais agressivas e crônicas (GAETTI-JARDIM et al., 2008). Assim, é fundamental a identificação e quantificação desses microrganismos notadamente capazes de provocar infecções sistêmicas (SCANNAPIECO et al., 2003; LÓPEZ et al., 2005; BOGGESS et al., 2006; LAMSTER et al., 2008; DHADSE et al., 2010) em pacientes imunodebilitados (VAN WINKELHOFF; SLOTS, 1999; WANG et al., 2010), como é o caso dos pacientes irradiados.

A idade dos pacientes deste estudo reflete a faixa etária de maior prevalência do câncer de cabeça e pescoço no mundo (COGNETTI et al., 2008; SMITH et al., 2009; YEH, 2010) e a dose total de radioterapia a que os pacientes foram submetidos (66 Gy \pm 9) produz efeito colateral permanente (SHIBOSKI et al., 2007; VISSINK et al., 2010) o que pôde ser constatado pelo baixo volume salivar encontrado no grupo de pacientes irradiados (0,69 mL após estimulação por cinco minutos), mesmo após o tempo médio de finalização do tratamento de 11 meses (\pm 6).

Apesar da baixa quantidade de dentes dos pacientes deste estudo, e dos mesmos não terem sido alvo da coleta bacteriana – coletou-se as bactérias apenas em mucosa labial, jugal e língua, *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis*, foram encontradas nos pacientes de ambos os grupos. Sachdeo et al. (2008) também encontraram amostras de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* em pacientes desdentados, entretanto, em seu trabalho foram coletadas amostras de biofilme de diferentes sítios na cavidade bucal, além da saliva e das próteses dos pacientes.

Apesar de saber que a presença de saburra lingual está relacionada com maior presença de biofilme (KISHI et al., 2010) neste estudo, apenas a *A. actynomicetemcomitans* esteve associada com a presença de saburra.

Já em relação ao volume salivar, *P. gingivalis* esteve relacionada com menores volumes de saliva, enquanto *A. actynomicetemcomitans* esteve relacionada com os maiores volumes. Essas diferenças eram esperadas uma vez que a alteração no fluxo salivar produz alterações na microbiota bucal (HU et al., 2013).

Após análise no modelo de regressão linear, observou-se que o grande responsável pelas diferenças na quantidade dos periodontopatógenos foi a variável grupo, sendo que maiores valores de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis*

estiveram relacionados com os pacientes do grupo controle. Assim, pacientes idosos, submetidos ou não à radioterapia em região de cabeça e pescoço devem ter sua saúde bucal monitorada uma vez que seus tecidos moles abrigam bactérias com alta virulência capazes de, como já foi dito, provocar infecções em outros órgãos se deslocados até esses pela via hematogênica (LI et al., 2000).

Neste estudo considerou-se paciente desdentado aquele com menos de 15 dentes na cavidade bucal, adaptando-se a convenção de que, para fim de análise microbiológica periodontal, considera-se dentado os pacientes com mais de 15 ou 20 dentes (CORTELLI et al., 2005; BORGIO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016). Para a coleta de biofilme neste estudo os dentes presentes foram ignorados e utilizaram-se como sítio de coleta apenas as mucosas labial, jugal e dorso da língua. Como essa interpretação poderia ser questionada, levando-se em conta que a presença de alguns dentes poderia influenciar na microbiota periodontopatogênica e conseqüentemente, na quantificação de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, a quantidade dessas bactérias foi comparada entre os pacientes completamente desdentados, e aqueles com a presença de menos de 12 dentes. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Apesar de não ser o objeto principal deste estudo, não se pode ignorar esse achado e sugere-se que mais estudos sejam conduzidos buscando elucidar a necessidade da presença de dentes para a ocorrência de periodontopatógenos específicos.

GRANDE DE GUIA



1.5 CONCLUSÃO

1.5 CONCLUSÃO

A. actynomicetemcomitans e *P. gingivalis* estiveram presentes em quantidade significativa nos pacientes submetidos ou não à radioterapia para tratamento de câncer em região de cabeça e pescoço, sendo que a quantidade foi significativamente maior nos pacientes não submetidos à terapia.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa da quantidade de *A. actynomicetemcomitans* e *P. gingivalis* nos tecidos moles de pacientes completamente desdentados e daqueles com menos de doze dentes.



1.6 REFERÊNCIAS

1.6 REFERÊNCIAS

1. Agarwal P, Upadhyay R, Agarwal A. Radiotherapy complications and their vossible management in the head and neck region. *Indian J Dent Res.* 2012;23(6):843.
2. Almståhl A, Wikström M, Fagerberg-Mohlin B. Microflora in oral ecosystems in subjects with radiation-induced hyposalivation. *Oral Dis.* 2008;14(6):541-9.
3. Borgo PV, Rodrigues VA, Feitosa AC, Xavier KC, Avila-Campos MJ. Association between periodontal condition and subgingival microbiota in women during pregnancy: a longitudinal study. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(6):528-33.
4. Cognetti DM, Weber RS, Lai SY. Head and Neck Cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer.* 2008;113(7):1911-32.
5. Cortelli SC, Feres M, Rodrigues AA, Aquino DR, Shibli JA, Cortelli JR. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2005 Feb;76(2):204-9.
6. Devi S, Singh N. Dental care during and after radiotherapy in head and neck cancer. *Natl J Maxillofac Surg.* 2014;5(2):117-25.
7. Ehsani S, Moin M, Meighani G, Pourhashemi SJ, Khayatpisheh H, Yarahmadi N. Oral health status in preschool asthmatic children in Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2013;12(3):254-61.
8. Hybels CF, Wu B, Landerman LR, Liang J, Bennett JM, Plassman BL. Trends in decayed teeth among middle-aged and older adults in the United States: socioeconomic disparities persist over time. *J Public Health Dent.* 2016; 7.
9. Hu YJ, Wang Q, Jiang YT, Ma R, Xia WW, Tang ZS, Liu Z, Liang JP, Huang ZW. Characterization of oral bacterial diversity of irradiated patients by high-throughput sequencing. *Int J Oral Sci.* 2013;5(1):21-5.
10. Jilani OK, Singh P, Wernicke AG, Kutler DI, Kuhel W, Christos P, Nori D, Sabbas A, Chao KC, Parashar B. Radiation therapy is well tolerated and produces excellent control rates in elderly patients with locally advanced head and neck cancers. *J Geriatr Oncol.* 2012;3(4):1-18.
11. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva-a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):197-212.
12. Kishi M, Ohara-Nemoto Y, Takahashi M, Kishi K, Kimura S, Yonemitsu M. Relationship between oral status and prevalence of periodontopathic bacteria on the tongues of elderly individuals. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 11):1354-9.
13. Lieshout HF, Bots CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2014 Jan;18(1):17-24.
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001

Dec;25(4):402-8.

