



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE**

**REBECA MOTA VASCONCELOS**

**BIOMARCADORES MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS  
PREDITIVOS DA FASE INICIAL DA MUCOSITE BUCAL EM  
PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

Salvador  
2016

**REBECA MOTA VASCONCELOS**

**BIOMARCADORES MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS  
PREDITIVOS DA FASE INICIAL DA MUCOSITE BUCAL EM  
PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Odontologia.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Maria Pedreira  
Ramalho

Coorientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Corby

Salvador  
2016

Vasconcelos, Rebeca Mota  
Biomarcadores Microbiológicos e Imunológicos Preditivos  
da Fase Inicial da Mucosite Bucal em Pacientes com  
Câncer de Cabeça e Pescoço. / Rebeca Mota Vasconcelos.  
Salvador 2016.  
73 f.: il.

Orientador(a): Profa Dra Luciana Maria Pedreira Ramalho.  
Coorientador(a): Profa Dra Patrícia Corby.  
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia e Saúde - Universidade Federal da Bahia) –  
Faculdade de Odontologia. Salvador 2016.

1. Mucosite bucal. 2. Sistema immune inato. 3. Radioterapia,  
4. Câncer. 5. Microorganismos. 6. Bactérias. I. Ramalho,  
Luciana Maria Pedreira. II. Corby, Patrícia. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ODONTOLOGIA E SAÚDE

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**C.D. REBECA MOTA VASCONCELOS,**

**“BIOMARCADORES MICROBIOLÓGICOS PREDITIVOS DA FASE INICIAL DA MUCOSITE BUCAL EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO”**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho (Orientador)**  
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

---

**Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Examinador Interno)**  
Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

---

**Profa. Dra. Manoela Carrera Martinez Cavalcante Pereira (Examinador Externo)**  
Professora da Universidade do Estado da Bahia - UNEB

---

**Profa. Dra. Soraya Castro Trindade (Examinador Externo)**  
Professora da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

---

**Prof. Dr. Jener Gonçalves de Farias (Examinador Externo)**  
Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

## AGRADECIMENTOS

Ao meu DEUS, pelo dom da vida, por ter me escolhido para ser a sua filha e por ter me sustentado e guiado os meus passos. A fé que existe dentro de mim move montanhas, abre qualquer mar e me faz crer no impossível e invisível. A Ele, toda a honra e toda a glória. Sempre.

Aos meus pais, Marília e Carlos, pelo amor incondicional, pela vida e por fazerem do meu sonho, o sonho de vocês. A segurança e o apoio sem medidas, ora transmitidos, foram essenciais para a realização deste estudo, de forma tranquila e serena. Agradeço-os por todos os sacrifícios submetidos com o único intuito de ver o brilho nos olhos de uma filha realizada e por viverem cada emoção desta caminhada ao meu lado.

À minha irmã gêmea, Carol, minha melhor amiga e maior fã, por estar ao meu lado em todas as circunstâncias; por me entender e apoiar, em cada passo dado, e por genuinamente torcer e almejar a minha felicidade. Obrigada pelo colo e ombro amigo, pelas palavras sinceras e sem peso, e, principalmente, por ter me presenteado com duas anjinhas durante esta caminhada: as minhas sobrinhas, Leleti e Camilinha, as novas razões para seguir em frente e nunca desistir dos meus sonhos.

À minha vizinha Deja, pela certeza de que estou sendo protegida pelos anjos do céu enviados por ti.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Ramalho, minha orientadora e amiga. Apesar de estar comigo desde o início da minha caminhada na Odontologia, apoiando-me, aconselhando e incentivando, eu só tive o prazer de tê-la como orientadora no curso do Doutorado. Foi ela que me deu as mãos, acreditou em mim, e, graças a esta oportunidade concedida, consegui realizar alguns sonhos e descobrir aonde quero chegar profissionalmente. Não tenho palavras para agradecer, mas espero um dia retribuir-lhe pouco a confiança proporcionada. Enquanto esse dia não chega, deixo a minha sincera amizade e o meu muito obrigada!

À minha coorientadora, Dr<sup>a</sup> Patrícia Corby, pela inesperada confiança ao me presentear com este lindo projeto, o da Mucosite, do qual tenho muito orgulho de chamar de nosso, por me inserir no mundo da pesquisa clínica e por me ajudar na realização de alguns sonhos. Agradeço, por ter me ensinado que através da força do pensamento positivo, disciplina e persistência tudo é possível. Senti-me muito querida, segura durante todo o processo de adaptação e muito estimulada pelos desafios apresentados em prol do meu crescimento.

Ao coordenador do curso da Pós-graduação, Prof. Dr. Jean Nunes, uma das pessoas mais íntegras, sábias e humildes que já conheci, pela disponibilidade em compartilhar conhecimento e principalmente pela paciência.

A todos os professores da pós-graduação da FOUFBA, pela dedicação, compromisso, competência e seriedade com que desenvolvem suas atividades e pelo incentivo na pesquisa científica.

A Sr<sup>a</sup> Sueli e aos demais funcionários do curso da Pós-Graduação da FOUFBA, pela dedicação e atenção destinadas durante todo o nosso convívio, conseguindo alcançar, com equilíbrio, a eficiência no trabalho burocrático, e pelo acolhimento carinhoso.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Flávia Caló de Aquino Xavier, ao prof. Dr. Fábio Daumas Nunes e à prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues pela oportunidade proporcionada e acolhimento carinhoso no Laboratório da Patologia Molecular, da Universidade de São Paulo.

A CAPES, pela avaliação científica e pelo apoio financeiro.

À Julie, por toda transmissão do conhecimento e pela companhia nas madrugadas e nos finais de semanas. Seu apoio e sacrifícios foram pontos-chave para a realização deste trabalho.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yihong Li, por me receber, de braços abertos, em seu laboratório e, principalmente, por me “emprestar” a sua estudante de Doutorado, Kik, seus braços direito e esquerdo, a qual, com toda paciência e disponibilidade, ensinou-me muito do que hoje eu sei sobre o mundo da Microbiologia.

Ao Prof. Dr. Daniel Malamud e sua assistente, técnica e braço direito Cheryl Barber pelo carinho que me receberam no laboratório das ciências básicas e por todo ensinamento no mundo das moléculas e na tecnologia da inflamação.

Ao Prof. Dr. Bruce Paster, pesquisador de ponta da faculdade de Harvard, humildade em pessoa, pela honra de conhecer e privilégio de ter as minhas amostras processadas em seu laboratório. Obrigada também pelo suporte com a análise metagenômica realizada pela simpática pós-Doc., Dr<sup>a</sup>. Lina Faller, que, com toda sua expertise em Bioinformática, possibilitou-nos chegar aos resultados deste estudo.

À equipe do centro de pesquisa clínica Bluestone, que me recebeu com muito carinho e abriu-me horizontes para o mundo da pesquisa clínica.

Ao médico Dr. Sanfilippo e o seu braço direito, a enfermeira Beverly, pela dedicação no recrutamento dos pacientes, pela disponibilidade e, principalmente, por me fazer acreditar que este é um estudo no qual vale a pena todo esforço.

Aos componentes da banca de qualificação, profa Dra Soraya Castro Trindade e Prof. Dr. Jean Nunces, pelos questionamentos, pelas pontuações e sugestões fundamentais que muito contribuíram para a conclusão da tese.

A amiga Virginia, pela tranquilidade, força transmitida e vibrações positivas em todos as fases do Doutorado. Mesmo estando tão longe, contigo eu pude contar em TODOS os momentos: *manhã, tarde, noite, madrugada*. Você além de ter sido o meu braço direito e esquerdo para a finalização desta tese, foi o grande presente que ganhei neste curso. Muito Obrigada!

A Gardênia, agradeço por me mostrar que crescer sozinho na vida é muito difícil, que é fundamental ter alguém de confiança ao nosso lado e que precisamos ser humildes para pedir ajuda nos momentos de aperto. Você se tornou minha companheira e amiga a partir do momento que me permitiu participar da sua História. Sou muito grata pela confiança depositada. A sua determinação e força de vontade se tornaram espelho para mim.

Às amigas conquistadas durante o programa da Pós-Graduação, Virgínia, Taíse, Lia e Paula Paes, pelas vibrações positivas e demonstrações de carinho.

Aos colegas da turma do Doutorado, Gardênia, Adna, Leo Melo, Marcelo, Bráulio, Isaac, Luana, Cristiano e Leonardo Provedel, pela parceria durante esses quatro anos de convivência, tornando mais leve, fácil e prazerosa a luta do dia a dia.

Às amigas, Tatiana e Flávia, pelas inúmeras mensagens de textos ou de voz, as quais sempre provocavam um sorriso no rosto e, principalmente, pelos pensamentos e pelas energias

positivas que, sem sombra de dúvidas, almejavam nada além da minha vitória e do meu sucesso.

Aos meus sócios e amigos, Camilo e Diana, por terem me apoiado, sem hesitar, na minha decisão profissional, deixando claro que o mais importante seria a minha felicidade.

A Joseph Healey, pelas incansáveis horas de espera por detrás dos bastidores e pelos agradáveis momentos de alegrias proporcionados.

Aos queridos amigos e exemplo de casal, Danilo e Carolzinha, por me receberem com muito carinho na residência deles, em São Paulo, fazendo me sentir à vontade, como se estivesse em minha própria casa.

Ao meu grupo de oração composto por irmãos de fé – Angie, Jennie, Wayne, Lee, Edmond, Daniel, Steven, Lhana e Marcela –, pelas inúmeras orações as quais aliviaram o meu cansaço e me deram forças para persistir.

A Érica Queiroz, pela sua garra e força de vontade, as que se tornaram exemplo para a minha persistência. A sua história me fez acreditar na minha vitória.

A Marta Gabinskiy, grande amiga slovakiana, por todo suporte emocional e pela alegria visível ao se deparar com cada vitória alcançada.

A Kira Nightingale, pela paciência, sabedoria e boa vontade para responder às minhas inúmeras dúvidas sobre coordenação de um *clinical trial*.

E, principalmente aos pacientes, pelo tempo e esforço fornecido para participar deste estudo. Sem eles, nada seria possível. Recordo-me de cada um com muito carinho e muita gratidão.

Tudo quando fizerdes, fazei-o de todo coração, como para o Senhor, e não para homens, cientes de que recebereis do Senhor a recompensa da herança.

A Cristo, o Senhor, é que estais servindo.

Colossenses 3 (v. 3-24)



## RESUMO

**Introdução:** A Mucosite bucal (MB) é um dos efeitos adversos mais debilitantes em pacientes com câncer tratados com radioterapia (RT) ou quimiorradioterapia (químioRT). O tratamento por RT e químioRT provoca uma profunda resposta inflamatória, resultando em danos ao endotélio vascular e formação de úlceras bucais, as quais estão susceptíveis à colonização de microrganismos.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi indentificar o perfil de microrganismos que possam atuar como biomarcadores de diagnóstico inicial da MB em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a RT e/ou químioRT.

**Metodologia:** Um total de 15 pacientes agendados para receber RT ou químioRT foram recrutados. Amostras de biofilmes bucais foram coletado em sítios específicos antes do início do tratamento anti-neoplásico (Visita 1) e, no primeiro dia em que a lesão de MB foi identificada (Visita 2). Alterações na abundância microbiológica foram detectadas através da técnica de *Human Oral Microbe Identification Next Generation Sequencing* (HOMINGS) e análises metagenômicas. Amostras de saliva também foram coletadas nos mesmos períodos acima mencionados para avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e quantificação de *Candida spp.*

**Resultado:** Alterações na abundância relativa de biomarcadores microbiológicos foram observadas entre a Visita 1 e a Visita 2 deste estudo. Espécies discriminantes, como *Gemella haemolysans* ( $p=0,000$ ), *Granulicatella elegans* ( $p=0,000$ ), *Haemophilus spp.* ( $p=0,000$ ) e *Streptococcus spp.* ( $p=0,0014$ ) foram significativamente mais abundantes nas amostras encontradas durante a Visita 2. Não foram encontradas mudanças significativas entre as visitas ao analisar a contagem de *Candida spp.* ( $p=0,239$ ), no entanto, observou-se que os pacientes que apresentaram um aumento significativo de *Candida* entre Visita 1 e Visita 2 desenvolveram MB mais rapidamente ( $p=0,031$ ). Biomarcador inflamatório salivar, a citocina IL-6, apresentou aumento significativo durante a fase inicial da MB ( $p=0,037$ ).

**Conclusão:** Nossos resultados sugerem uma mudança dinâmica da microbiologia bucal durante o início da MB, o que sugere que estas espécies têm a capacidade de atuar como agentes patogênicos oportunistas em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a RT e/ou químio-RT. Estudos mais aprofundados são necessários para explorar a atuação destes microrganismos no desenvolvimento inicial de mucosite bucal, criando condições para o surgimento de abordagens terapêuticas com impacto na prevenção e/ou prognóstico dessas lesões.

**Palavras Chaves:** Mucosite bucal, Sistema immune inato, Radioterapia, Câncer, Microorganismos, Bactérias.

## ABSTRACT

**Introduction:** Oral mucositis (OM) is among the most common, painful and debilitating toxicities of cancer regimen-related treatment. Physiologically, chemotherapy (CT) and radiotherapy (RT) evoke a profound inflammatory response, resulting in the formation of ulcers, which are susceptible to increased colonization of microorganisms.

**Objective:** The aim of this study is to explore the changes in the microbiome at the OM onset in head and neck cancer patients undergoing RT alone or chemoRT.

**Methods:** We recruited 15 patients scheduled for receiving RT or chemoRT. Site-specific oral biofilms samples were collected using Isohelix swabs at two time points: before initiating RT/ChemoRT, and at the onset of OM. Changes in microbial abundance were detected using the Human Oral Microbe Identification using Next Generation Sequencing (HOMINGS) and metagenomic analyses. Stimulated whole saliva samples were also collected at the same time points. Changes in the levels of pro-inflammatory cytokines and quantitative evaluations of *Candida spp.* were measured.

**Results:** Relative changes in abundance of microbial biomarkers in 15 subjects were discriminative between pre and post OM onset. Discriminant species such as *Gemella haemolysans* ( $p=0.000$ ), *Granulicatella elegans* ( $p=0.000$ ), *Haemophilus spp.* ( $p=0.000$ ) and *Streptococcus spp.* ( $p=0.0014$ ) were found to be significantly overabundant at the OM onset samples. No significant changes in the total *Candida spp.* counts were observed between both timeline ( $p=0,239$ ), however, the OM onset was negatively correlated with this microbial ( $p=0,031$ ). Salivary inflammatory biomarkers, noted in levels of IL-6 had a significant increase at the onset of OM ( $p=0.037$ ).