15. Meurman JH, Uittamo J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Acta Odontol Scand.* 2008;66(6):321-6.
16. Meurman JH. Oral microbiota and cancer. *J Oral Microbiol.* 2010;2:10.
17. Montanuci LMGM, Volpato LER, França DCC, Aguiar SMHCA, Machado MAA. Effect of Different Chewing Gum Brands on the Salivary pH of Children. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2013 Jan-Mar;13(1):23-29.
18. National Cancer Institute (NIH). [cited 2015 Dec 12]. Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer/statistics>, 2016.
19. Oliveira RR, Fermiano D, Feres M, Figueiredo LC, Teles FR, Soares GM, Faveri M. Levels of Candidate Periodontal Pathogens in Subgingival Biofilm. *J Dent Res.* 2016;2-8.
20. Otmani N. Oral and maxillofacial side effects of radiation therapy on children. *J Can Dent Assoc.* 2007;73(3):257-61
21. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.
22. Rolim AEH, Lino JC, Ramalho LMP. Impact of radiotherapy on the orofacial region and management of related conditions. *Radiol Bras.* 2011;09; 44(6): 388-95.
23. Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the edentulous oral cavity. *J Prosthodont.* 2008;17(5):348-56.
24. Saito T, Inagaki S, Sakurai K, Okuda K, Ishihara K. Exposure of *P. gingivalis* to noradrenaline reduces bacterial growth and elevates ArgX protease activity. *Arch Oral Biol.* 2011;56(3):244-50.
25. Serratine ACP, Silva MRM. Validation of a Simplified Method for Evaluating the Salivary pH in Children. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2009; 9(2):217-21.
26. Shao ZY, Tang ZS, Yan C, Jiang YT, Ma R, Liu Z, Huang ZW. Effects of intensity-modulated radiotherapy on human oral microflora. *J Radiat Res.* 2011;52(6):834-9.
27. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(1):5-29.
28. Silva JYB, Brancher JA, Duda JG, Losso EM. Salivary pH changes in children after industrialized fruit juice consumption. *RSBO.* 2008;5(2):7-11.
29. Silva DD, Held RB, Torres SV, Sousa Mda L, Neri AL, Antunes JL. Self-perceived oral health and associated factors among the elderly in Campinas, Southeastern Brazil, 2008-2009. *Rev Saude Publica.* 2011;45(6):1145-53.

30. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernández M, Gamonal J. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):329-55.
31. Smith BD, Smith GL, Hurria A, Hortobagyi GN, Buchholz TA. Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation. *J Clin Oncol.* 2009;27(17):2758-65.
32. Sulaiman F, Huryrn JM, Zlotolow IM. Dental extractions in the irradiated head and neck patient: a retrospective analysis of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center protocols, criteria, and results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(10):1123-31.
33. Tylenda CA, Ship JA, Fox PC, Baum BJ. Evaluation of submandibular salivary flow rate in different age groups. *J Dent Res.* 1988;67(9):1225-8.
34. Van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* 2000. 1999;20:122-3.
35. Walker MP, Wichman B, Cheng A-L, Coster J, Williams KB. Impact of Radiotherapy Dose on Dentition Breakdown in Head and Neck Cancer Patients. *Practical radiation oncology.* 2011;1(3):142-8.
36. Yeh SA. Radiotherapy for Head and Neck Cancer. *Semin Plast Surg.* 2010;24(2):127-136.
37. Zhang, J., Liu, H., Liang, X., Zhang, M., Wang, R., Peng, G., et al. Investigation of Salivary Function and Oral Microbiota of Radiation Caries-Free People with Nasopharyngeal Carcinoma. 2015;10(4):1-15.



ESPAÇO DE CUIA



2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

O câncer é uma doença multigênica e multicelular que pode surgir a partir de todos os tipos de órgãos e de células com uma etiologia multifatorial. Hanahan e Weinberg (2000) identificaram seis fenótipos de células cancerosas: células com potencial proliferativo ilimitado, independência do ambiente para o crescimento, evasão de apoptose, angiogênese, invasão e metástase para diferentes partes do corpo. O crescimento celular descontrolado ou a propagação metastática resultarão na morte do indivíduo (CHAFFER et al., 2011). A última década testemunhou um progresso considerável na compreensão, nas propostas de tratamento do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011) e nas técnicas de sua detecção precoce, fazendo com que muitos cânceres se tornassem curáveis (POLLACK et al., 2009).

O termo câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo heterogêneo de tumores epiteliais resultantes do trato aerodigestivo superior, seios paranasais, cavidades nasal e oral, faringe, laringe, glândulas salivares e tireoide. É o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, representando cerca de 6% dos tumores sólidos, sendo responsável por 200 a 400 mortes por 100.000 pessoas ao ano. A incidência do câncer está intimamente relacionada com a idade, indicando que a probabilidade de transformação maligna aumenta com o tempo de vida (ORTH et al., 2014).

A idade média de diagnóstico do câncer de cabeça e pescoço é a sexta década de vida e há uma grande predominância do sexo masculino (COGNETTI et al., 2008; YEH, 2010). Além da idade, também estão relacionados ao câncer fatores de risco como estilo de vida (etilismo, tabagismo), predisposição genética e infecções virais (BELPOMME et al., 2007).

A gestão otimizada do câncer de cabeça e pescoço requer uma abordagem multidisciplinar. Para a maioria desses cânceres localmente avançados, cirurgia e radioterapia pós-operatória são complementares, uma combinação das duas modalidades alcança o resultado ideal. A remoção cirúrgica de tumores pode eliminar a maior parte da falha da irradiação e a radioterapia pode esterilizar tumor microscópico estendendo além das margens cirúrgicas, que é a principal fonte de

recorrência após a cirurgia (YEH, 2010).

A combinação de quimioterapia e radioterapia foi introduzida para aumentar o controle do tumor e preservar a integridade do órgão. As meta-análises têm demonstrado um aumento da sobrevida em 5 anos de aproximadamente 8% com quimioradioterapia concomitante comparada com apenas a radioterapia (EL-SAYED; NELSON, 1996; PIGNON et al., 2000).

2.2 RADIOTERAPIA

A radioterapia é a abordagem não cirúrgica mais amplamente utilizada para tratar cânceres de cabeça e pescoço (SHAO et al., 2011; NUTTING et al., 2011). Seu objetivo principal é conseguir o controle local do tumor, minimizando os danos para os órgãos críticos (YEH, 2010).

A modalidade terapêutica teve início com a descoberta dos raios X por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895 na Alemanha. Seu enorme potencial é tanto para a imagiologia de diagnóstico, como para o tratamento de doenças. O primeiro tratamento de paciente com raios X ocorreu apenas um ano após a descoberta. A técnica envolve a emissão de radiação em três campos isocêntricos coplanares destinados a cobrir adequadamente os volumes de destino (SHAO et al., 2011).

É chamada de radiação ionizante porque forma íons (partículas eletricamente carregadas) e deposita essa energia nas células dos tecidos que passa através. Esta energia depositada pode matar as células cancerosas ou causar alterações genéticas resultando na morte de células do câncer (BASKAR et al., 2012).

Embora os danos de radiação afetem tanto células normais como células do câncer, o objetivo da terapia de radiação é maximizar a dose de radiação para as células cancerosas, enquanto minimiza a exposição das células normais, adjacentes às células cancerosas ou no caminho da radiação. Células normais geralmente podem reparar-se a um ritmo mais rápido e manter o seu status da função normal do que as células cancerosas. Estas, em geral, não são tão eficientes quanto as células normais na reparação dos danos causados pelo tratamento de radiação, resultando na sua morte (BEGG et al., 2011).

A dose de radiação necessária para o tratamento do câncer baseia-se na

localização e no tipo de malignidade e se a radioterapia será usada isoladamente ou em combinação com outras modalidades (VISSINK et al., 2003). A radiação pode ainda ser administrada com a intenção de cura ou ser utilizada como uma modalidade muito eficaz de tratamento paliativo para aliviar os pacientes de sintomas causados pelo câncer. Outras indicações de terapia de radiação incluem estratégias de combinação com outras modalidades de tratamento, tais como cirurgia, quimioterapia ou imunoterapia (BASKAR et al., 2012).

A eficácia da radioterapia foi comprovada em vários estudos randomizados e tem sido descrita em meta-análises que incluíram vários tipos de câncer. Ela pode prolongar significativamente a sobrevida do paciente e melhorar as taxas de controle local dos tumores (ORTH et al., 2014).

A radioterapia para pacientes com câncer de cabeça e pescoço é extremamente complexa e evoluiu muito na última década, devido ao advento de técnicas de radioterapia de intensidade modulada. A extensão do tumor primário e linfadenopatia e os achados patológicos ditam os campos de radiação, dose e fracionamento apropriados. A personalização das técnicas de tratamento é essencial (YEH, 2010).

A maioria dos pacientes com carcinomas em cabeça e pescoço, tratados com intenção curativa, recebem uma dose entre 50 e 70 Gy. Essa dose é geralmente administrada durante um período de cinco a sete semanas, uma vez por dia, cinco dias por semana. A dose total de radioterapia pré-operatória ou radioterapia para os linfomas malignos é geralmente menor (VISSINK et al., 2003).

Os efeitos adversos da radiação ionizante nos tecidos normais situados na área de radiação são particularmente evidentes na região da cabeça e pescoço. Esta é uma área complexa composta por várias estruturas que respondem diferentemente à radiação: mucosas, pele, tecido conjuntivo subcutâneo, tecido das glândulas salivares, dentes, osso e cartilagem. Alterações agudas produzidas pela radioterapia são observadas na mucosa oral (eritema, ulceração cobertas de pseudomembrana - mucosite), glândulas salivares (hipossalivação, alteração da composição salivar), paladar (diminuição da acuidade) e pele (eritema, descamação). Mudanças tardias podem ocorrer em todos os tecidos (VISSINK et al., 2003; VISSINK et al., 2010; AGARWAL et al., 2012).

Embora os protocolos completos tenham sido desenvolvidos para minimizar ou controlar as sequelas agudas e tardias da radioterapia da região de cabeça e

pescoço (JANSMA et al., 1992; SCULLY; EPSTEIN,1996; SCHIØDT; HERMUND, 2002), as consequências das lesões induzidas pela radiação às glândulas salivares e as outras sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço ainda são difíceis de serem geridas (VISSINK et al., 2003).

2.3 EFEITOS ADVERSOS BUCAIS DA RT EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO

As complicações bucais da radiação de cabeça e pescoço são previsíveis, graves e podem alterar permanentemente os tecidos levando o paciente ao risco de complicações crônicas graves (AGARWAL et al., 2012). Um dos maiores efeitos colaterais é o dano induzido nas glândulas salivares maiores (NAGLER, 2002), inevitavelmente expostas ao campo de radiação (SHAO et al., 2011), levando à xerostomia (DEVI; SINGH, 2014) e causando também a mucosite, cárie por radiação e osteorradionecrose (NAGLER, 2002; AGARWAL et al., 2012).

Alterações induzidas por radiação podem ser divididas em dois grupos, com base no tempo da sua ocorrência habitual: efeitos secundários agudos que são observados durante ou imediatamente após o tratamento e efeitos secundários tardios que se desenvolvem meses ou anos após o final da terapia de radiação (OTMANI, 2007). O grau, a progressão e a reversibilidade dessas alterações estão relacionadas com a dose e o campo de irradiação, o grau de hipóxia, hipovascularização e hipocelularidade dos tecidos, a idade do paciente no momento do diagnóstico e a capacidade de cura das células expostas (PROTT et al., 2002). Várias são as complicações bucais relacionadas com os tratamentos de radiação, dentre eles destacam-se a mucosite, a disfunção das glândulas salivares, a osteorradionecrose, a cárie por radiação e a limitação de abertura bucal.

A mucosite é o efeito colateral agudo mais comum experimentado por pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço (OTMANI, 2007). É definida como uma inflamação reativa da membrana da mucosa oral e orofaríngea (pode ocorrer em qualquer local da mucosa oral) durante o tratamento radioterápico. Caracteriza-se pela atrofia do tecido epitelial, vasodilatação e infiltrado inflamatório (VISSINK et al., 2003). Costuma ocorrer na terceira semana de tratamento, é acompanhada por dor, ardor e desconforto, que são grandemente agravadas pelo contato com alimentos condimentados (HANCOCK et al., 2003). A mucosite

aumenta o risco para o desenvolvimento de uma infecção sistêmica de origem bacteriana, fúngica, viral ou infecção na boca (DEVI; SINGH, 2014).

A disfunção das glândulas salivares provoca a diminuição da taxa do fluxo salivar e alteração da sua composição. Como resultado, a sensação de secura da boca ocorre mais cedo durante o tratamento por irradiação (ANDREWS; GRIFFITHS, 2001). A recuperação do fluxo salivar adequado pode ser gradual ao longo de vários meses ou podem resultar em mudanças glandulares permanentes, causando a xerostomia (MÖLLER et al., 2004; KONINGS et al., 2005). A radiação ionizante provoca dano ao tecido glandular, resultando na perda rápida da sua função. Dentre as glândulas salivares, a parótida é a mais afetada, pois suas células serosas são mais sensíveis (DEVI; SINGH, 2014).

A osteorradionecrose ocorre devido a hipovascularização e hipóxia do osso irradiado, resultando em um osso não vital. Pode ocorrer a ruptura do tecido mole expondo o tecido ósseo, secundariamente haverá a contaminação pela saliva (MARX, 1983). Exodontias devem ser realizadas 10 a 21 dias antes do tratamento radioterápico para evitar o risco de osteorradionecrose. Todas as grandes cirurgias devem ser realizadas 4 a 6 semanas antes do início da radioterapia. A incidência de osteorradionecrose varia de 0,92% de todos os pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia (SULAIMAN et al., 2003).