**Conclusion:** Our results suggest a dynamic shift in the oral microbiome during the onset of OM. These species may act as opportunistic pathogens in this population, and further investigation is warranted to explore if they facilitate further tissue damage and contribute to the development of oral mucositis in cancer patients.

**Key Words:** Oral Mucositis, innate immune system, Radiation therapy, cancer, microbiome, bacterial

## LISTA DE ABREVIATURAS

MB	-	Mucosite Bucal
RT	-	Radioterapia
QT	-	Quimioterapia
quimioRT	-	Quimioradioterapia
TCTH	-	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
MMP	-	Matrix Metaloproteínases
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
ROS	-	Oxigênio reativo
NFκ-B	-	Fator nuclear κ-B
TNF-α	-	Fator de necrose tumoral - α
IL	-	Interleucina
MAPK	-	Via de sinalização MAP-quinase
JNK	-	Via de sinalização <i>cJun N terminal quinase</i>
AP-1	-	Fator de transcrição ativador protéico 1
PRR	-	Receptores de reconhecimento-padrão
TLR	-	Receptores <i>toll-like</i>
NLR	-	Receptores <i>nod-like</i>
PAMP	-	Moléculas associadas a patógenos
LPS	-	Lipopolissacarídeo
DAMP	-	Moléculas endógenas liberadas no processo de apoptose
CLR	-	Receptores de lectina tipo C
RAGE	-	Receptores de produtos finais de glicosilação avançada
HMGB1	-	Proteína do grupo de alta mobilidade 1
CRAMPs	-	Moléculas-padrão, associadas a danos endógenos, liberadas por ação da quimioterapia ou radioterapia
NYULMC	-	Universidade de Nova York, <i>Langone Medical Center</i>
EORTC QLQC30	-	Questionário de Qualidade de Vida da Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer
EORTC QLQH&N35	-	Questionário de Qualidade de Vida da Organização Europeia para Pesquisa específico para Cabeça e Pescoço
AJCC	-	Comitê Americano de Câncer
TNM	-	Tamanho do Tumor, Linfonodos afetados, Metástase

ETSA	-	Agar Soja Enriquecido Trypticase
UFC	-	Unidades formadoras de colônias
HOMINGS	-	Técnica de Identificação de Microorganismo Humano Oral
NGS	-	<i>Next Generation Sequencing</i>
PBS	-	Solução salina tamponada com fosfato
MSD	-	Tecnologia <i>Meso Scale Discovery</i>
cGy	-	Centigray - Dose de radiação absorvida
LEfSe	-	Tamanho do efeito da análise discriminante linear
LDA	-	Análise discriminante linear
OTU	-	Unidade Taxonômica Operacional
MaAsLin	-	Associação de Multivariância usando Modelos Lineares

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Demonstração esquemática da patogênese da mucosite bucal	22
Figura 2	Descrição ilustrativa das vias moleculares envolvidas na interação entre microbiota-hospedeiro e desenvolvimento da MB	34
Figura 3	Modelo de estudo	39
Figura 4	Lesões de MB apresentadas em pacientes com câncer na cavidade bucal	45
Figura 5	Lesões de MB apresentadas em pacientes com câncer de orofaringe	46
Figura 6	Descrição ilustrativa do aumento do número de UFC de <i>Candida albicans</i> entre as visitas do estudo	49
Figura 7	Descrição ilustrativa da mudança do tipo de espécie de <i>Candida</i> entre as visitas do estudo	49
Figura 8	Representação esquemática dos passos estatístico e computacional implementados em LefSe	53
Figura 9	Análise metagenômica de padrões de abundância microbiológica entre Visita 1 e Visita 2	54
Figura 10	Análise de padrões de abundância microbiológica (Visita 1 X Visita 2, em sítios isolados da mucosa bucal)	56
Figura 11	Análise de padrões de abundância microbiológica (Visita 1 X Visita 2, em sítios isolados da língua)	57
Figura 12	Análise de padrões de abundância microbiológica entre as duas visitas do estudo em câncer da cavidade bucal	58
Figura 13	Análise de padrões de abundância microbiológica entre as duas visitas do estudo em câncer da região de cabeça e pescoço (orofaringe, nasofaringe e sítio primário desconhecido)	59

## LISTA DE TABELA

Tabela 1	Alteração da microbiota bucal durante e após terapia do câncer	28
Tabela 2	Distribuição dos pacientes com câncer da cavidade bucal e de outros tipos de câncer de cabeça e pescoço segundo variáveis sociodemográficas e terapia de escolha	47
Tabela 3	Características do tratamento do câncer em pacientes com câncer da cavidade bucal e de outros tipos de câncer de cabeça e pescoço	48
Tabela 4	Análise de UFC de <i>Candidas</i> e de Bactérias cultiváveis entre Visita 1 e Visita 2	48
Tabela 5	Análise de regressão múltipla do início do desenvolvimento da MB (em semanas) segundo variáveis clínicas	51
Tabela 6	Representação esquemáticas da análise de padrões de abundância microbiológica de em câncer da cavidade bucal e outros tipos de câncer de cabeça e pescoço	60
Tabela 7	Análise de citocinas pró-inflamatórias entre a visita de base e a fase inicial de desenvolvimento da MB	61

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Gráfico representando correlação entre <i>Candida</i> e fluxo salivar	52
Gráfico 2	Gráfico representando correlação entre <i>Candida</i> e pH da saliva	52
Gráfico 3	Possíveis biomarcadores preditivos da fase inicial da MB (Visita 2)	55
Gráfico 4	Possíveis biomarcadores preditivos da MB encontrados em sítios específico da mucosa bucal	56
Gráfico 5	Possíveis biomarcadores preditivos da MB encontrados em sítios específico de língua	57

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1 MUCOSITE .....	18
2.2 PATOGÊNESE DA MB .....	20
2.3 A IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA BUCAL NA GRAVIDADE DA MB ...	23
2.4 ABORDAGEM TERAPÊUTICA ENTRE A MB E A MICROBIOTA BUCAL	32
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	35
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>36</b>
4.1 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO.....	36
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	36
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	37
4.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO .....	37
4.5 MODELO DE ESTUDO .....	37
4.6 AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	41
4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	43
4.8 ANÁLISE IMUNOLÓGICA.....	44
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
5.1 CASUÍSTICA.....	45
5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: TÉCNICA DE SEMEADURA .....	48
5.3 ANÁLISE METAGENÔMICA: BIOMARCADORES PREDITIVO- MICROBIOLÓGICOS .....	53
.....	59
5.4 ANÁLISE DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS .....	60
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>83</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A Mucosite bucal (MB) é um dos efeitos adversos mais debilitantes em pacientes com câncer tratados com radioterapia (RT) ou quimiorradioterapia (quimioRT) (Sonis 2004b; 2007; 2011; Laheij et al. 2012; Wang et al. 2013). O tratamento por RT e por quimioRT resulta na formação de úlceras bucais as quais estão susceptíveis à colonização de microrganismos (Scully et al. 2003; 2004; Scully et al. 2006; Al-Dasooqi et al. 2013). A morbidade associada à MB é atribuída primordialmente ao risco de infecção, desidratação, desnutrição e dor a ela associados. Os sinais e sintomas associados à MB afetam negativamente a capacidade dos indivíduos em se alimentar e podem causar perda significativa de peso e hospitalização durante o tratamento do câncer. Outros efeitos adversos da terapia antineoplásica relatados pelos pacientes incluem fraqueza, letargia, xerostomia, alteração do paladar e sensibilidade na cavidade orofaríngea (Quinn et al. 2007).

Em média, 80% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à RT ou quimioRT e quase 100% dos transplantados de células-tronco hematopoiética (TCTH) desenvolvem MB (Trotti et al. 2003b; Sonis 2005). Os efeitos adversos associados à MB também causam danos funcionais e dores severas, contribuindo para um relevante aumento nos custos dos cuidados à saúde. Em pacientes que apresentam lesões de MB clinicamente significativas, existe um alto risco de que o tratamento do câncer seja interrompido, contribuindo negativamente para o sucesso geral do tratamento, uma vez que será necessário diminuir a dose da quimioterapia, adiar ou até descontinuar o tratamento (Sonis 2004b). Em pacientes com mucosite grave, a ingestão nutricional é drasticamente reduzida, requerendo, muitas vezes, a inserção de sondas gástricas endoscópicas percutâneas, o uso de analgésicos sistêmicos, antibióticos intravenosos e o prolongamento do tempo hospitalar. Todos esses fatores também contribuem para o aumento do custo do tratamento por paciente (Sonis 2004b; Stiff et al. 2006; Laheij et al. 2012; Sonis 2013; Wang et al. 2013).

Apesar das diversas recomendações ao tratamento da MB, atualmente não existe nenhuma terapia efetiva ou tratamento preventivo para essa

condição (Sonis 2004a). A maioria dos tratamentos fornece apenas alívio mínimo aos sintomas dessa condição e não inclui nenhuma recomendação definitiva de cuidado bucal. Muitos estudos clínicos têm sugerido que a atenção odontológica e a manutenção da saúde bucal durante o tratamento do câncer podem reduzir a gravidade da MB, sugerindo influência da microbiota bucal no curso e na gravidade da MB, por meio da indução de alterações na mucosa e da inflamação local (Elad et al. 2013a; Elad et al. 2013b; Lalla 2013).

Evidências emergentes suportam a importância da microbiota bucal na gravidade da MB. É reconhecido que alterações dramáticas do meio bucal, em pacientes com câncer, causam um desequilíbrio dessa microbiota. Tal desequilíbrio é geralmente observado como resultado de fatores como exposição direta dos pacientes aos efeitos citotóxicos de medicamentos, de alterações na liberação de citocinas, da redução do fluxo salivar e do uso de antibióticos. A formação de subseqüentes úlceras, susceptíveis à colonização microbiana, também contribui para o desequilíbrio ecológico na cavidade bucal (Scully et al. 2003; 2004; Scully et al. 2006; Al-Dasooqi et al. 2013).

Atualmente, estudos intervencionais baseados no modelo da patogênese da MB têm sido amplamente discutidos na literatura, entretanto o papel da microbiota bucal no desenvolvimento da MB ainda é duvidoso. O presente trabalho pretende contribuir para a identificação de microorganismos envolvidos na fase inicial da MB, bem como de citocinas pró-inflamatórias expressas na cavidade bucal antes e após o seu aparecimento em pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço. Os resultados deste estudo irão contribuir para o melhor entendimento da patogênese da MB, criando condições para o surgimento de novas abordagens terapêuticas com impacto no prognóstico dessas lesões.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MUCOSITE

A mucosite é uma reação tóxica inflamatória que afeta a mucosa orofaríngea e o trato gastrointestinal, sendo seqüela dos tratamentos de radioterapia e/ou quimioterapia para o câncer ou em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (Elting et al. 2003; Trotti et al. 2003a). Essa condição compromete a qualidade de vida do paciente e está associada ao aumento na frequência de hospitalização, ao uso de nutrição parenteral e à interrupção do tratamento, com efeito adverso no controle do câncer. Para dimensionar a importância da sua prevenção e controle, pode-se afirmar que, entre 9% e 19% das interrupções de quimioterapia e radioterapia são devidas à mucosite (Trotti et al. 2003a).

A incidência da MB está associada a variáveis relacionadas ao paciente e ao tratamento ao qual ele está sendo submetido. Por exemplo, a quimioterapia concomitante a RT resulta em aumento da frequência, gravidade e duração da mucosite bucal. A localização anatômica primária do tumor também é um fator de relevância. Por exemplo, a probabilidade de um paciente com carcinoma de língua submetido à quimioRT em desenvolver mucosite bucal é de quase 100%. Por outro lado, um paciente com câncer de hipofaringe também recebendo quimioRT tem o mesmo risco situado em torno de 50%, pelo fato de os tecidos da cavidade bucal não estarem incluídos no campo primário de radiação. Os pacientes receptores de transplante de células-tronco hematopoiética são considerados com alto risco em desenvolver MB em consequência da grave imunodepressão necessária para que o transplante não seja rejeitado pelo sistema imunológico do hospedeiro, causada pela quimioterapia e/ou radioterapia (Sonis 2009).

Apenas 19% do total de casos anuais de MB ocorrem em câncer de cabeça e pescoço e em populações de TCTH (Sonis 2009). É possível que, além do campo de irradiação, outros fatores como idade, massa corporal, sexo, estado nutricional, estado de saúde, higiene bucal, função salivar e microbiota bucal têm sido identificados como de risco. O número de ciclos de quimioterapia ao qual o paciente foi submetido também está diretamente

relacionado ao risco de se desenvolver MB. Por exemplo, a probabilidade de um paciente com câncer de mama tratado com regime convencional em desenvolver MB gira em torno de 20% durante o primeiro ciclo de quimioterapia. No entanto, no segundo ciclo, esse mesmo risco aumenta para mais do que 60%.

Além disso, o próprio tumor é biologicamente ativo e pode contribuir para o risco da MB. Peptídeos derivados de tumores e produtos proteicos podem modificar diretamente a resposta de células normais frente à radioterapia ou quimioterapia (Barasch and Peterson 2003) enquanto outros, como as metaloproteinases de matriz (MMPs), aumentam a ruptura do tecido local (Sonis 2009). Outras condições pré-existentes, como psoríase e doença de Addison, também podem influenciar o risco a MB, estando a psoríase associada a um menor risco, devido a seu efeito na proliferação epitelial, e a doença de Addison a um risco aumentado em virtude do alto nível de citocinas pró-inflamatórias pré-existentes (Sonis 2009). Também relacionado à condição oral, os danos provocados às glândulas salivares causam redução no fluxo e alterações na composição da saliva e do seu pH, que são seguidas de mudanças na microbiota bucal, elevando o risco de desenvolvimento da infecção (Chan et al. 2003).

A manifestação clínica da mucosite pode aparecer no início da terapia e geralmente é caracterizada como uma área de eritema que, em seguida, é substituída por placas brancas descamativas dolorosas ao contato. Crostas epiteliais e exsudato fibrinoso levam à formação de pseudomembrana e ulceração, representando a forma mais pronunciada da mucosite. Os pacientes, invariavelmente, apresentam sintomatologia dolorosa. A forma mais grave da mucosite é representada pela exposição do estroma do tecido conjuntivo subjacente devido à perda de células epiteliais. A sintomatologia aumentada desses casos relaciona-se ao fato desse tecido conjuntivo ser ricamente innervado, causando dor intensa (Miller and Quinn 2006).

A mucosite pode ser facilmente confundida com candidíase. Entretanto, deve-se atentar para a possibilidade de infecção secundária da úlcera por *Candida albicans* (Biron et al. 2000).