Alterações na saliva como a diminuição de seu fluxo, alterações na composição química, diminuição do pH, redução da capacidade tampão e aumento da viscosidade, associados com a alteração da microflora bucal e aumento da quantidade de bactérias orais cariogênicas, resultam na rápida descalcificação do esmalte dentário (OTMANI, 2007; ZHANG et al., 2015). Além do efeito indireto nos dentes causado pela alteração salivar, a radiação causa mudanças nano-mecânicas no esmalte e na dentina provocando diminuição da sua resistência, podendo levar a amputação completa da coroa (LIANG et al., 2016), no que convencionou-se chamar cárie por radiação.

A limitação de abertura bucal ou trismo progride em três fases, a fase inicial e inespecífica inflamatória; a fase celular fibrótica, e a última que é a densificação da matriz e remodelação. Ela é geralmente vista como sendo o resultado da fibrose, levando a uma perda da flexibilidade e extensão. Normalmente a hipomobilidade da articulação temporomandibular é considerada como um efeito final de uma dose elevada de radiação. Abertura bucal inferior a 20 mm pode ser considerada trismo

(DELANIAN; LEFAIX, 2004), porém no estudo de Caetano et al., 2016, 21,9% dos pacientes apresentaram abertura bucal máxima com menos de 35 mm seis meses após a conclusão do tratamento de radioterapia, esta percentagem é considerada alta, mais de um quinto dos pacientes. Podendo evoluir para a incapacidade de abrir a boca, prejudicando assim a qualidade de vida (SCIUBBA, GOLDENBERG, 2006).

2.4 RADIOTERAPIA E SALIVA

A saliva é importante para uma variedade de funções na cavidade bucal. Ela contém os sistemas de tamponamento que neutralizam os ácidos formados durante o metabolismo de hidratos de carbono bacteriano. Alterações na composição salivar implicam no pH a capacidade tampão salivar (LAHEIJ et al., 2015).

Danos no DNA induzidos por radiação prejudicam a divisão celular adequada resultando na morte celular ou senescência das células que tentam se dividir. Um estudo de post-mortem humano sugere que em doses mais baixas (<30 Gy, em frações de 2 Gy) o dano é reversível, em certa medida; mas com doses cumulativas (>75 Gy) a degeneração extensa de ácinos é observada juntamente com a inflamação e fibrose no interstício (VISSINK et al., 2010). Outros estudos sugeriram que a xerostomia irreversível poderia ocorrer com uma dose média de mais de 60 Gy (SHIBOSKI et al., 2007).

No entanto, vários estudos não mostram a perda de células durante o primeiro dia após a irradiação, embora o fluxo de saliva seja drasticamente reduzido e a secreção de água dificultada seletivamente (ZEILSTRA et al., 2000). Um mecanismo de ação para explicar os efeitos precoces e a alta radiosensibilidade enigmática das células salivares são os danos da radiação seletiva para a membrana das células secretoras resultando em perturbações da secreção de água estimulada por receptor muscarínico Coppes et al. (2001). Com base em seus estudos no modelo de rato, propuseram que a perda induzida por radiação da função da glândula salivar ocorre ao longo de quatro fases. A primeira fase (0-10 dias) é caracterizada por um rápido declínio na taxa de fluxo, sem alterações na secreção de amilase ou número de células acinares. A segunda fase (10-60 dias) consiste de uma diminuição da secreção de amilase em paralelo com a perda de células acinares. Números de vazão, secreção de amilase e de células acinares não

mudam na terceira fase (60-120 dias). Na quarta fase (120-240 dias) uma maior deterioração da função da glândula é vista, mas é acompanhada por um aumento no número de células acinares, embora com uma morfologia tecidual empobrecida. Alterações comparáveis foram observadas no tecido submandibular de ratos. No entanto, estudos semelhantes não estão disponíveis em seres humanos (COPPE et al., 2002).

A redução do fluxo salivar diminui o transporte e a solubilização de estimulantes gustativos, reduz a capacidade da saliva para proteger a mucosa contra bactérias, fungos, provoca variação no pH bucal, altera a composição iônica salivar que é importante para o sabor, remineralização dos dentes e afeta a mastigação, nutrição e o aspecto hedônico da degustação (SALEH et al., 2015). Além disso, a mucosa oral pode tornar-se seca e atrófica, levando a ulcerações frequentes, lesões e sangramento (DEVI; SINGH, 2014).

Alterações salivares quantitativas e qualitativas predispõem o paciente irradiado a uma variedade de problemas que se desenvolvem diretamente ou indiretamente como resultado da produção diminuída de saliva (VISSINK et al., 2010; LANGENDIJK et al., 2008). Estes incluem secura da boca, perturbação das funções orais normais (falar, mastigar e engolir) devido ao molhamento insuficiente e à diminuição da lubrificação das superfícies da mucosa e dos alimentos ingeridos (TOLENTINO et al., 2011).

O paciente pode tornar-se desconfortável porque não há nenhuma lubrificação salivar, e os tecidos das mucosas tornam-se pegajosos. Muitas vezes eles se queixam de disfagia e uma sensação de queimação quando se alimentam. Como resultado, pode haver alterações em padrões de alimentação com um decréscimo na ingestão nutricional e perda de peso (DEVI; SINGH, 2014).

2.5 MICROBIOTA BUCAL

A cavidade bucal é um meio complexo que é continuamente exposto a numerosos agentes patogênicos microbianos oportunistas. Estes são mantidos em controle por um sólido arsenal de fatores imunes que mantém um ambiente oral saudável e previnem o desenvolvimento de doenças (O'DONNELL et al., 2015). A cavidade bucal pode conter até 19 000 filotipos de bactérias, mas cada indivíduo terá apenas uma taxa do número total de agentes patogênicos. Existe uma

diversidade substancial no conteúdo da microbiota e entre locais distintos bucais no mesmo indivíduo (SCAPOLI et al., 2012; CARINCI et al., 2013). A taxa de secreção salivar diminuída continuamente pela radiação também promove alteração na composição da microbiota salivar (GRUNDMANN et al., 2009; SHAO et al., 2011).

É amplamente aceito que a composição da microbiota bucal comensal seja controlada por interações complexas entre os microrganismos orais entre si, os tecidos do hospedeiro, a ação de lavagem mecânica e atividade antimicrobiana da saliva. Se um destes fatores estiver muito alterado, pode-se esperar alterações a ocorrer na microbiota bucal, e a doença se manifesta (HU et al., 2013). A maior parte dos efeitos adversos secundários está relacionada a mudanças ecológicas na microbiota (SHAO et al., 2011).

Poucas espécies bacterianas no biofilme subgingival têm sido associadas com a infecção do tecido periodontal, sendo consideradas supostos agentes patogênicos periodontais, ou periodontopatógenos. Há fortes indícios de que *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* sejam patógenos periodontais, quando estão presentes em número suficiente em hospedeiros susceptíveis (SILVA et al., 2015).

A *P. gingivalis* é uma bactéria anaeróbia gram-negativa. Tem a capacidade de invadir células hospedeiras diferentes, incluindo células epiteliais gengivais, células epiteliais transformadas e células endoteliais. Células epiteliais gengivais infectadas não sofrem apoptose e mantêm a integridade fisiológica por longos períodos (PARK et al., 2004).

A *A. actinomycetemcomitans* é um microrganismo gram-negativo capnofílico e é encontrada em lesões periodontais, especialmente em adultos jovens. Este organismo tem sido associado com várias doenças infecciosas, como endocardite infecciosa (WANG et al., 2010), abscessos cerebrais e pulmonares, osteomielite, e patologias cardiovasculares e doenças periodontais agressivas e crônicas (GAETTI-JARDIM et al., 2008).

Durante séculos, a infecção focal dentária tem sido associada com doenças em uma grande variedade de locais do corpo. Em 1891, Miller enfatizou a possibilidade de disseminação de microrganismos produtores de doença oral para locais não oral. As décadas seguintes testemunharam o medo do foco de infecções. Em 1911, William Hunter defendeu drasticamente intervenções dentais para evitar sepse induzida por via oral (VAN WINKELHOFF; SLOTS, 1999). A condição dental "geral" (periodontite, lesões periapicais, cárie dental, dentes perdidos,

pericoronarites) tem sido associada a doença cardíaca, incluindo enfarte do miocárdio, aterosclerose coronária, isquemia (MATILLA et al., 1993; DHADSE et al., 2010), bacteremia (Li et al., 2000), acidente vascular cerebral (BECK et al., 1996) e nascimento de bebês prematuros com baixo peso (OFFENBACHER et al., 1996; SCANNAPIECO et al., 2003; LÓPEZ et al., 2005; BOGGESS et al., 2006), pneumonia e abscesso pulmonar (LAMSTER et al., 2008)

A *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* parecem ser indígenas apenas para a cavidade oral, a ocorrência destes organismos em regiões extra-orais podem sugerir translocação da cavidade bucal para locais sistêmicos (VAN WINKELHOFF; SLOTS, 1999).

Várias espécies de bactérias gram-negativas e gram-positivas orais têm sido detectadas em doenças não orais; no entanto, a maioria dos microrganismos orais translocados constituem espécies comensais que possuem baixo potencial patogênico. A literatura descreve ocasionalmente *A. actinomycetemcomitans* e raramente *P. gingivalis* em doenças não-orais. A descrição relativamente pouco frequente de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em infecções não-orais pode refletir a importância real dos organismos em patologias extra-orais ou dificuldades no crescimento e identificação das espécies (VAN WINKELHOFF; SLOTS, 1999).

Nos pacientes com infecções sistêmicas causadas pela *A. actinomycetemcomitans*, lesões na cavidade bucal foram as prováveis portas de entrada para o microrganismo e incluíram dentes cariados, periodontite ou radioterapia em cabeça e pescoço, notado em nove pacientes (WANG et al., 2010).

A natureza anaeróbia facultativa de *A. actinomycetemcomitans* pode facilitar a sobrevivência do microrganismo nos tecidos humanos. Durante os últimos 30 anos, ela foi recuperada a partir de infecções em um número crescente de sítios e órgãos do corpo. Já a *P. gingivalis* foi recuperada apenas ocasionalmente a partir de infecções não orais. No entanto, o papel da *P. gingivalis* em doenças não orais deve ser subestimado (VAN WINKELHOFF; SLOTS, 1999).

Entretanto, o dente saudável e os epitélios bucal e gengival intactos compreendem barreiras eficazes contra a invasão bacteriana dos tecidos. A cárie dentária, pulpite, periodontite, abscessos dentários, pericoronarite e mucosite permitem a entrada de bactérias orais para o tecido conjuntivo submucoso e corrente sanguínea. Além disso, as bactérias periodontopatogênicas podem invadir os tecidos periodontais (VAN WINKELHOFF; SLOTS, 1999).

Segundo Theilade e Budtz-Jorgensen (1988), dentes são essenciais para a colonização de espécies como *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. Danser et al. (1997) também não detectaram *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em indivíduos desdentados. No entanto, essas bactérias foram vistas em número significativo em indivíduos desdentados por Sachdeo et al. (2008).

Como foi exposto, a radioterapia para tratamento de cânceres de cabeça e pescoço induz mudanças na microbiota bucal do paciente. A mudança na microbiota, por sua vez, provocará uma série de efeitos adversos secundários que impactarão negativamente na qualidade de vida do paciente que foi submetido à radioterapia. Como o aumento da expectativa de vida da população tem sido acompanhado por um aumento na incidência de tumores de cabeça e pescoço (ORTH et al., 2014; WHITE et al., 2014) e como as modalidades de tratamento têm aumentado a sobrevida desses pacientes (PIGNON et al., 2000), é fundamental o aprofundamento do conhecimento da microbiota bucal e especificamente dos Periodontopatógenos nessa população. Assim, no presente estudo, a técnica da Reação quantitativa em cadeia da polimerase (quantitative Polymerase Chain Reaction – qPCR) foi usada para analisar a ocorrência e quantidade das bactérias *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* em pacientes submetidos a radiação para tratamento de câncer em cabeça e pescoço e comparar os resultados com pacientes sem câncer e não submetidos a tratamento radioterápico.



2.6 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

2.6 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Agarwal P, Upadhyay R, Agarwal A. Radiotherapy complications and their possible management in the head and neck region. *Indian J Dent Res.* 2012;23(6):843.
2. Andrews N, Griffiths C. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 2. *Aust Dent J.* 2001;46(3):174-82.
3. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012;9(3):193-9.
4. Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal Disease and Cardiovascular Disease. *J Periodontol.* 1996;67(10):1123-37.
5. Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(4):239-53.
6. Belpomme D, Irigaray P, Sasco AJ, Newby JA, Howard V, Clapp R, et al. The growing incidence of cancer: role of lifestyle and screening detection. *Int J Oncol.* 2007;30(5):1037-49.
7. Boggess KA, Beck JD, Murtha AP, Moss K, Offenbacher S. Maternal periodontal disease in early pregnancy and risk for a small-for-gestational-age infant. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(5):1316-22
8. Carinci F, Scapoli L, Girardi A, Cura F, Lauritano D, Nardi GM, et al. Oral microflora and periodontal disease: new technology for diagnosis in dentistry. *Ann Stomatol.* 2013;4(2):170-173.
9. Chaffer CL, Weinberg RA. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.
10. Coggnetti DM, Weber RS, Lai SY. Head and Neck Cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer.* 2008;113(7):1911-32.
11. Coppes RP, Zeilstra LJW, Kampinga HH, Konings AWT. Early to late sparing of radiation damage to the parotid gland by adrenergic and muscarinic receptor agonists. *British J Cancer.* 2001;85(7):1055-63.
12. Coppes RP, Vissink A, Konings AW. Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. *Radiother Oncol.* 2002;63(3):321-8.
13. Danser MM, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. Periodontal bacteria colonizing oral mucous membranes in edentulous patients wearing dental implants. *J Periodontol* 1997;68:209-216.
14. Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol.* 2004;73(2):119-31.
15. Devi S, Singh N. Dental care during and after radiotherapy in head and neck