Várias escalas de classificação têm sido descritas para avaliar os graus de mucosite em pacientes oncológicos com base na presença de sinais como

eritema e lesões, isolados ou concomitantemente a sintomas como dor e dificuldade de deglutição (Sonis et al. 2004). Uma das escalas mais usadas é a da OMS (Organização Mundial de Saúde), na qual a MB pode ser classificada em cinco graus diversos (Apêndice A): grau 0 – indica ausência de mucosite; grau I – eritema ou sensibilidade leve; grau II – presença de eritema doloroso, edema, ou úlceras que não interferem na capacidade do paciente em alimentar-se; grau III – úlceras confluentes que interferem na capacidade do paciente em ingerir alimentos sólidos; e grau IV – sintomas tão graves que o paciente requer suporte enteral ou parenteral (Sonis et al. 2004; Quinn et al. 2007).

## 2.2 PATOGÊNESE DA MB

Historicamente, a patobiologia da mucosite era considerada um resultado exclusivo de injúrias causadas ao epitélio pela exposição deste à RT e/ou quimioRT, levando à morte celular. Sonis (1998) propôs o primeiro modelo clássico de quatro fases interdependentes para explicar a patogênese da mucosite bucal (Sonis 1998). Após o surgimento de novas descobertas científicas as quais incluem vias mais complexas, como a interação microbiota-hospedeiro e as vias moleculares, esse modelo foi revisto alguns anos mais tarde por Sonis e seus colaboradores, e uma quinta fase nesse processo patobiológico da mucosite bucal foi incluída (Sonis 2004b). A representação esquemática desse modelo é mostrada na Figura 1. Resumidamente, as fases da patogênese da mucosite são:

a) Iniciação: ocorre imediatamente após a administração da RT e/ou quimioRT, levando a danos diretos ou não ao DNA. Nessa fase, ocorre a quebra nas moléculas de DNA resultando em lesão celular direta das células basais do epitélio e da submucosa. Simultaneamente, ocorre produção de oxigênio reativo (ROS), um radical livre que causa danos tanto ao DNA quanto ao tecido. Esses fatos ativam uma cascata de eventos biológicos os quais geram morte celular, embora, clinicamente, a mucosa pareça íntegra e normal nesse estágio;

b) Reação primária da lesão: os danos causados diretamente ao DNA ou não e à espécies reativas do oxigênio provocam uma série de eventos bastante

complexos. Nesse momento, ocorre a ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ -B) em resposta à radiação, a inúmeras drogas quimioterápicas e ROS. Uma vez ativado, o NF $\kappa$ -B leva ao aumento da regulação de vários genes promovendo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL)- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-6, resultando em injúria tecidual e apoptose (Sonis et al. 2004; Sonis 2009; Russi et al. 2014). Em paralelo à ativação de NF $\kappa$ -B, enzimas como a esfingomielinase e a ceramida sintetase, que catalizam a síntese de ceramida, são ativadas diretamente pela quimioterapia e RT, ou indiretamente, pelas espécies reativas de oxigênio. A via da ceramida induz apoptose tanto em células da submucosa, como em células epiteliais (Sonis et al. 2004). Adicionalmente, a destruição da fibronectina também ocorre nessa fase da mucosite, resultando na ativação de macrófagos e na subsequente injúria tecidual, mediadas pelas metaloproteinases (MMPs) e na produção adicional de TNF- $\alpha$  (Sonis et al. 2004; Clark et al. 2008; Russi et al. 2014).

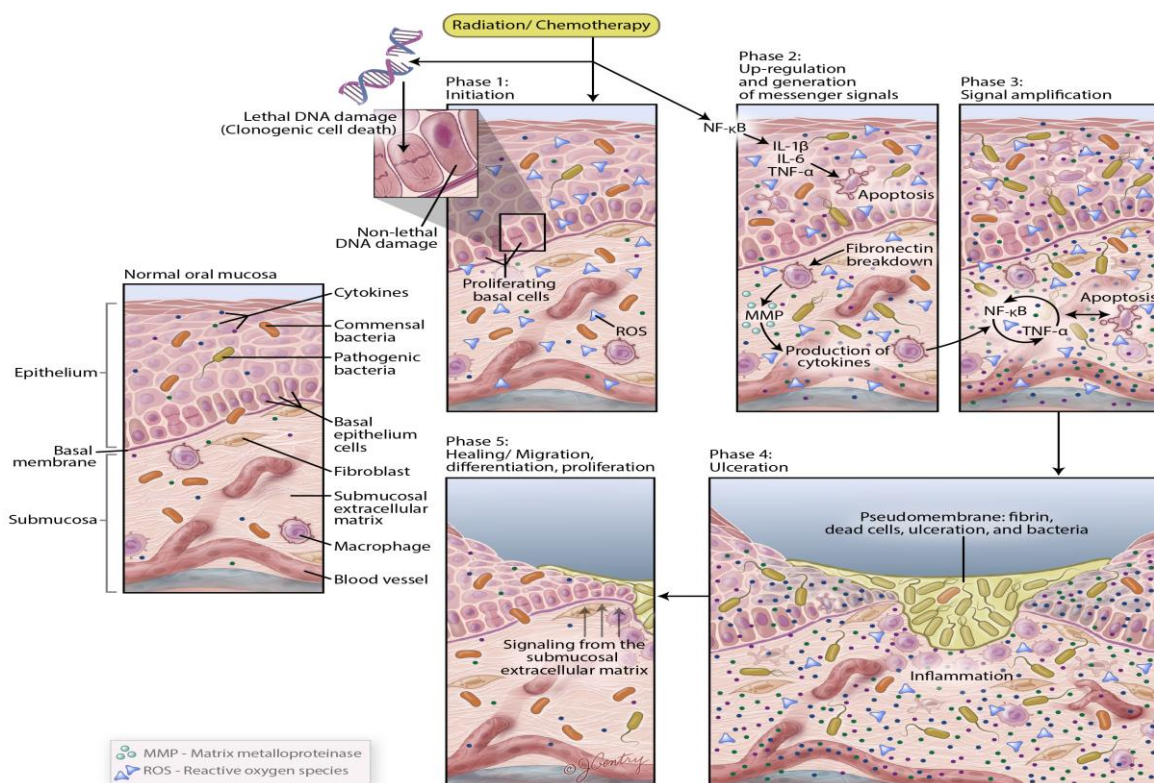
c) Amplificação: além dos efeitos diretos sobre as células da mucosa, nessa fase, a liberação de mediadores inflamatórios, em resposta ao tratamento do câncer, tem como consequência uma série de *feedbacks* positivos, amplificando e prolongando a injúria tecidual, resultando em apoptose e liberação de mais citocinas pró-inflamatórias. Por exemplo, a liberação de mais TNF- $\alpha$  causa um feedback positivo no NF- $\kappa$ B que amplifica sua resposta e inicia a via de sinalização MAP-quinase (MAPK). Uma vez ativada, a MAPK ativa a via cJun N terminal quinase (JNK), que é um importante regulador do fator de transcrição ativador protéico 1 (AP-1), que, por sua vez, pode afetar a secreção de MMPs, resultando em mais danos teciduais e na apoptose (Sonis et al. 2004; Sonis 2009; Russi et al. 2014; Stringer and Logan 2015; Villa and Sonis 2015). Nessa fase, o tecido ainda parece normal, pois o foco do evento ainda está ocorrendo na submucosa e na camada basal do epitélio, apesar de o tecido se encontrar alterado biologicamente (Sonis 1998; 2004b; Sonis et al. 2004; Sonis 2009; Villa and Sonis 2015). Vale ressaltar que as três fases citadas culminam na fase de ulceração.

d) Ulceração: consiste no ponto clínico crítico da mucosite, sendo a mais sintomática, e talvez, a mais complexa. A lesão e a morte das células basais epiteliais resultam em mudanças atróficas que levam a deterioração e perda de

integridade da mucosa. Nessa fase, é comum a ocorrência de infecção secundária, visto que a úlcera serve de foco para a colonização de microorganismos. Os produtos tóxicos da parede celular das bactérias penetram na submucosa, estimulando a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, o que resulta em inflamação, dor, possíveis infecções secundárias ou influxo sistêmico de microorganismos e toxinas que, quando associado à neutropenia induzida pelas drogas quimioterápicas e, pela RT, aumenta o risco de bacteremia e septicemia (Sonis 2004b; Sonis et al. 2004).

e) Cicatrização: ocorre a sinalização da matriz extracelular, que estimula a migração, proliferação e diferenciação do epitélio, resultando na cicatrização do tecido afetado e no restabelecimento da microbiota local. Nessa fase da MB, a mucosa bucal parece normal na maioria dos pacientes, depois de duas a três semanas, após o término das terapias oncológicas (Wang et al. 2013; Russi et al. 2014; Villa and Sonis 2015; Vasconcelos et al. 2016)

**Figura 1** – Demonstração esquemática da patogênese da mucosite bucal



Fonte: Vasconcelos et al. 2016

A patogênese da MB (Figura 1) engloba uma série de eventos biológicos em conjunto com a influência da microbiota e do ambiente bucal. Em um ecossistema bucal, a homeostase hospedeiro-microbiota é mantida em condições normais de saúde. Uma mudança dramática no ambiente bucal leva a um desequilíbrio na microbiota bucal, influenciando no sistema imune inato e nos mecanismos celulares em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia e à RT. A progressão da MB pode ser resumida em cinco fases: iniciação, aumento da regulação e geração de sinais mensageiros, amplificação, ulceração e cicatrização. Com base nesse modelo, a inflamação, em conjunto com apoptose, leva à perda da integridade da barreira epitelial, promovendo, assim, a translocação bacteriana.

### 2.3 A IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA BUCAL NA GRAVIDADE DA MB

Embora, os danos celulares provenientes da terapia do câncer iniciem o desenvolvimento da MB, a patogênese dessa lesão é considerada multifacetada. Mudanças na microbiota, tanto da cavidade bucal quanto do intestino, podem ser observadas após a quimioterapia e/ou RT. Estudos recentes identificaram uma relação direta entre as interações hospedeiro-microbiotas e mucosites bucal e gastrointestinal, sugerindo uma associação entre a microbiota e a mucosite. Tal associação simbiótica tem sido sugerida como desencadeante de vias de sinalização do sistema imune inato em resposta da interação hospedeiro-microbiota no ecossistema bucal e gastrointestinal durante a fase crítica de desenvolvimento da MB (Laheij and de Soet 2014; Stringer and Logan 2015).

É importante ressaltar que estruturas da cavidade bucal, incluindo dentes, gengiva, língua, lábios, mucosa jugal (bochechas), sulcos gengivais, palato duro e palato mole, assim como o trato digestivo são colonizadas por comunidades microbianas distintas, os quais formam um biofilme de proteção contra patógenos (Aas et al. 2005; Corby et al. 2008; Segata et al. 2012; Vanhoecke et al. 2015). A terapia contra o câncer tem o potencial de causar disbiose microbiana, suprimindo as bactérias comensais da cavidade bucal, e



permitindo uma superpopulação por uma comunidade virulenta de bactérias gram-negativas e fungos patogênicos (Laheij et al. 2012; Panghal et al. 2012; Sonalika et al. 2012; Wang et al. 2013). O rompimento da microbiota bucal também está relacionado com mudanças no comportamento de higiene bucal dos pacientes devido à significativa sintomatologia dolorosa associada com a mucosite bucal (Qutob et al. 2013). Pacientes com MB sofrem, portanto, considerável desconforto e incapacidade em realizar uma higiene bucal apropriada, resultando em aumento do acúmulo de placa bacteriana na cavidade bucal. Conseqüentemente, o aumento bacteriano nocivo e uma resposta inflamatória nos tecidos da mucosa bucal também contribuem em danos à saúde dos tecidos periodontais.

Os microorganismos podem desempenhar um papel relevante no desenvolvimento de mucosites ulcerativas. A maioria das bactérias presentes na cavidade oral é inofensiva, e uma homeostase perfeita é mantida sob condições de saúde normal. Em pacientes com câncer, ocorre uma mudança dramática no ambiente bucal, provocando o desequilíbrio da microbiota bucal, incluindo bactérias, fungos e vírus. Esse desequilíbrio é frequentemente observado devido a fatores como a exposição direta do paciente aos efeitos citotóxicos da medicação, alteração na liberação de citocinas, ou ao uso de antibióticos. Foi estabelecido que certos regimes quimioterápicos causam diminuição transitória da produção salivar, porém clinicamente significativa (Jensen et al. 2008), o que também leva a um desequilíbrio da microbiota bucal e à liberação insuficiente de fatores antimicrobianos. Conseqüentemente, a produção alterada de saliva e a hipofunção salivar também estão relacionadas ao desenvolvimento da MB. Além disso, fisiologicamente, a quimioterapia e a RT provocam uma resposta inflamatória profunda por meio da liberação de mediadores pró-inflamatórios responsáveis por danos e injúrias na mucosa e no endotélio vascular (Sonis 2004b; Sonis et al. 2004; Al-Dasooqi et al. 2013).

### 2.3.1 Estudos Clínicos

A literatura ainda é carente de estudos nos quais se avaliam as mudanças da microbiota bucal decorrentes do tratamento anti-neoplásico (Tabela 1). Um estudo realizado em pacientes com câncer de mama, sob tratamento ambulatorial, usou técnicas moleculares para identificar espécies

microbianas antes e após a quimioterapia. Tais resultados revelaram um aumento no número de espécies microbianas. Um total de 41 espécies foram detectadas, com predominância de *Gemella haemolysans* e *Streptococcus mitis*. Acima de 60% das espécies identificadas na mucosa bucal foram encontradas exclusivamente após a quimioterapia, sugerindo alteração do perfil da microbiota bucal após o tratamento do câncer (Napenas et al. 2010).

A relação entre fungos, bactérias associadas à periodontite e ulcerações bucais foi avaliada em pacientes com câncer submetidos à transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH); nos casos considerados mais graves, uma relação direta foi encontrada entre o aumento, em particular de *Porphyromonas gingivalis*, mas também de *Parvimonas micra*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida glabrata* e *Candida kefyr* e mucosite (Laheij et al. 2012). Ames e colaboradores (2012) analisaram os efeitos do transplante alogênico de células-tronco na microbiota bucal e suas implicações no desenvolvimento de complicações respiratórias. Amostras foram coletadas no baseline– antes e depois do transplante – no momento das contagens mais baixas de neutrófilos e após o enxerto da medula óssea. Amostras adicionais foram coletadas nos casos de desenvolvimento de sinais e nos sintomas respiratórios. Os pacientes foram acompanhados durante 100 dias após o transplante. O número de espécies bacterianas na cavidade bucal dos indivíduos, a exemplo, *Streptococcus*, *Gemella*, e *Veillonella* permaneceu estável antes e após o transplante. Entretanto, o perfil da microbiota bucal apresentou mudanças mínimas em virtude do processo do transplante. O desenvolvimento de complicações respiratórias após o transplante mostrou associação com alterações da microbiota bucal (Ames et al. 2012).