- cancer. *Nat J Maxillofac Surg*. 2014;5(2):117-125.
16. Dhadse P, Gattani D, Mishra R. The link between periodontal disease and cardiovascular disease: How far we have come in last two decades ? *J Indian Soc Periodontol*. 2010;14(3):148-54.
 17. El-Sayed S, Nelson N. Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region. A meta-analysis of prospective and randomized trials. *J Clin Oncol*. 1996;14(3):838–47.
 18. Gaetti-Jardim Jr E, Wahasugi TC, Marques MM, Tomazinho PH, Nakano V, Avila-Campos MJ. Distribution of biotypes and leukotoxic activity of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* isolated from Brazilian periodontal patients. *Braz J Microbiol*. 2008;39(4):658-63.
 19. Grundmann O, Mitchell GC, Limesand KH. Sensitivity of Salivary Glands to Radiation: from Animal Models to Therapies. *J Dent Res*. 2009;88(10):894-903.
 20. Hancock PJ, Epstein JB, Sadler GR. Oral and dental management related to radiation therapy for head and neck cancer. *J Can Dent Assoc*. 2003;69(9):585-90.
 21. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
 22. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 4;144(5):646-74.
 23. Hu Y, Shao Z, Wang Q, Jiang YT, Ma R, Tang ZS, Liu Z, Liang JP, Huang ZW. Exploring the dynamic core microbiome of plaque microbiota during head-and-neck radiotherapy using pyrosequencing. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56343.
 24. Jansma J, Vissink A, Spijkervet FK, Roodenburg JL, Panders AK, Vermey A, Szabó BG, Gravenmade EJ. Protocol for the prevention and treatment of oral sequelae resulting from head and neck radiation therapy. *Cancer*. 1992;15;70(8):2171-80.
 25. Konings AW, Coppes RP, Vissink A. On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;62(4):1187-94.
 26. Laheij AM, Rasch CN, Brandt BW, de Soet JJ, Schipper RG, Loof A, Silletti E, van Loveren C. Proteins and peptides in parotid saliva of irradiated patients compared to that of healthy controls using SELDI-TOF-MS. *BMC Res Notes*. 2015;3(8):639.
 27. Lamster IB, DePaola DP, Oppermann RV, Papapanou PN, Wilder RS. The relationship of periodontal disease to diseases and disorders at distant sites: communication to health care professionals and patients. *J Am Dent Assoc*. 2008 Oct;139(10):1389-97. Erratum in: *J Am Dent Assoc*. 2008;139(12):1588.
 28. Langendijk JA, Doornaert P, Verdonck-de Leeuw IM, Leemans CR, Aaronson NK, Slotman BJ. Impact of late treatment-related toxicity on quality of life among

- patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2008;1;26(22):3770-6.
29. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(4):547-58.
 30. Liang X, Zhang JY, Cheng IK, Li JY. Effect of high energy X-ray irradiation on the nano-mechanical properties of human enamel and dentine. *Braz Oral Res*. 2016;30.
 31. López NJ, Da Silva I, Ipinza J, Gutiérrez J. Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol*. 2005;76(11):2144-53.
 32. Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg*. 1983 May;41(5):283-8.
 33. Mattila KJ, Valle MS, Nieminen MS, Valtonen VV, Hietaniemi KL. Dental infections and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1993;103(2):205-11.
 34. Möller P, Perrier M, Ozsahin M, Monnier P. A prospective study of salivary gland function in patients undergoing radiotherapy for squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(2):173-89.
 35. Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis*. 2002;8(3):141-6.
 36. Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, Urbano TG, Bhide SA, Clark C, Miles EA, Miah AB, Newbold K, Tanay M, Adab F, Jefferies SJ, Scrase C, Yap BK, A'Hern RP, Sydenham MA, Emson M, Hall E. Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(2):127-36.
 37. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sheriff A, Bradshaw D, Lambert M, Malcol J, Buijs MJ, Zaura E, Crielaard W, Brandt BW, Ramage G. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS ONE*. 2015 Sep 14;10(9):e0137717.
 38. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*. 1996;67(10):1103-13.
 39. Orth M, Lauber K, Niyazi M, Friedl AA, Li M, Maihöfer C, Schüttrumpf L, Ernst A, Niemöller OM, Belka C. Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiat Environ Biophys*. 2014;53(1):1-29.
 40. Otmani N. Oral and maxillofacial side effects of radiation therapy on children. *J Can Dent Assoc*. 2007;73(3):257-61.
 41. Park Y, Yilmaz Ö, Jung I-Y, Lamont RJ. Identification of *Porphyromonas gingivalis* Genes Specifically Expressed in Human Gingival Epithelial Cells by

Using Differential Display Reverse Transcription-PCR. *Infect Immun.* 2004;72(7):3752-8.

42. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe´ L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet.* 2000;355:949-55
43. Pollack LA, Rowland JH, Crammer C, Stefanek M. Introduction: charting the landscape of cancer survivors' health-related outcomes and care. *Cancer.* 2009;115:4265-9.
44. Prott FJ, Handschel J, Micke O, Sunderkötter C, Meyer U, Piffko J. Long-term alterations of oral mucosa in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002;54(1):203-10.
45. Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the edentulous oral cavity. *J Prosthodont.* 2008;17(5):348-56.
46. Saleh J, Figueiredo MA, Cherubini K, Salum FG. Salivary hypofunction: an update on aetiology, diagnosis and therapeutics. *Arch Oral Biol.* 2015;60(2):242-55.
47. Scannapieco FA, Bush, RB, Paju S. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes. A Systematic Review. *Ann Periodontol.* 2003;8:70-8.
48. Scapoli L, Girardi A, Palmieri A, Testori T, Zuffetti F, Monguzzi R, Lauritano D, Carinci F. Microflora and periodontal disease. *Dent Res J.* 2012;9(2):S202-6.
49. Sciubba JJ, Goldenberg D. Oral complications of radiotherapy. *Lancet Oncol.* 2006;7(2):175-83.
50. Scully C, Epstein JB. Oral health care for the cancer patient. *Eur J Cancer B. Oral Oncol.* 1996;32B(5):281-92.
51. Shao ZY, Tang ZS, Yan C, Jiang YT, Ma R, Liu Z, et al. Effects of intensity-modulated radiotherapy on human oral microflora. *J Radiat Res.* 2011;52(6):834-9.
52. Schiødt M, Hermund NU. Management of oral disease prior to radiation therapy. *Support Care Cancer.* 2002;10(1):40-3.
53. Shiboski CH, Hodgson TA, Ship JA, Schiødt M. Management of salivary hypofunction during and after radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Mar;103 Suppl:S66.e1-19. Supplement.
54. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernández M, Gamonal J. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):329-55.
55. Sulaiman F, Huryn JM, Zlotolow IM. Dental extractions in the irradiated head and