Belazi e outros (2004) mostraram que 77% dos pacientes com carcinomas espinocelulares de boca submetidos a RT e afetados pela MB apresentaram um aumento significativo em *Candida spp* no estágio final da RT (Belazi et al. 2004). Com o intuito de traçar o perfil microbiológico da microbiota bucal nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à RT, amostras de placa supragengival foram coletadas em 8 pacientes antes e após RT em diferentes intervalos de tempos. Uma representação de quatro filos (Actinobactéria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobactéria) e 11 gêneros (*Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Capnocytophaga*, *Dexia*, *Neisseria*,

*Rothia*, *Prevotella*, *Granulicatella*, *Luteococcus*, e *Gemella*) foram encontrados na maioria dos indivíduos. Alterações na abundância de espécies foram igualmente observadas antes e depois da RT, bem como uma correlação negativa entre o número de unidades taxonômicas operacionais e a dose de radiação, confirmando a hipótese de que a exposição à radiação ionizante tem o potencial de perturbar a comunidade microbiana do ambiente bucal (Hu et al. 2013).

A associação entre o vírus do herpes simples (HSV), *Candida ssp.* e espécies bacterianas bucais com grau de gravidade da mucosite bucal foi avaliada em estudo prospectivo realizado em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda. Os autores relataram que a presença de HSV, em especial, o HSV-1 e a *Candida ssp.* estavam associadas com a gravidade da MB (de Mendonca et al. 2012); Van der Beek e colaboradores (2012) estudaram a relação entre a excreção do HSV e a presença de úlceras bucais em recipientes de TCTH. A reativação de HSV-1 na cavidade bucal mostrou-se associada à presença de úlceras bucais, sugerindo que o vírus do herpes-1 é um preditor positivo significativo para ulcerações em mucosas queratinizadas e não queratinizadas (van der Beek et al. 2012). Porém, resultados conflitantes podem ser encontrados na literatura. Um estudo similar realizado por Djuric e outros (2009) relatou que a taxa de reativação de HSV-1 não apresentou nenhuma diferença antes e após a quimioterapia. Além disso, a presença ou ausência de MB não representou nenhuma associação com a taxa de reativação viral (Djuric et al. 2009).

A presença de lesões nos tecidos bucais pode servir como veículo de entrada para a propagação de infecções bacterianas, fúngicas e virais; principalmente em pacientes submetidos a regimes quimioterápicos mielossupressivos ou imunossupressivos para o tratamento do câncer (Raber-Durlacher et al. 2000; Glenny et al. 2004). Blijlevens e outros (2009) sugeriram que a gravidade da mucosite bucal pode estar associada diretamente com casos de neutropenia febril em pacientes submetidos ao TCTH. Nessa revisão, casos críticos de neutropenia febril estavam frequentemente associados com a liberação de citocinas pró-inflamatórias envolvidas com MB, que precedeu a translocação microbiana (Blijlevens et al. 2009). Chavan e outros (2013) relataram que infecções bacterianas evoluíram a partir da predominância de

bactérias gram-negativas para bactérias gram-positivas em um subgrupo de pacientes transplantados após TCTH (Chavan et al. 2013). Do mesmo modo, os pacientes TCTH afetados pela doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) desenvolveram inflamação nas mucosas bucal e gastrointestinal. Essas manifestações clínicas, patológicas e imunológicas são induzidas pelo transplante, diante de um sistema imunológico comprometido. Portanto, a ruptura da microbiota intestinal nesses pacientes pode contribuir para a inflamação do intestino uma vez que compromete a integridade da barreira epitelial e estimula a produção de citocinas (Eriguchi et al. 2012; Taur et al. 2012). Holler e outros (2014) e Jenq e colaboradores (2012) avaliaram a microbiota intestinal nessa mesma população e observaram a prevalência de *Enterococcus*, a qual foi mais pronunciada sob profilaxia antibiótica e tratamento de infecções neutropênicas, após o transplante. Isso pode ser explicado pela utilização de diversos antibióticos para tratar as várias infecções, permitindo que o espectro de vários patógenos bacterianos se torne superabundante, incluindo os organismos oportunistas, que geralmente se apresentam de baixa virulência, e os benignos, no indivíduo imunocompetente (Jenq et al. 2012; Holler et al. 2014). Esse importante efeito colateral clínico da terapia antineoplásica causa desconforto e dor, podendo ainda limitar a nutrição adequada, levando à interrupção ou modificação na administração da medicação, prolongamento do período de internação hospitalar e, em alguns pacientes, infecções com risco de morte. Além disso, as infecções secundárias podem levar a infecções sistêmicas graves. Todas essas condições podem impossibilitar tratamentos posteriores ou elevar seu custo, colocar em risco a sobrevivência do paciente ou ainda alterar irremediavelmente a sua qualidade de vida (Peterson 2000; Raber-Durlacher et al. 2000; Bensadoun et al. 2001; Epstein et al. 2001).

**Tabela 1** – Estudos que alteração da Microbiota bucal durante e após terapia do câncer

Autor e Ano	Casuística	Tratamento do câncer	Momento da coleta da amostra	Tipo de amostra	Resultados
Belazi et al., 2004	39 pacientes com câncer de cabeça e pescoço	RT	Durante	Swabs (lesão)	Espécies mais prevalentes: <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> and <i>C. Kefy</i>
Napenas et al., 2010	9 pacientes com câncer de mama	CT	Antes / Durante	Swabs da mucosa jugal	O número total de espécies bacterianas aumentou e uma mudança para uma microbiota bucal mais complexa foi encontrada durante CT; Espécies mais prevalentes: <i>Gemella haemolysans</i> e <i>S. Mitis</i> .
Sonalika et al., 2012	61 pacientes com carcinoma escamocelular e 72 controles	RT	Antes/ Depois	Saliva	Aumento significativo em <i>Candida</i> spp. foi promovido por RT; Aumento das espécies <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> , e <i>K. pneumoniae</i> contribuíram para a exacerbação da mucosite.
Panghal et al., 2012	186 pacientes com carcinoma escamocelular	RT ou CT ou quimioRT	Durante	Swabs bucais Sangue	<i>P. aeruginosa</i> foi isolada do sangue de pacientes submetidos a RT e <i>K. pneumonia</i> foi isolada da cavidade bucal de pacientes submetidos a CT; <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> foram encontradas no sangue de pacientes submetidos a CT e quimioRT e na cavidade bucal de pacientes submetidos a RT; <i>Candida albicans</i> foi o patógeno mais significativa da cavidade bucal dos pacientes submetidos a RT e quimioRT.
De Mendonça et al., 2012	71 pacientes com leucemia	CT	Durante	Swabs	A gravidade da MB estava associada com a presença de HSV (HSV-1) e <i>Candida</i> spp.
Laheij et al., 2012	49 pacientes com doenças hematológicas malignas	TCTH	Antes/ Durante	Bochecho bucal	<i>Porphyromonas gingivalis</i> foi considerado um fator preditor da MB  Espécies anaeróbicas, como <i>Parvimonas micra</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Treponema denticola</i> and <i>C. glabrata</i> e <i>C. kefy</i> foram associadas com MB ulcerativas
Hu et al., 2013	8 pacientes com câncer de cabeça e pescoço	RT	Antes/ Durante	Placa dental	Quatro filos (Actinobactéria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteteria) e 11 gêneros ( <i>Streptococcus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Derxia</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Rothia</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Luteococcus</i> , and <i>Gemella</i> ) foram encontrados em todos os indivíduos.

Ames et al., 2012	45 pacientes transplantados	TCTH	Antes/ Depois	Saliva Placa dental Swabs de língua e bucal	Muitos gêneros bacterianos foram encontrados antes e após o transplante: <i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Gemella</i> , <i>Granulicatella</i> e <i>Campylobacter</i> .
Yan der Beek et al., 2012	49 pacientes transplantados	TCTH	Antes/ Depois	Bochecho bucal	Presença de HSV-1 foi considerado um fator preditor significativo em úlceras bucais.
Chavan et al., 2013	11 crianças com doenças hematológicas malignas	TCTH	Depois	Sangue Fluido cerebrospinal Tecido	Infecções por <i>Rothia mucilaginosa</i> foi clinicamente significativas em crianças neutropênicas submetidas a TCTH.

### 2.3.2 Modelos *in vitro* de interações hospedeiro e microbiota

Descobertas recentes em lesões de MB buscaram compreender as interações hospedeiro e microbiota, uma vez que estudos atuais realizados em vias de sinalização mostram que fatores de virulência de microorganismos têm o potencial de contribuir com o desenvolvimento da MB, podendo prolongar a existência de úlceras já estabelecidas, impactando no processo de cicatrização (Bhattacharya et al. 2014; Laheij et al. 2015). Bhattacharya e colaboradores (2014) avaliaram os mecanismos associados aos efeitos de bactérias no processo cicatricial em culturas primárias de queratinócitos gengivais. Resultados desse estudo mostraram que tanto *Porphyromonas gingivalis* e, em menor extensão, *Fusobacterium nucleatum* estavam associadas com um impedimento significativo na reepitelização dos queratinócitos bucais, indicando atraso na adesão e migração celular, dificultando a cicatrização. A espécie *Porphyromonas gingivalis* estava associada com uma redução de 40% na capacidade de fechamento da ferida, o que estava parcialmente relacionada a sua atividade proteolítica. A exposição das células de queratinócitos a *Porphyromonas gingivalis* ocorreu durante o período de 24 horas, no entanto, essa bactéria ainda se mostrou presente nas células infectadas nove dias após a exposição. Adicionalmente, a presença de *Porphyromonas gingivalis* e, em menor grau, de *Fusobacterium nucleatum*, encontrou associada à redução significativa de genes do ciclo celular; a ciclina quinase dependente 1 (CDK1), e CDK4, genes críticos que estão envolvidos na transição G1/S e na fase mitótica do ciclo celular (Bhattacharya et al. 2014). Laheij et al. (2015) também investigaram a influência dos principais fatores de virulência de diferentes

cepas de *Porphyromonas gingivalis* na cicatrização de feridas em modelos *in vitro* de células de carcinoma escamocelular originárias da mucosa bucal. Os fatores de virulência da *Porphyromonas gingivalis* avaliados nesse modelo foram o lipopolissacarídeo (LPS), a proteinase da cisteína gingipaína, o polissacarídeo capsular e as fímbrias, que são conhecidos por desempenharem interação entre a bactéria e as células do hospedeiro e desencadearem eventos intracelulares e resposta imune inata. Nesse estudo, as cepas de *Porphyromonas gingivalis* estavam associadas com a inibição das migrações das células epiteliais, porém as cepas não-encapsuladas apresentaram uma maior inibição do que as cepas encapsuladas, sugerindo que a presença do polissacarídeo capsular diminui a inibição da migração celular epitelial. Os fatores de virulência, fímbria e LPS não apresentaram nenhuma influência na migração celular epitelial nesse estudo. No entanto, a inibição da atividade de gingipaína levou a uma melhora no fechamento da ferida, sugerindo que a atividade de gingipaína pode inibir a migração celular (Laheij et al. 2015). Outro estudo *in vitro* associado à presença de *Porphyromonas gingivalis* e à resposta imune inata foi realizado por Palm e colaboradores (2015). Eles usaram o modelo de periodontite para analisar o papel de receptores *toll-like* (TLRs) e receptores ativados por protease (PARs) na expressão de citocinas por fibroblastos gengivais humanos quando estimulados por *Porphyromonas gingivalis*. Os autores concluíram que: a) os dois receptores, TLRs e PARs, em especial TLR2, têm um importante papel na interação entre fibroblastos gengivais humanos e *Porphyromonas gingivalis*; b) a presença de *Porphyromonas gingivalis* elevou a quimiocina 8 (CXCL8) e IL-6, a qual também foi ativada via PAR1; e c) CXCL8 e IL-6 são importantes mediadores de inflamação, que podem contribuir com a destruição tecidual que acontece após a exacerbação da resposta do hospedeiro (Palm et al. 2015). Estas observações sugerem que o controle na expressão de TLR2 pode atenuar a destruição tecidual através da supressão da liberação de CXCL8 e IL-6.

Recentemente, Sonis e outros (2010) abordaram a possível interação microbiota-hospedeiro e a ativação do sistema imune inato por meio de vias de sinalização moleculares na fase inicial da patogênese da MB (Sonis 2010).

### 2.3.3 Interações moleculares entre microorganismos e hospedeiro na MB

Atualmente, a ativação da resposta do sistema imune inato tem sido considerada um componente-chave na iniciação da cascata biológica da mucosite (vide interações moleculares entre hospedeiro e microrganismos na figura 2). Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) inato, como os receptores *toll-like* (TLRs) e os *nod-like* (NLRs) reconhecem moléculas associadas a patógenos (PAMPs), como flagelina, DNA bacteriano, peptidoglicano e lipopolissacarídeo (LPS), assim como moléculas endógenas liberadas no processo de morte celular (DAMPs e CRAMPs) (Srikrishna and Freeze 2009; Vanhoecke et al. 2015). Os receptores de lectina tipo C-like (CLRs) também funcionam como PRRs e estão envolvidos na modulação da resposta imune inata e na inflamação, ao se ligarem a sítios reconhecidos de carboidratos, como a manose, tipicamente encontrada na superfície de fungos, como a *Candida albicans* (Saijo et al. 2010; Saijo and Iwakura 2011; Zhu et al. 2013). Outro importante PRR que desempenha papel na resposta imune é o receptor de produtos finais de glicosilação avançada (RAGE). Ele é mediado pela proteína de alta mobilidade 1 (HMGB1), uma molécula endógena que pode levar a danos celulares e que tem sido associada a múltiplas inflamações e ao câncer. Células danificadas por quimioterapia e RT podem liberar CRAMPs, a exemplo da HMGB1. Uma vez fora da célula, essa molécula (HMGB1) comporta-se como uma citocina, promovendo respostas inflamatórias (Yang et al. 2002; Srikrishna and Freeze 2009). Anormalidades no processo de reconhecimento de PAMPs, DAMPs e CRAMPs (HMGB1) aos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) podem provocar uma resposta envolvendo a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF- $\kappa$ B e conseqüentemente expressão de mediadores inflamatórios que estimularão a resposta imune-inata e adaptativa (Srikrishna and Freeze 2009; Vanhoecke et al. 2015), contribuindo para o desenvolvimento e/ou gravidade da MB (Sonis 2010). Sonis 2010 afirma que é muito difícil parar ou reverter um dano já instalado na mucosa, e talvez, por esta razão, as estratégias de tratamento da MB realizadas até os dias atuais não obtiveram sucesso, uma vez que o objetivo principal era reparar os danos já existentes. Para ele, intervenção mais efetiva para tratar MB será aquela que irá prevenir a



ativação da fase de iniciação da MB (Sonis 2010).

## 2.4 ABORDAGEM TERAPÊUTICA DA MB RELACIONADA À MICROBIOTA BUCAL

Apesar de a MB ser estudada há muitos anos, até o presente momento, nenhuma estratégia ou abordagem baseada em evidências científicas fornece recomendações consistentes para a sua prevenção, tratamento e controle. O que existem são terapias ou agentes que fornecem pequenas melhorias nas taxas de infecção, inflamação, irritação, ou no alívio da dor (Lalla 2013; Lalla et al. 2014b). No que tange às estratégias antimicrobianas, estudos clínicos concluem que a eliminação seletiva da microbiota bucal para prevenir ou tratar a MB não suporta as hipóteses de que a microbiota bucal é importante na patogênese dessa doença ou que a administração tópica de agentes antimicrobianos possa reduzir a gravidade da MB (Wijers et al. 2001; Stokman et al. 2003; Giles et al. 2004; Elad et al. 2012). Alguns fatores associados ao insucesso desses tratamentos antimicrobianos foram descritos: i) a microbiota oral nesses pacientes com câncer já pode estar reduzida devido o uso de antibióticos profiláticos sistêmicos; ii) falha da droga em alcançar uma comunidade microbiana específica a uma certa profundidade no interior da mucosa ou da submucosa; e iii) incapacidade da droga em reduzir a produção de mediadores inflamatórios em resposta a agentes infecciosos, muito comum na microbiota bucal de pacientes comprometidos, a exemplo, em pacientes neutropênicos (Giles et al. 2004). Alguns estudos recentes, pioneiros nessa área, demonstraram que a melhora na higiene bucal e na saúde periodontal e que uma redução significativa da inflamação gengival, antes da terapia do câncer, pode diminuir a incidência e o tempo da MB (Kashiwazaki et al. 2012; Gurgan et al. 2013).

O uso de probióticos como uma nova abordagem para o tratamento da MB em pacientes submetidos a terapia do câncer tem sido sugerido como um possível tratamento coadjuvante (Thomas and Versalovic 2010; van Vliet et al. 2010; Sharma et al. 2012; Limaye et al. 2013; Andrade et al. 2015; Ciorba et al. 2015). Os probióticos podem ser definidos como bactérias vivas que, quando administrados em números abundantes, são capazes de exercer atividades fisiológicas e gerar terapêuticas benéficas (Touchefeu et al. 2014). Thomas e

Versalovic (2010) demonstraram efeitos benéficos dos probióticos, os quais incluem melhora da função das células epiteliais do intestino, proteção contra o estresse fisiológico, modulação da secreção de citocinas e aumento da secreção de anticorpos (Thomas and Versalovic 2010). A melhora da função imune seria útil para a prevenção da mucosite uma vez que incide sobre os benefícios da manipulação da microbiota, com o objetivo de modular a resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro e restaurar a barreira intestinal após a lesão (Andrade et al. 2015).

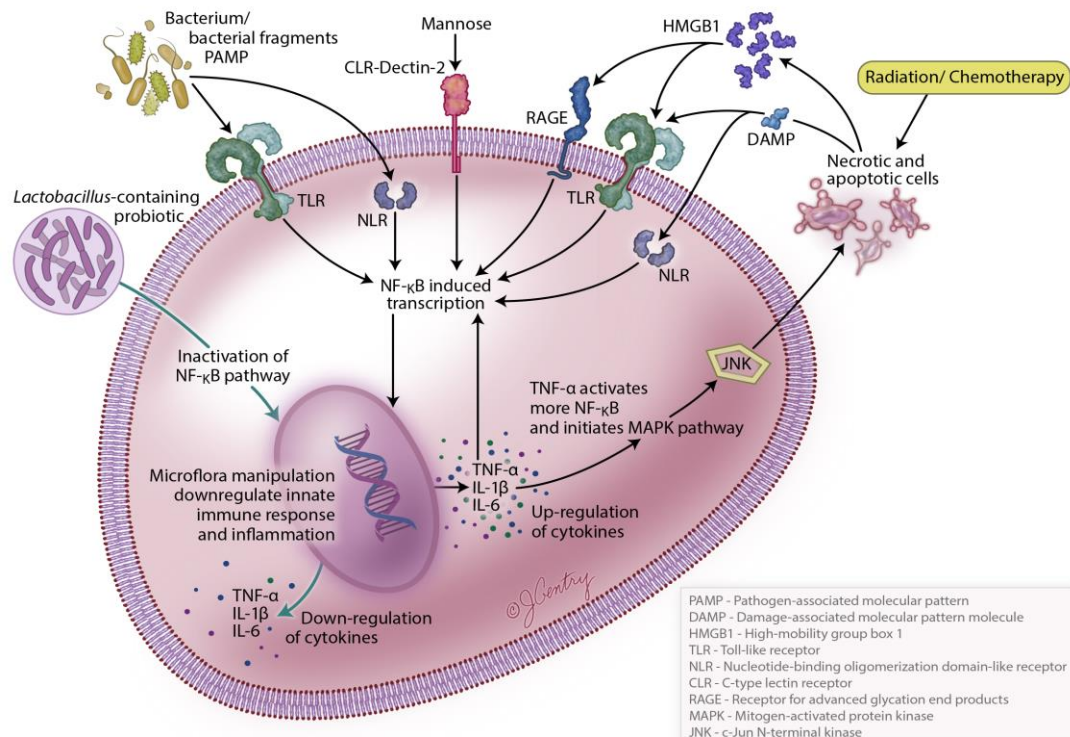
As bactérias probióticas possuem a capacidade de ativar vias de sinalização em células epiteliais envolvidas com a integridade da mucosa e atividade celular imunológica, além de deslocar bactérias patogênicas. A forma de comunicação entre probiótico-hospedeiro ocorre por meio da modulação de vias de sinalização fundamentais, como NFκ-B e MAPK, acreditando-se, portanto, que o uso de probióticos previne a ativação da via NFκ-B e, por consequente reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias (van Vliet et al. 2010) (vide Figura 2).

Uma revisão recente do uso de probióticos em mucosite gastrointestinal associados a terapia citotóxica concluiu que ambos os estudos pré-clínicos e clínicos suportam a ideia de que os probióticos *Lactobacillus* têm o potencial de reduzir a toxicidade gastrointestinal quando administrados profilaticamente e como tratamento adjuvante (Ciorba et al. 2015). Um estudo clínico randomizado recente propôs o uso de pastilhas com *Lactobacillus brevis* CD2 como uma abordagem para o tratamento da mucosite em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a quimioRT. O uso dessas pastilhas com *L. brevis* CD2 reduziu a incidência de MB de grau III e IV e estava associado com uma menor taxa de mucosite (Sharma et al. 2012).

O uso de um enxaguatório bucal (AG013) contendo *Lactococcus lactis* recombinante foi avaliado em um estudo fase 1b, em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à quimioterapia. O *Lactococcus lactis* foi manipulado geneticamente para segregar o fator de proteção da mucosa, trefoil 1, que faz parte de uma família de peptídeos que desempenham papéis importantes na proteção e reparação de superfícies epiteliais, incluindo o trato gastrointestinal. O uso de AG013 resultou em uma redução de 35% no número de dias em que os indivíduos apresentaram mucosite bucal ulcerativa, quando

comparado com o grupo placebo (Limaye et al. 2013). Apesar da existência de evidências que suportam a ideia de que probióticos podem ser utilizados como tratamentos profiláticos direcionados para inibir o desenvolvimento da MB ou como tratamento para facilitar o processo de cicatrização, ainda não existe nenhuma cepa ou algum produto probiótico aprovado por meio de estudos clínicos em humanos para o uso em mucosite.

**Figura 2** – Descrição ilustrativa das vias moleculares envolvidas na interação entre microbiota-hospedeiro e desenvolvimento da MB



Fonte: Vasconcelos et al., 2016.

Na Figura 2, é possível verificar as vias moleculares envolvidas na interação microbiota-hospedeiro e desenvolvimento de MB. A detecção de componentes microbianos (PAMPs) e moléculas padrões endógenas associados a danos moleculares [DAMPs e CRAMP (HMGB1)] por PRRs (tais como TLRs, NLRs, CLR e RAGE) desencadeia uma cascata de sinais celulares, resultando em ativação de vias de sinalização, como NFκ-B e MAPK, que contribuem na amplificação de citocinas pró-inflamatória e na apoptose. O uso de bactérias probióticas tem a capacidade de ativar vias que estão envolvidas na redução de citocinas pró-inflamatórias e na apoptose, por meio da inativação da via do NFκ-B.

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho visa a alcançar os seguintes objetivos, tanto geral quanto específicos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o perfil de microorganismos e de citocinas que possam atuar como biomarcadores do diagnóstico inicial da MB em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever a caracterização dos participantes quanto a idade, tipo de câncer e tratamento anti-neoplásico;
2. Comparar indicadores clínicos de intervenção (taxa de fluxo salivar e pH) antes e após o desenvolvimento inicial da MB;
3. Correlacionar o crescimento de *Candida* com o início do desenvolvimento da MB;
4. Analisar o padrão microbiológico bucal associadas com o início do desenvolvimento da MB em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a RT ou quimioRT;
5. Medir os níveis salivares de citocinas antes e após o desenvolvimento inicial da MB.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO**

Foram selecionados para o presente estudo indivíduos portadores de câncer de cabeça e pescoço submetidos ao tratamento de radioterapia ou quimiorradioterapia no serviço de oncologia do centro médico da Universidade de Nova York, Langone Medical Center (NYULMC) e do centro oncológico Laura and Isaac Perlmutter, na cidade de Nova York, Estados Unidos. Os indivíduos foram recrutados por investigadores diretamente envolvidos com o tratamento do câncer. Um total de 17 indivíduos foi selecionado, envolvendo homens e mulheres de qualquer raça ou etnia, com idade igual ou superior a 18 anos. Todos os pacientes interessados em entender mais sobre o estudo foram instruídos a entrar em contato com o coordenador do estudo, responsável em rever o termo de consentimento e obter a assinatura do indivíduo. No momento do recrutamento e após a assinatura do termo de consentimento, foi assegurado que os indivíduos compreenderam totalmente as atividades do estudo e que seriam capazes de comparecer às consultas programadas. Os investigadores desse estudo trabalharam em estreita colaboração com os oncologistas e enfermeiros responsáveis pelo monitoramento dos pacientes desde o recrutamento até o momento de aparecimento das primeiras lesões de mucosite bucal.

### **4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Todo o protocolo de pesquisa deste estudo foi elaborado considerando a Declaração de Helsinque. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do *Institutional Review Board* da Universidade de Medicina de Nova York, com o parecer S14-00082 (vide Apêndice B).

#### 4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os seguintes critérios foram considerados na seleção dos indivíduos a serem estudados:

1. Indivíduos do sexo masculino ou feminino com idade igual ou superior a 18 anos;
2. Obtenção do termo de consentimento antes da triagem, coleta de dados ou início dos procedimentos do estudo;
3. Indivíduos com câncer de cabeça e pescoço (laudo patológico de carcinoma escamocelular) agendados para realizar tratamento de radioterapia ou quimioradioterapia.

#### 4.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Os seguintes critérios foram fundamentais para a exclusão dos pacientes:

1. Paciente grávida ou amamentando;
2. Paciente que estivesse participando de outro estudo de pesquisa biomédica/saúde bucal que possa interferir na participação deste estudo;
3. Paciente privado de liberdade, sob supervisão ou tutela;
4. Paciente impossibilitado de comparecer às consultas por razões geográficas, sociais ou mentais;
5. Paciente imuno-comprometido ou com outras condições médicas graves, com exceção do diagnóstico de câncer (como, por exemplo, neutropenia e doenças periodontais graves).

#### 4.5 MODELO DE ESTUDO

O presente estudo é de caráter prospectivo-observacional. Dezesete indivíduos foram inscritos no estudo antes do iniciar o tratamento com radioterapia ou quimioRT.

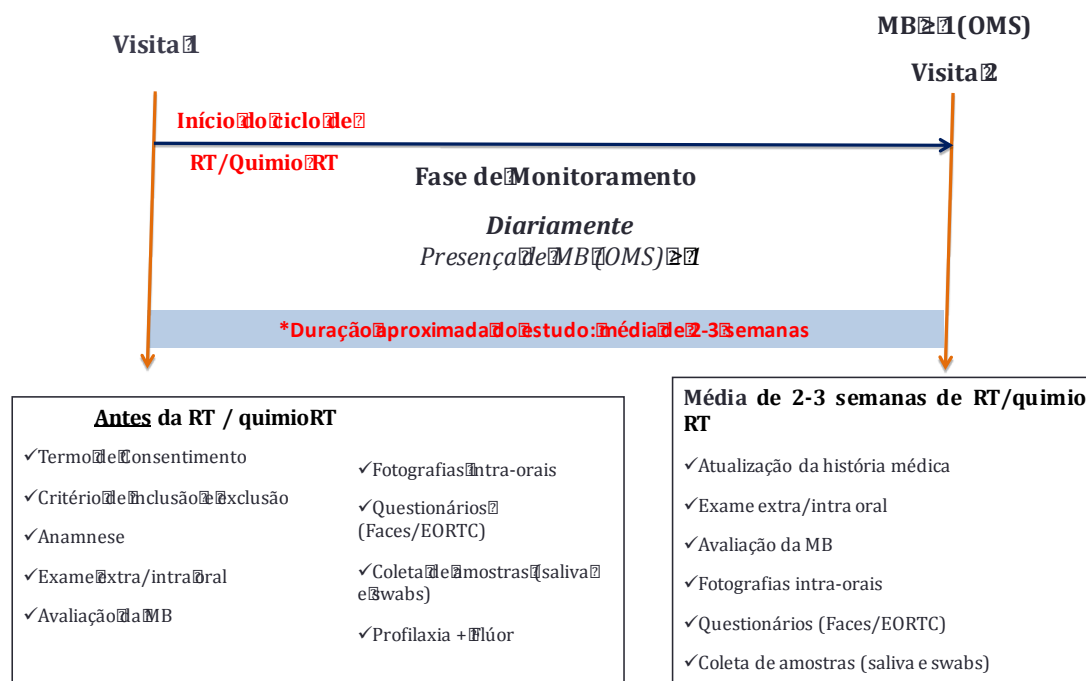
Todos os indivíduos inscritos receberam tratamento padrão de profilaxia dental e aplicação de verniz de flúor antes do início da RT ou quimioRT, no intuito de garantir saúde bucal comparável entre os indivíduos do estudo. Essa profilaxia foi realizada no mesmo dia da visita inicial (Visita 1), no Centro de Pesquisa Clínica, Bluestone, na Escola de Odontologia, da Universidade de

Nova Iorque. Todos os indivíduos foram acompanhados diariamente durante o curso de seu tratamento (RT ou quimioRT) para a avaliação da MB. Após a manifestação das primeiras lesões, os indivíduos foram avaliados clinicamente quanto à gravidade da MB. Indivíduos que apresentaram grau de MB maior ou igual a "1," de acordo com a OMS, foram imediatamente encaminhados para a segunda visita do estudo (Visita 2), que ocorreu em aproximadamente duas semanas após o início do tratamento da RT (Quinn et al. 2007). Cada indivíduo completou um total de duas visitas de estudo (Figura 3).