- neck patient: a retrospective analysis of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center protocols, criteria, and results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(10):1123-31.
56. Theilade E, Budtz-Jorgensen E. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with denture-induced stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1988;3:8-13.
 57. Tolentino ES, Centurion BS, Ferreira LHC, Souza AP, Damante JH, Rubira-Bullen IRF. Oral adverse effects of head and neck radiotherapy: literature review and suggestion of a clinical oral care guideline for irradiated patients. *J Appl Oral Sci.* 2011;19(5):448-54.
 58. Van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* 2000. 1999;20:122-35.
 59. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(3):199-212.
 60. Vissink A, Mitchell JB, Baum BJ, Limesand KH, Jensen SB, Fox PC, Elting LS, Langendijk JA, Coppes RP, Reyland ME. Clinical management of salivary gland hypofunction and xerostomia in head and neck cancer patients: successes and barriers. *Int J Radiat Oncol, Biol, Phys.* 2010;15;78(4):983-91.
 61. Wang CY, Wang HC, Li JM, Wang JY, Yang KC, Ho YK, Lin PY, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Hsueh PR. Invasive infections of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010;43(6):491-7.
 62. White MC, Holman DM, Boehm JE, Peipins LA, Grossman M, Henley SJ. Age and Cancer Risk: A Potentially Modifiable Relationship. *Am J Prev Med.* 2014;46(3 0 1):S7-15.
 63. Yeh SA. Radiotherapy for Head and Neck Cancer. *Semin Plast Surg.* 2010;24(2):127-136.
 64. Zhang J, Liu H, Liang X, Zhang M, Wang R, Peng G, Li J. Investigation of salivary function and oral microbiota of radiation caries-free people with nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123137.
 65. Zeilstra LJ, Vissink A, Konings AW, Coppes RP. Radiation induced cell loss in rat submandibular gland and its relation to gland function. *Int J Radiat Biol.* 2000;76(3):419-29.



ANEXO

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ -
UNIC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA QUALIDADE DE VIDA E ALTERAÇÕES BUCAIS DE ADULTOS E IDOSOS SUBMETIDOS OU NÃO À RADIOTERAPIA EM REGIÃO DE CABEÇA E

Pesquisador: KARINE LIMA KIDO DE CARVALHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48687115.0.0000.5165

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso - FAPEMAT

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.216.207

Apresentação do Projeto:

A radioterapia é uma das terapias mais empregadas para tratamento de lesões malignas em cabeça e pescoço. Entretanto, a radioterapia está relacionada a efeitos adversos que interferem na qualidade de vida dos pacientes e podem levar a interrupções do tratamento tais como: mucosite, xerostomia, radiodermite, osteorradionecrose, trismo e cárie por radiação. O presente estudo objetiva analisar a qualidade de vida e alterações

bucalis de adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia de cabeça e pescoço do Hospital do Câncer em Cuiabá. Espera-se abarcar neste

projeto o total de 160 pacientes, sendo: 80 adultos e idosos não irradiados e 80 idosos e adultos irradiados.

Os pacientes serão avaliados em um

único momento, após o tratamento radioterápico. Antes, seus prontuários serão analisados para preencher

a ficha clínica, como idade, sexo,

raça/cor, hábitos sociais de tabagismo, etilismo e serão coletados dados referentes à lesão neoplásica e os dados referentes ao tratamento

radioterápico: dose e número de frações da radioterapia. No segundo momento serão avaliados: a abertura de boca dos adultos e idosos; Caracterizar os adultos e idosos segundo o tipo de lesão e tratamento anti-neoplásico realizado; Analisar o impacto da radioterapia em cabeça e

Endereço: Avenida Beira Rio, 3100, Bloco de Saúde II, Níneo - Coordenação Mestrado

Bairro: Jardim Europa **CEP:** 78.085-000

UF: MT **Município:** CUIABÁ

Telefone: (65)3363-1271

E-mail: margarita.lovato@kroton.com.br

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ -
UNIC



Continuação do Protocolo: 1.216.207

pescoço na qualidade de vida dos adultos e idosos; Analisar a ocorrência de radiodermite; Investigar a presença de alterações em mucosa bucal e de osteorradionecrose nos adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço; Analisar a ocorrência da cárie dentária e as características das lesões cáries nos adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço; Analisar o pH e fluxo salivar de adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço; Analisar a microbiota bucal e subgengival dos adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço; Avaliar a halitose de adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço. Essas amostras serão processadas por PCR.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a qualidade de vida e alterações bucais de adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia de cabeça e pescoço do Hospital do Câncer em Cuiabá.

Objetivo Secundário:

Caracterizar os adultos e idosos submetidos à radioterapia em cabeça e pescoço segundo o tipo de lesão e tratamento anti-neoplásico realizado.

Analisar o impacto da radioterapia em cabeça e pescoço na qualidade de vida dos adultos e idosos. Analisar a ocorrência de radiodermite, nos pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço. Analisar a abertura bucal dos adultos e idosos submetidos ou não radioterapia de cabeça e pescoço. Investigar a presença de alterações em mucosa bucal e de osteorradionecrose nos adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço. Analisar a ocorrência da cárie dentária e as características das lesões cáries nos adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço. Analisar o pH e fluxo salivar de adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço; Analisar a microbiota bucal e subgengival dos adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço; Avaliar a halitose de adultos e idosos submetidos ou não à radioterapia em cabeça e pescoço.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Uma vez que o presente estudo não apresenta risco para os pacientes, o critério para suspensão ou encerramento da pesquisa será a inexistência de voluntários.