Durante as visitas, os seguintes indicadores clínicos de intervenção foram determinados: a) recuperação de registros médicos, considerando o histórico de infecções sistêmicas graves, padrões nutricionais e perda de peso b) dor relacionada a MB, por meio da escala de dor *Wong-Baker FACES* (Apêndice C) (Garra et al. 2010) c) mudanças no estado funcional e psicossocial, por meio do questionário de Qualidade de Vida da Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer – EORTC QLQ-C30 (Apêndice D) e o questionário específico para Cabeça e Pescoço – EORTC QLQ-H&N35 (Apêndice E) (Emery et al. 2005). Diferenças nas ocorrências foram comparadas entre as visitas.

Amostras biológicas (*swabs* bucais e saliva) também foram coletadas, em ambas as visitas. Os *swabs* bucais foram utilizados para a análise da microbiota oral, e a saliva foi coletada para medição das taxas de fluxo salivar, pH e ensaios imunológicos.

**Figura 3 – Modelo de estudo**



#### 4.5.1 Visita 1

Essa visita ocorreu antes do início do tratamento da RT/quimioRT. No momento da inscrição e após a aplicação do termo de consentimento (Apêndice F), os seguintes procedimentos foram realizados:

- Informações demográficas obtidas por idade, gênero, raça e etnia;
- Revisão dos critérios de inclusão/exclusão, história médica, revisão dos prontuários médicos, medicações concomitantes;
- Exame físico direcionado (extra-oral, cabeça e pescoço), avaliação da cavidade oral e das medidas dos sinais vitais (pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura, peso e altura);
- Avaliação da MB, utilizando a escala da OMS;
- Preenchimento da escala FACES pelos indivíduos;
- Preenchimento dos questionários EORTC QLQ-C30 v3 e EORTC QLQ-H & N35 pelos indivíduos;
- Fotografias intra-orais;
- Coleta de biofilme oral na mucosa bucal utilizando *swab* (Isohelix) macio para avaliação microbiológica;



- Coleta de amostras salivares (máximo de 15 minutos, estimuladas) para medir a taxa de secreção salivar, pH e ensaios imunológicos;
- Profilaxia dental (procedimento de cuidado padrão);
- Aplicação de flúor (verniz) em todas as superfícies dentárias;

#### 4.5.2 Fase de Monitoramento

Visitas de acompanhamento para avaliação da MB: todos os indivíduos foram acompanhados diariamente após o início do tratamento de RT ou quimioRT para avaliação da MB. Durante essas consultas, os seguintes procedimentos foram realizados:

- Atualização da história médica;
- Avaliação da MB por meio da escala da OMS;
- Realização de fotografias intra-orais (se necessárias), para documentar a classificação da MB.

#### 4.5.3 Visita 2: início da MB (MB $\geq$ 1 – OMS)

Os seguintes procedimentos foram realizados durante a visita 2:

- Atualização da história médica;
- Exame físico direcionado (extra-oral, cabeça e pescoço), avaliação da cavidade oral e medidas dos sinais vitais (pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura, peso e altura);
- Avaliação da MB, por meio da escala da OMS;
- Revisão de prontuários médicos, incluindo presença de infecções bucais/sistêmicas, nutrição, adesão ao tratamento do câncer e história de hospitalização;
- Preenchimento da escala FACES pelos indivíduos;
- Preenchimento dos questionários EORTC QLQ-C30 v3 e EORTC QLQ-H&N35 pelos indivíduos;
- Coleta de biofilme oral na mucosa bucal utilizando *swab* (Isohelix) macio para avaliação microbiológica;
- Coleta de amostras salivares (máximo de 15 minutos, estimuladas) para medir a taxa de secreção salivar, pH e ensaios imunológicos;
- Fotografias intra-orais.

#### 4.5.4 Acompanhamento Clínico

Registros médicos dos indivíduos foram revisados ao longo do estudo (quando necessário), a fim de capturar a história do tratamento e outras complicações médicas. Foram coletadas as seguintes variáveis:

- Estágio do câncer desenvolvido pelo Comitê Americano de Câncer (AJCC TNM);
- Dose total de radiação;
- Dose da radiação por fração (2 Gy ou 1.8 Gy);
- Técnica de radiação (IMRT ou 3d-CRT);
- Agente e dose de quimioterapia;
- Infecções sistêmicas sérias;
- Padrões nutricionais e perda de peso;
- Plano de tratamento do câncer e hospitalização durante as consultas de acompanhamento.

#### 4.6 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

##### 4.6.1 Coleta e Manuseio de amostras biológicas

###### 4.6.1.1 Saliva

Níveis de citocinas pró-inflamatórias salivares e análise microbiológica (técnica de cultura) foram comparadas entre visitas. Além disso, foi calculada a taxa do fluxo salivar por indivíduo baseado no volume de saliva coletado. O pH salivar também foi medido usando o pHmetro (*accumet®*, *Fisher Scientific*). Cada indivíduo expectorou amostras de saliva estimulada em um cilindro graduado estéril de 50 mL (por até 15 minutos). Após medir o pH salivar, as amostras salivares foram colocadas em gelo e transferidas para o laboratório do centro de estudo clínico para processamento.

Nos casos de baixa produção salivar ou recusa do paciente em fornecer amostras de saliva, coletou-se 5mL de solução salina em substituição. Cada indivíduo bochechou 5mL de solução salina (soro fisiológico a 0.09%) durante um período de 30 segundos. Em seguida, a amostra foi expelida em um cilindro graduado estéril de 50mL. As medidas de pH e de fluxo salivar não foram

registradas nessas situações, uma vez que a solução salina interfere na análise dessas medidas, podendo gerar alterações nos resultados.

#### 4.6.1.2 *Swabs*

A distribuição e abundância de espécies microbianas na cavidade bucal foi comparada entre visitas. As amostras foram coletadas usando *swabs* Isohelix, em quatro localizações (os lados direito e esquerdo da mucosa jugal e os lados direito e esquerdo da borda lateral de língua). Após coleta, as amostras foram mantidas em uma caixa de gelo térmica e entregues ao laboratório do centro de estudo clínico para processamento.

#### 4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A colonização total de bactérias e *Candida* nos indivíduos deste estudo foi comparada entre a Visita 1 e Visita 2. A avaliação dos níveis totais de bactérias cultiváveis, e espécies de *Candida* na saliva foram determinadas por métodos convencionais de cultura e microscopia. Alíquotas de 200ul de cada amostra foram diluídas em 1/10, 1/100 e 1/1000 e plaqueadas utilizando o Autoplate™4000 (espiral Biotech, Bethesda, MD) em dois tipos de placas de semeadura: a) meio enriquecido Tryptic Soy Agar (ETSA, Sistema anaeróbios) para o cultivo total de bactérias, b) meio enriquecido em Chromagar, para o cultivo das espécies de *Candida*. 100ul da amostra original foram utilizados para o cultivo de *Candida* com o intuito de produzir uma densidade ótima para as unidades formadoras de colônias (UFC). Após o plaqueamento, as amostras em meio ETSA foram incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 85% de N<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 10% de H<sub>2</sub> em uma câmara de anaerobiose durante três dias. As amostras em placas de Chromagar foram incubadas a 37°C em condição aeróbia durante três dias. As contagens totais de UFC em cada placa foram enumeradas, lidas microscopicamente e registradas para uma estimativa do nível microbiano por mL de saliva. Todos os níveis de contagens microbianas foram transferidos para valores de log<sub>10</sub> para análise estatística. Os resultados foram analisados e comparados, entre visitas, por indivíduo.

Amostras de biofilme dentário coletadas nas visitas 1 e 2 foram analisados através da metodologia de “Human Oral Microbe Identification Next Generation Sequencing (HOMINGS)”. Esta metodologia permite analisar espécies com um nível de determinação de mais de 600 táxons bucais do banco de dados da “Next Generation Sequencing” (NGS). Para análises de quantificação microbiológica (abundância), HOMINGS foi usado para determinar as proporções de espécie microbiana bucais associadas com MB.

Para a realização da técnica, isolou-se o DNA a partir de amostras de placas microbianas de MB. rDNA 16S foi amplificada utilizando primers universais 341F/806R (região V3-V4) e sequenciados em uma plataforma MiSeq (Illumina). Para cada amostra, uma média de 30.000 sequências de cerca de 441pb por sequência foi obtida. Espécies específicas de sondas oligonucleotídicas de rRNA 16S foram utilizadas para a identificação da frequência de bactérias orais em um total de aproximadamente 700 espécies microbiológicas.

#### 4.8 ANÁLISE IMUNOLÓGICA

A proposta da análise imunológica é determinar o papel das citocinas pró-inflamatórias salivares na suscetibilidade a MB.

Acerca da metodologia, as citocinas foram avaliadas usando a tecnologia MesoScale Discovery (MSD – analisador de imagem SI2400, MesoScale Discovery). O sistema de detecção de eletroquimioluminescência MSD fornece uma combinação de alta sensibilidade, utilizando anticorpo secundário com sulfato, que é estável, não radioativo e emite luz quando estimulado eletroquimicamente. O ruído inerente é especialmente baixo devido à estimulação eletroquímica, isolada a partir do sinal de luz emitida a 620nm. Foram utilizadas placas de 96 poços pré-revestidos com anticorpos para dez citocinas pró-inflamatórias (IL-10, IL-8, IL12p70, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-13, IL-6, IFN- $\gamma$ ).

Após lavar as placas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 0,05% de Tween, foram adicionados 50ul das amostras e do controle aos poços adequados. As placas foram, então, seladas e incubadas durante duas horas com agitação à temperatura ambiente. Após duas horas, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBS e 0,05% de Tween 20 e incubadas com 25ul do detector de anticorpo durante duas horas. Imediatamente após a incubação e as lavagens, foram adicionados 150ul de tampão MSD para a leitura e a análise das imagens no aparelho SI2400. A reação foi quantificada por meio de geração de curva calibradora (mínimo de duas replicatas por nível de calibrador), e o resultado foi expresso em pg/mL.

## 5 RESULTADOS

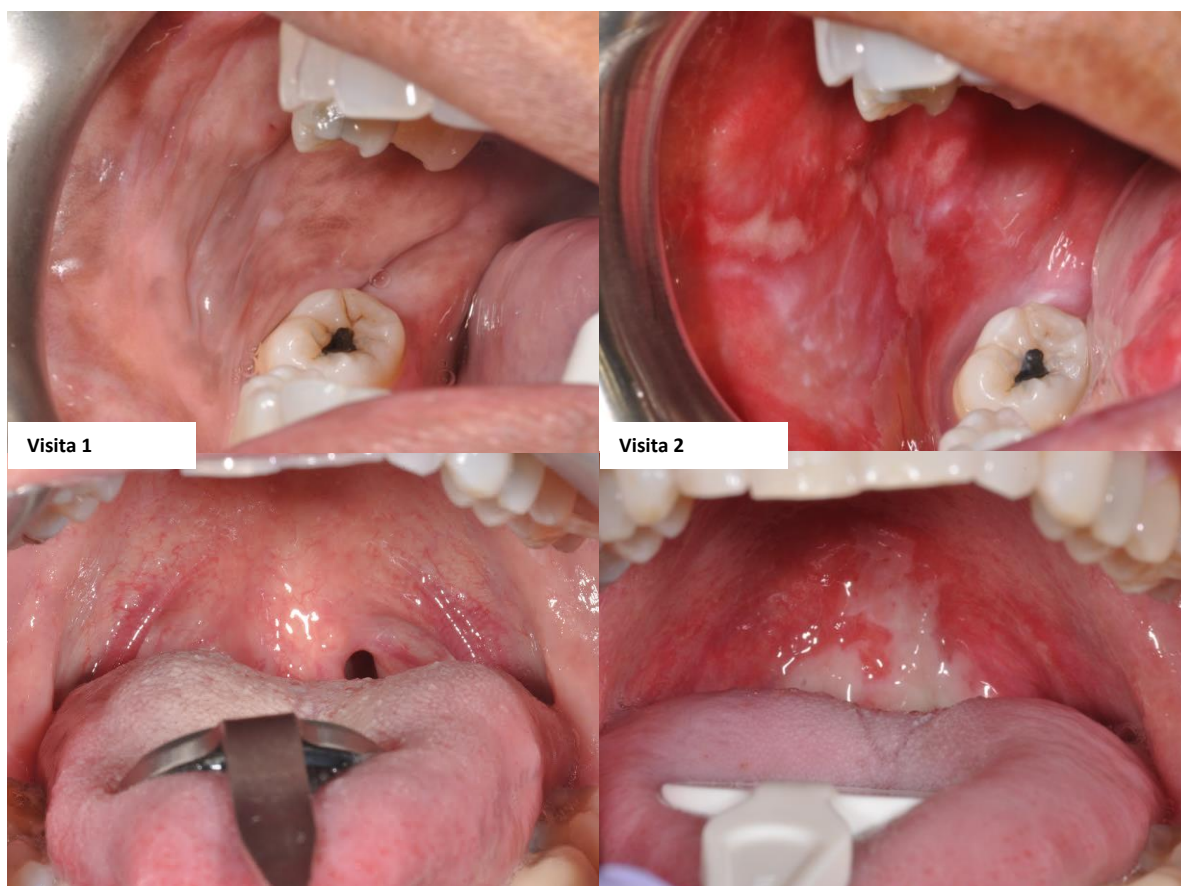
### 5.1 CASUÍSTICA

Dezessete indivíduos com câncer de cabeça e pescoço, em tratamento com radioterapia ou quimioRT no serviço de oncologia, do centro médico da Universidade de Nova York, Langone Medical Center (NYULMC) e do centro oncológico Laura and Isaac Perlmutter, da cidade de Nova York foram inscritos no estudo. Dois desses pacientes foram excluídos devido à condição de saúde imunocomprometida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), evitando, dessa forma, viés aos resultados. Todos os indivíduos (100%) que completaram o estudo (n=15) desenvolveram mucosite bucal em algum momento do tratamento (Figuras 4 e 5).

**Figura 4** – Câncer da cavidade bucal. Presença de lesões de grau II (OMS) na fase inicial de desenvolvimento da MB, a presença de úlceras e placas pseudomembranosas.



**Figura 5** – Câncer de orofaringe. Presença de lesões de grau II (OMS) na fase inicial de desenvolvimento da MB, a presença de úlceras e placas pseudomembranosas.



Na amostra final (n=15), as análises dos dados demográficos revelaram que a idade mínima obtida no momento da inscrição no estudo foi de 30 anos e a máxima de 79 (média de 56,7 anos), e que, em um total de quinze indivíduos, 33,3% (n=5) eram sexo feminino e 66,7% (n=10) do sexo masculino. Quatro indivíduos (26,7%) foram diagnosticados com câncer na cavidade bucal e onze (73,3%) com câncer em outras regiões de cabeça e pescoço. Dentre esses, nove indivíduos foram acometidos pelo câncer de orofaringe, um pelo câncer de nasofaringe e um teve o diagnóstico de câncer primário desconhecido. Este foi incluído no estudo, pois o sítio primário de irradiação do paciente encontrava-se na região de cabeça e pescoço (região bilateral de pescoço). Oito indivíduos foram tratados com radioterapia apenas, e seis com quimioRT, concomitantemente. Todos os indivíduos submetidos à quimioRT receberam Cisplatina como medicação quimioterápica de escolha. Seis indivíduos passaram por cirurgia prévia ao tratamento da RT, e nove não foram

submetidos a nenhum tipo de tratamento cirúrgico (vide Tabela 2). A dose máxima de RT recebida variou entre 5000 a 7000cgy (média de 6586,7cGy).

É importante observar que, entre os indivíduos diagnosticados com câncer da cavidade bucal, todos foram tratados cirurgicamente antes de serem submetidos à RT, e nenhum deles recebeu tratamento quimioterápico. Já entre os indivíduos com outros tipos de câncer da região de cabeça e pescoço (orofaringe, nasofaringe e desconhecido), 72,7% (n=8) foram tratados com quimioRT e 27,3% (n=3) com radioterapia, apenas. Cinco (45,5%) desses indivíduos com câncer em outras regiões de cabeça e pescoço foram submetidos a cirurgia prévia e 6 (54,5%) não precisaram de tratamento cirúrgico (Tabela 3).

**Tabela 2** – Distribuição dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço segundo variáveis sociodemográficas e terapia de escolha

<b>Variáveis</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>		
Feminino	5	(33,3%)
Masculino	10	(66,7%)
<b>Localização</b>		
Cavidade Bucal	4	(26,7%%)
Outros	11	(73,3%%)
<i>Orofaringe</i>	9	(82%)
<i>Nasofaringe</i>	1	(9%%)
<i>Desconhecido*</i>	1	(9%%)
<b>Tratamento do Câncer</b>		
Radioterapia	8	(53,3%)
Radio/quimioterapia	7	(46,7%)
<i>Cisplatin</i>	7	(100%)
Cirurgia		
Sim	6	(40%)
Não	9	(60%)

\*O indivíduo com o diagnóstico de câncer primário desconhecido foi incluído no estudo pois o sítio primário de irradiação encontrava-se na região de cabeça e pescoço (região bilateral de pescoço).



**Tabela 3** – Características do tratamento do câncer em pacientes com câncer da cavidade bucal e outros tipos de câncer de cabeça e pescoço

	<b>Cavidade Bucal (26,7%)</b>	<b>Outros (73,3%) (Orofaringe, Nasofaringe, Desconhecido)</b>
<b>Tratamento do Câncer</b>		
Radioterapia	4 (100%)	3 (27,3%)
Radio/quimioterapia	0 (0%)	8 (72,7%)
<i>Cisplatin</i>	0 (0%)	11 (100%)
Cirurgia		
Sim	4 (100%)	5 (45,5%)
Não	0 (0%)	6 (54,5%)

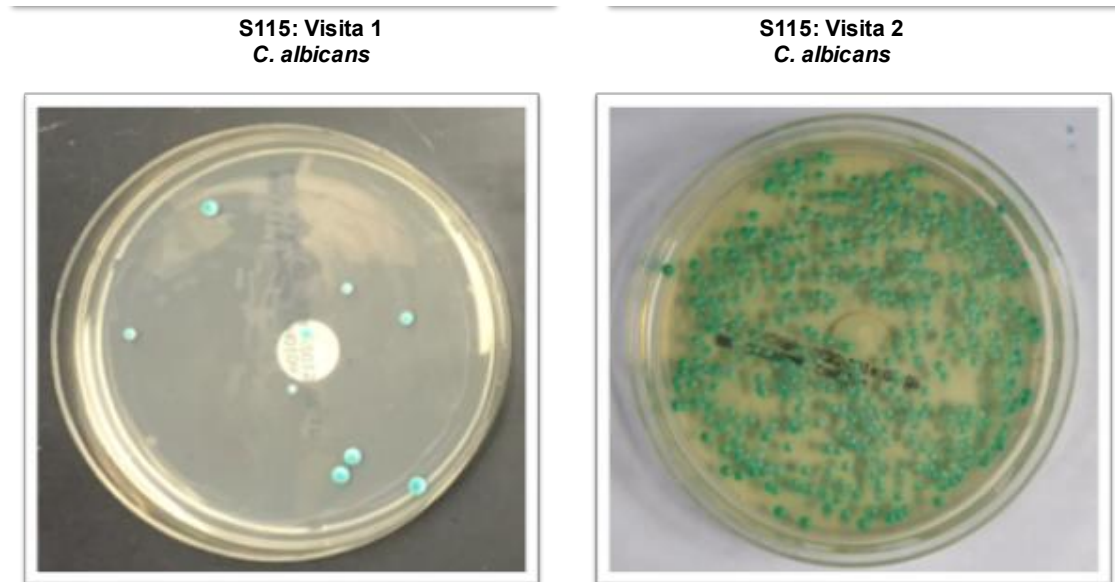
## 5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: TÉCNICA DE SEMEADURA

Ao analisar as unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias cultiváveis e *Candidas* e entre Visita 1 e Visita 2, não se observaram diferenças estatisticamente significantes (Tabela 4). No entanto, é importante ressaltar que, quando houve o aumento no número de UFC de *Candida* entre a Visita 1 e a Visita a 2, a *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente (Figura 6). Apesar de não termos encontrado resultados quantitativos significativos, foi observada, em alguns indivíduos, a mudança na espécie de *Candida*, a qual se apresentava na Visita 1 como *Candida albicans* e, na Visita 2, como *Candida krusei* (Figura 7).

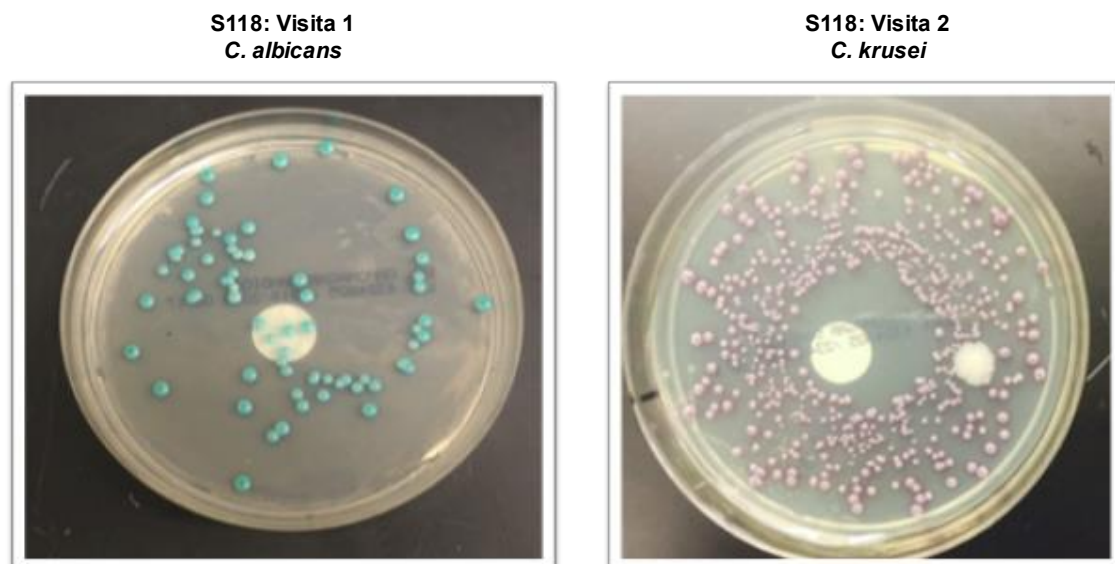
**Tabela 4** – Análise de UFC de bactérias cultiváveis e *Candidas* entre Visita 1 e Visita 2.

	<b>UFC de bactérias cultiváveis e <i>Candida</i> (base log) Media (desvio padrão)</b>		<b>Valor de p</b>
	<b>Visita 1</b>	<b>Visita 2</b>	
<b>Bactérias cultiváveis</b>	7,939 (0,6379)	7,995 (0,5476)	0,804
<b><i>Candida</i></b>	1,371 (2,0244)	2,312 (2,2548)	0,239

**Figura 6** – Ilustração mostrando aumento no número de UFC de *Candida albicans* na Visita 2 de um paciente que, inicialmente, apresentou pouca quantidade dessa mesma espécie de *Candida* na Visita 1.



**Figura 7** – Ilustração mostrando a mudança no tipo da espécie de *Candida* entre as visitas do estudo. Observa-se que na Visita 1, o paciente apresentou *Candida albicans* e, na Visita 2, *Candida* do tipo *krusei*.



Ao associar variáveis específicas ao início do desenvolvimento da Mucosite Bucal em um modelo de regressão múltipla, observou-se que os indivíduos que apresentaram um aumento significativo de *Candida* entre Visita 1 e Visita 2 desenvolveram a MB mais rapidamente (entre a primeira e segunda semana do tratamento) ( $p= 0.05$ ). Nesse modelo, também foi observado que os indivíduos mais jovens tiveram uma predisposição para o desenvolvimento mais cedo da MB ( $p= 0.04$ ); também se notou uma tendência dos indivíduos em terem uma maior dificuldade em deglutir, quando a MB se desenvolveu nas primeiras semanas do tratamento do câncer, no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0.066$ ) (Tabela 5). O aumento de *Candida* também foi correlacionado negativamente com a taxa de fluxo salivar ( $p=0.043$ ) e com o pH da saliva ( $p=0.001$ ) (Gráficos 1 e 2).

**Tabela 5** – Análise de regressão múltipla do início do desenvolvimento da MB segundo variáveis específicas

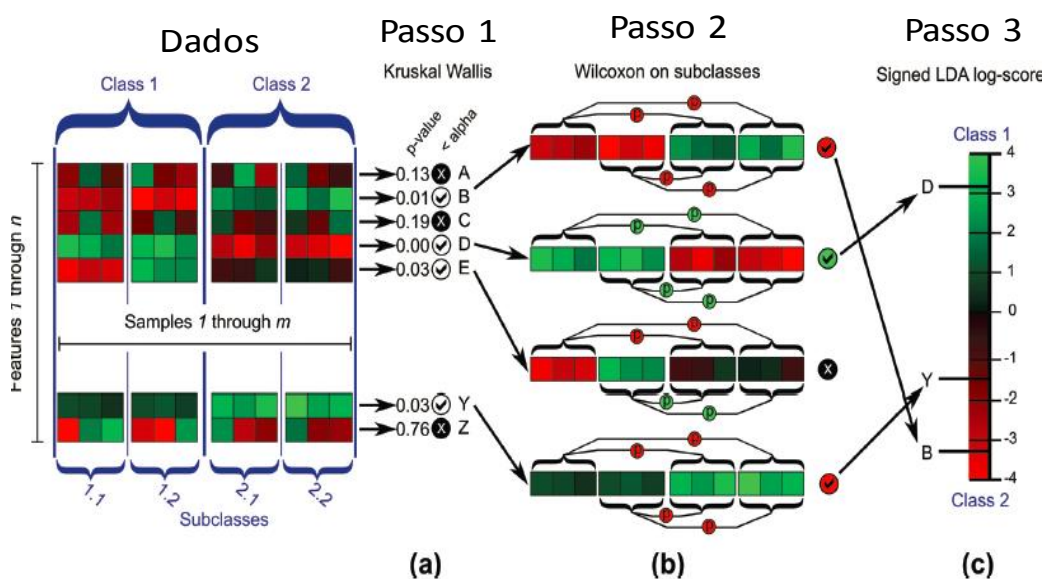
<b>Variáveis</b>	<b>Início do desenvolvimento da MB</b>	<b>Correlação (t)</b>
	<b>Valor de p</b>	
<i>Log_ Candida</i>	.050*	-2.227
<i>Idade</i>	.040*	2.355
<i>Tipo de Câncer</i>	.098	1.825
<i>Tipo de Terapia do Câncer</i>	.627	.502
<i>Medicação anti-fungos</i>	.369	-.940
<i>HPV</i>	.697	.401
<i>Perda de Peso %</i>	.162	-1.510
<i>pH</i>	.960	-.052
<i>Fluxo salivar</i>	.135	-1.625
<i>Escala OMS</i>	.255	1.207
<i>Escala EORTC QLQ H&amp;N35 (Dor)</i>	.731	-.353
<i>Escala EORTC QLQ H&amp;N35 (Deglutição)</i>	.066	-2.068
<i>Escala EORTC QLQ H&amp;N35 (Xerostomia)</i>	.558	-.606
<i>Escala EORTC QLQ H&amp;N35 (Saliva espessa)</i>	.434	.816
<i>Escala EORTC QLQ H&amp;N35 (sentindo-se mal)</i>	.290	1.118
<i>Escala EORTC QLQ-C30 (Necessidade de suplementar com Vitaminas)</i>	.716	.374



### 5.3 ANÁLISE METAGENÔMICA: BIOMARCADORES PREDITIVOS-MICROBIOLÓGICOS

Para a identificação de biomarcadores preditivos de microorganismos específicos e/ou sua abundância antes e após o desenvolvimento inicial da MB, foi utilizada uma análise metagenômica por meio do método *linear discriminant analysis effect size* (LEfSe). Essa metodologia tem sido suportada por investigadores para detectar biomarcadores que possam explicar diferenças nos fenótipos de interesse entre duas ou mais classes (Figura 8) (Segata et al. 2011). A cor verde corresponde à Visita 1 (antes do início da RT e do desenvolvimento da MB) e a cor vermelha corresponde à Visita 2 (momento inicial de desenvolvimento da MB). A expressão do grupo das espécies bacterianas representadas por barras da cor verde é a indicação de que essas espécies se encontram altamente abundantes na Visita 1 e pouco abundantes na Visita 2. As barras de cor vermelha, em contrapartida, representam superabundância bacterianas na Visita 2 e pouca abundância na Visita 1.

**Figura 8** – Representação esquemática dos passos estatísticos e computacionais implementados em LEfSe. (a) Passo 1: utiliza o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar características com diferenças significativas de abundância em relação às classes de interesse ( $\alpha = 0.05$ ). (b) Passo 2: a consistência biológica é subsequentemente investigada usando o teste de Wilcoxon entre subclasses ( $\alpha = 0.05$ ). (c) Passo 3: a análise discriminante linear (LDA) é realizada para criar um ranque entre as classes de interesse (LDA > 2).