Endereço: Avenida Beira Rio, 3100, Bloco de Saúde II, térreo - Coordenação Mestrado

Bairro: Jardim Europa

CEP: 78.065-900

UF: MT

Município: CUIABÁ

Telefone: (65)3383-1271

E-mail: margareta.lovato@kroton.com.br

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ -
UNIC



Continuação do Parecer: 1.216.207

Benefícios:

-Conhecer quais as bactérias e ou periodontopatógenos estão presentes na cavidade oral dos pacientes que se submetaram à radioterapia de cabeça e pescoço;-Conhecendo esta microbiota oral, estabelecer novos planos de prevenção (protocolos) para que aumente a qualidade de vida desses pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória apresentados estão corretos.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências e nem lista de Inadequações, considerando assim aprovação do projeto apresentado, sem ressalvas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.docx	12/08/2015 02:00:57		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto 04.docx	16/08/2015 17:04:24		Acelto
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	19/08/2015 11:57:28	KARINE LIMA KIDO DE CARVALHO	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartadeAutorizacaoHC.pdf	26/08/2015 11:49:54	KARINE LIMA KIDO DE CARVALHO	Acelto
Outros	FomulariodeEncaminhamento.pdf	26/08/2015 11:51:06	KARINE LIMA KIDO DE CARVALHO	Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_558199.pdf	26/08/2015 11:51:59		Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Avenida Beira Rio, 3100, Bloco de Saúde II, Térreo - Coordenação Mestrado
 Bairro: Jardim Europa CEP: 78.065-000
 UF: MT Município: CUIABA
 Telefone: (65)3363-1271 E-mail: margarete.lovelo@kroton.com.br

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ -
UNIC



Continuação do Parecer: 1.216.207

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

CUIABA, 05 de Setembro de 2015

Assinado por:
Margareta Lovato
(Coordenador)

Endereço: Avenida Beira Rio, 5100, Bloco de Saúde II, térreo - Coordenação Mestrado

Bairro: Jardim Europa

CEP: 78.065-000

UF: MT

Município: CUIABA

Telefone: (65)3363-1271

E-mail: margareta.lovato@kroton.com.br

APÊNDICES



APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro Participante,

Gostaríamos de convidá-lo a participar como voluntário da pesquisa intitulada como: **ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA DE CABEÇA E PESCOÇO**, que se refere a um projeto de pesquisa de mestrado em Ciências Odontológicas Integradas - UNIC, dos pesquisadores: Karine Lima Kido de Carvalho (mestranda) e o professor Dr. Luiz Evaristo Ricci Volpato (orientador).

O objetivo deste estudo é analisar a saúde e as alterações bucais dos pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço do Hospital do Câncer em Cuiabá, correlacionando-os com o grupo controle de pacientes não submetidos à radioterapia. Os resultados contribuirão para conhecermos melhor quais os métodos preventivos para oferecer qualidade de vida a esses pacientes irradiados.

Sua forma de participação consiste em ser voluntário para que os pesquisadores colem: o biofilme oral (microbiota), saliva e mensure a abertura de boca para estudo de análise e comparação dos pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço com a microbiota dos pacientes que não se submeteram à radioterapia

Seu nome não será utilizado em qualquer fase da pesquisa, o que garante seu anonimato, e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

Não será cobrado nada, não haverá gastos e não estão previstos ressarcimentos ou indenizações.

Essa pesquisa não envolve riscos aos voluntários, uma vez que não serão realizados procedimentos clínicos invasivos ou medicação sistêmica. O exame clínico e a coleta das amostras serão realizados com materiais e instrumentais esterilizados.

São esperados os seguintes benefícios para esta pesquisa:

- Conhecer os periodontopatógenos da microbiota bucal dos pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço;

- Prevenir futuras lesões oriundas da radioterapia, como: mucosite, radiodermite, cárie por radiação, osteorradionecrose, xerostomia, trismo;
- Amenizar o desconforto e melhorar a condição de vida dos pacientes que se submetem à radioterapia de cabeça e pescoço.

Gostaríamos de deixar claro que sua participação é voluntária e que poderá recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento, ou ainda descontinuar sua participação se assim o preferir, sem penalização alguma ou sem prejuízo ao seu cuidado.

Desde já, agradecemos sua atenção e participação e colocamo-nos à disposição para maiores informações.

Você ficará com uma cópia deste Termo e em caso de dúvida(s) e outros esclarecimentos sobre esta pesquisa você poderá entrar em contato com o pesquisador principal Prof. Dr. Luis Evaristo Ricci Volpato.

Eu _____, RG: _____ confirmo que fui informado (a) dos objetivos da pesquisa de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. As alternativas para minha participação também foram discutidas. Eu li e compreendi este Termo de Consentimento, portanto, eu concordo em dar meu consentimento para participar como voluntário desta pesquisa.

Cuiabá, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do Participante (voluntário)

Assinatura do Pesquisador (a).

APÊNDICE B - IDENTIFICAÇÃO E HÁBITOS SOCIAIS

Identificação e Hábitos sociais

Data: ____/____/____

Prontuário nº: _____

Nome: _____

Nascimento: ____/____/____ Fem. () Masc. ()

Reside na: () Zona Urbana () Zona Rural

Cor ou raça (IBGE)

() Branca () Preta () Amarela () Parda () Indígena

Assinalar com um "X" e marcar a quantidade ingerida:

Tabagista	Etilista	Por quanto tempo	Há quanto tempo parou
Cigarro	Cachaça, Pinga	Cigarro: Pinga:	Cigarro: Pinga:
Cigarro de palha	Cerveja	Cerveja: C. Palha:	Cerveja: C. Palha:
Charuto	Conhaque	Charuto: Conhaque:	Charuto: Conhaque:
Cachimbo	Whisky	Cachimbo: Whisky:	Cachimbo: Whisky:
Outro	Vinho		
	Run		
	Outra		

APÊNDICE C – LESÃO NEOPLÁSICA**Lesão Neoplásica**

Prontuário nº: _____

Nome: _____

Tipo histológico: _____

Localização _____ do _____ tumor: _____

Classificação TNM (tamanho do tumor, presença de linfonodo acometido e metástase _____ à _____ distância): _____

Sessões de radioterapia: _____

Tempo _____ da _____ radioterapia _____ (meses): _____

Término da radio: _____ / _____ / _____

Tratamentos coadjuvantes:

Cirurgia? () Sim () Não

Qual? _____

Quimioterapia? () sim () não

Quantas sessões? _____

Iodoterapia? () Sim () Não

Quantas sessões? _____

Obs: _____

APÊNDICE D - ANÁLISE BUCAL

Análise bucal

Nome: _____

Saburra Lingual:

() Presente () Ausente

***Há necessidade de Prótese:**

() Prótese Total Sup. e Inf. () Prótese Total Superior () Prótese Total Inferior

() Prótese Parcial Superior () Prótese Parcial Inferior

***Usuário de Prótese:**

() Prótese Total Sup. e Inf. () Prótese Total Superior () Prótese Total Inferior

() Prótese Parcial Superior () Prótese Parcial Inferior

ANÁLISE SALIVAR

Desprezar a espuma da saliva e medir o volume:

- Fluxo salivar até o 5^o minuto: _____ ml/min

Fluxo salivar estimulado: normal: 1 a 3 ml/min

- PH com a fita colorimétrica: _____

Xerostomia: Faz uso de saliva artificial

() Sim () Não

() Sim () Não

Uso de antibióticos nos últimos 30 dias

() Sim () Não