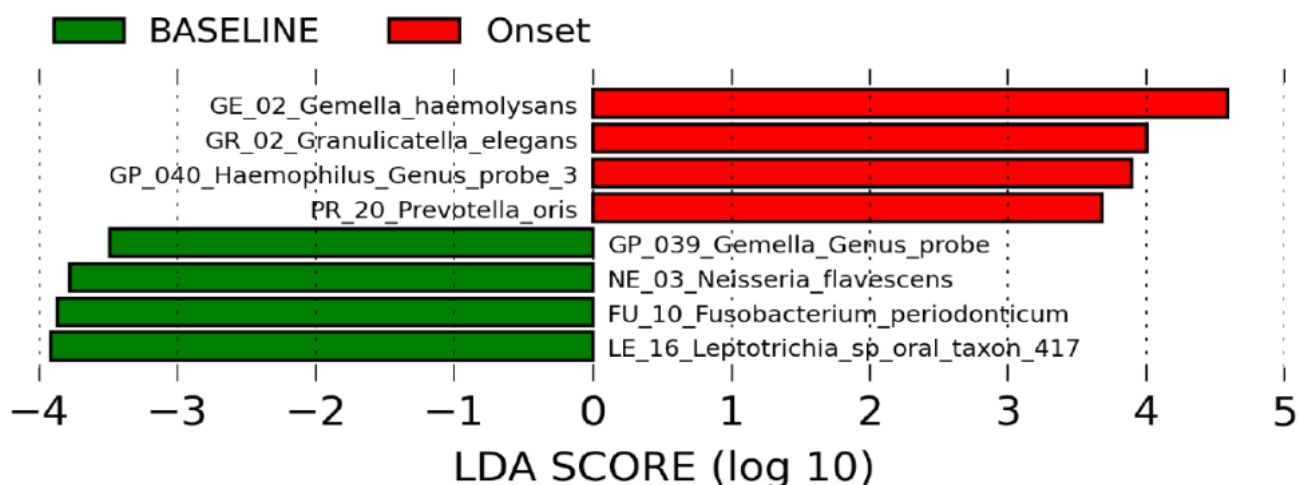
Fonte: Segata et al. 2011

Para a análise metagenômica deste estudo foi utilizado um filtro onde a unidade taxonômica operacional (OTU) de bactéria apresentava-se com 1% de abundância em, pelo menos, 5% das amostras analisadas.

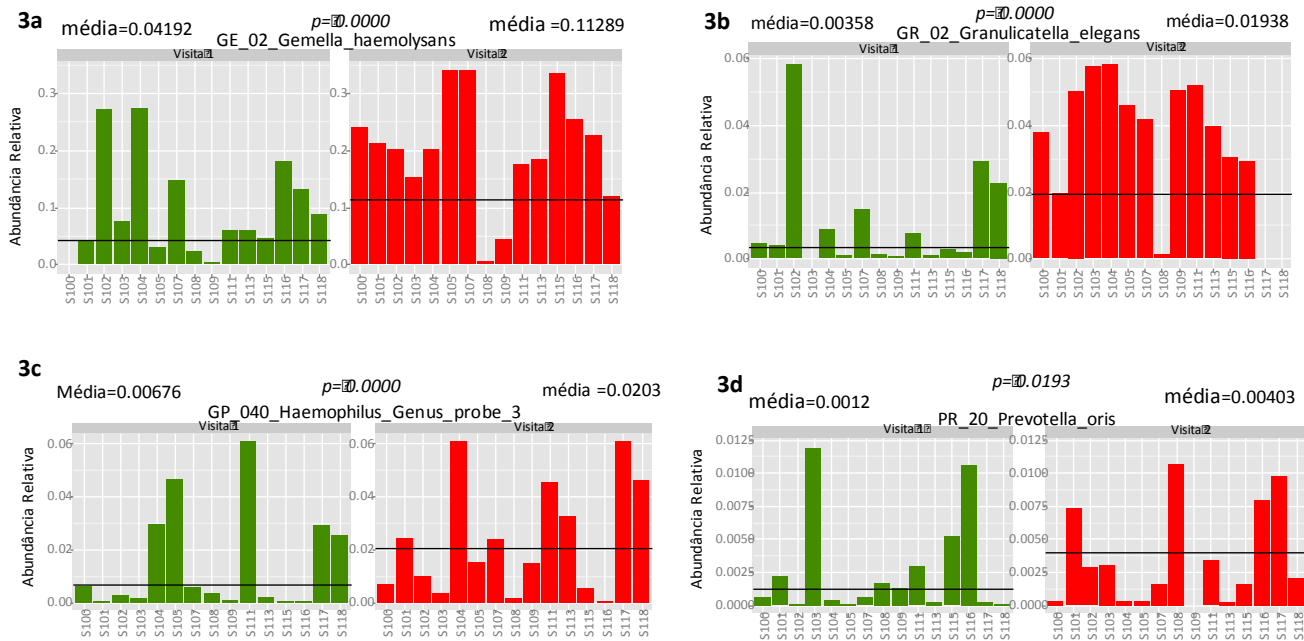
### 5.3.1 Comparação entre Visita 1 e Visita 2 (entre todas as amostras)

Ao comparar a Visita 1 e a Visita 2, observaram-se mudanças nos níveis de expressão das espécies bacterianas. Entre as 768 bactérias analisadas por HOMINGS, oito foram consideradas estatisticamente significativas entre as duas classes analisadas, sugerindo que quatro dessas espécies (*Gemella haemolysans*, *Granulicatella elegans*, *Haemophilus genus probe 3* e *Prevotella oris*) podem ser consideradas biomarcadores preditivos da MB (Figura 9 e Gráfico 3 a-d). Vale ressaltar que bactérias propícias a serem encontradas no biofilme dentário estiveram presentes em superabundância na Visita 1 deste estudo (*Leptotrichia sp.*, *Fusobacterium periodonticum*, *Neisseria flavescens*). A *Gemella Genus probe* também foi encontrada em abundancia durante a Visita 1. Este gênero é representado pelas espécies *asaccharolytica*, *bergeri*, *cuniculi*, *haemolysans*, *morbilloorum*, *palaticanis*, *sanguinis*, o que nos leva a concluir que *Gemella spp.* é um forte biomarcador microbiológico preditivo da MB (Figura 9).

**Figura 9** – Análise de padrões de abundância microbiológica durante as duas visitas do estudo: Quatro espécies (*Gemella haemolysans*, *Granulicatella elegans*, *Haemophilus genus probe* e *Prevotella oris*) podem ser consideradas biomarcadores preditivos da MB ( $p < 0.05$ ;  $LDA > 2$ ).



**Gráfico 3** (a-d) – Espécies bacterianas consideradas como biomarcadores preditivos da MB 3(a) *Gemella haemolysans*; 3(b) *Granulicatella elegans*; 3(c) *Haemophilus spp.*; 3(d) *Prevotella oris*

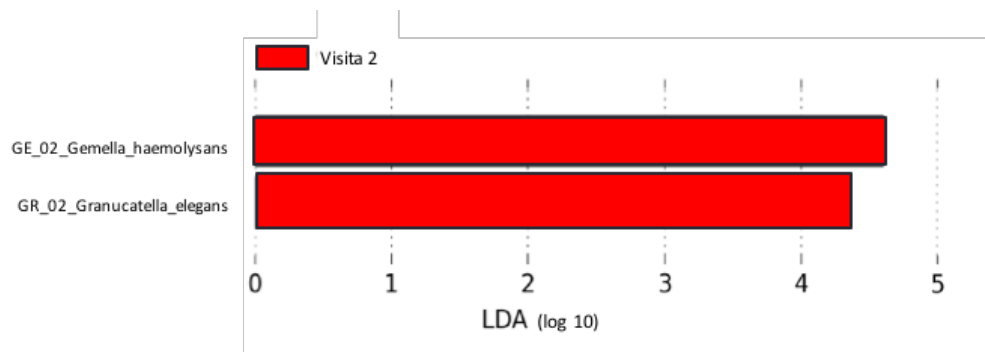


### 5.3.2 Análise Metagenômica: Comparação entre Visita 1 e Visita 2 (entre amostras de sítios específicos)

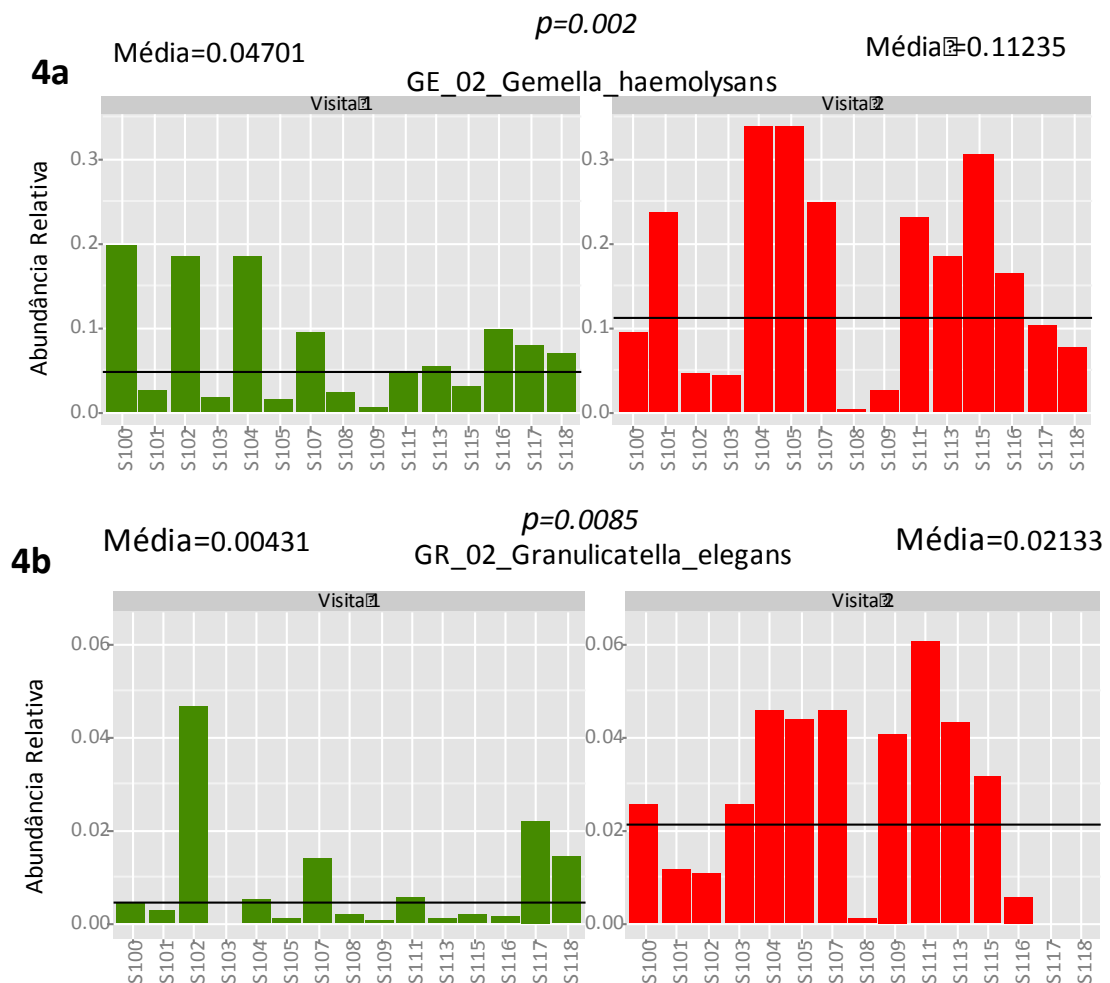
Ao comparar a Visita 1 e a Visita 2 entre as amostras analisadas nos sítios da mucosa bucal, em ambos os tipos de câncer, observou-se que as bactérias *Gemella hemolysans* e *Granulicatella elegans* apresentaram-se em superabundância durante a fase inicial da MB (Visita 2) (Figura 10 e gráficos 4a e 4b). Nesta análise não foi evidenciado abundância significativa de nenhum microorganismos na Visita 1. Na região de língua, as bactérias que se destacaram por se apresentarem em superabundância foram *Streptococcus spp.*, *Gemella hemolysans*, *Granulicatella elegans* e *Haemophilus spp.* (Figura 11 e gráficos 5 a-d). Observa-se superabundância de *Streptococcus spp.* de forma notória no sitio lingua.



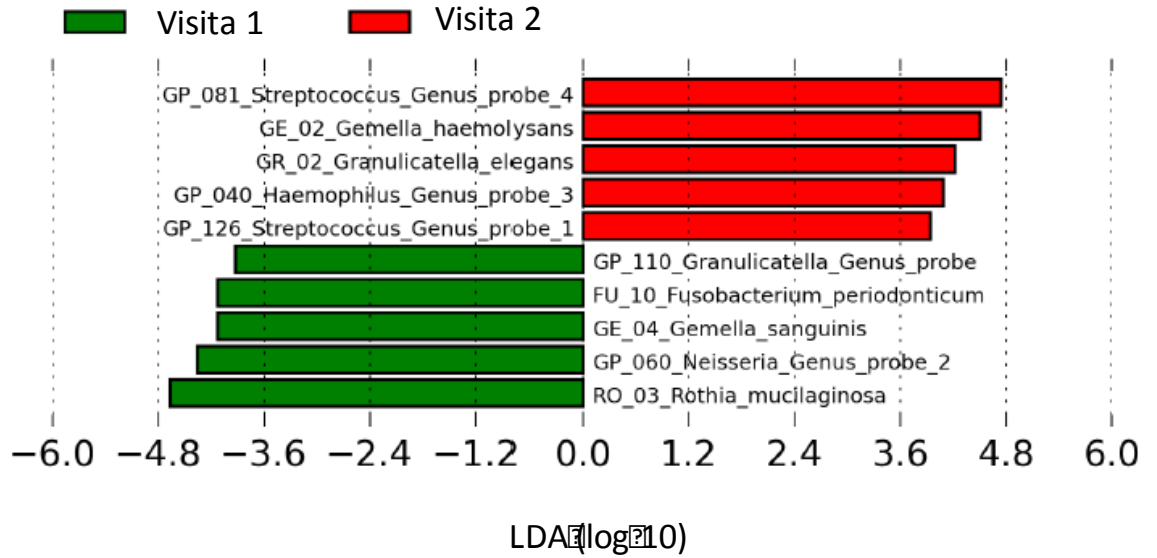
**Figura 10.** Análise de padrões de abundância microbiológica em sítios da mucosa bucal entre as visitas do estudo. As bactérias *Gemella haemolysans* e *Granucateella elegans* apresentaram-se superabundância durante a fase inicial da MB (Visita 2), ( $p < 0.05$ ;  $LDA > 2$ ).



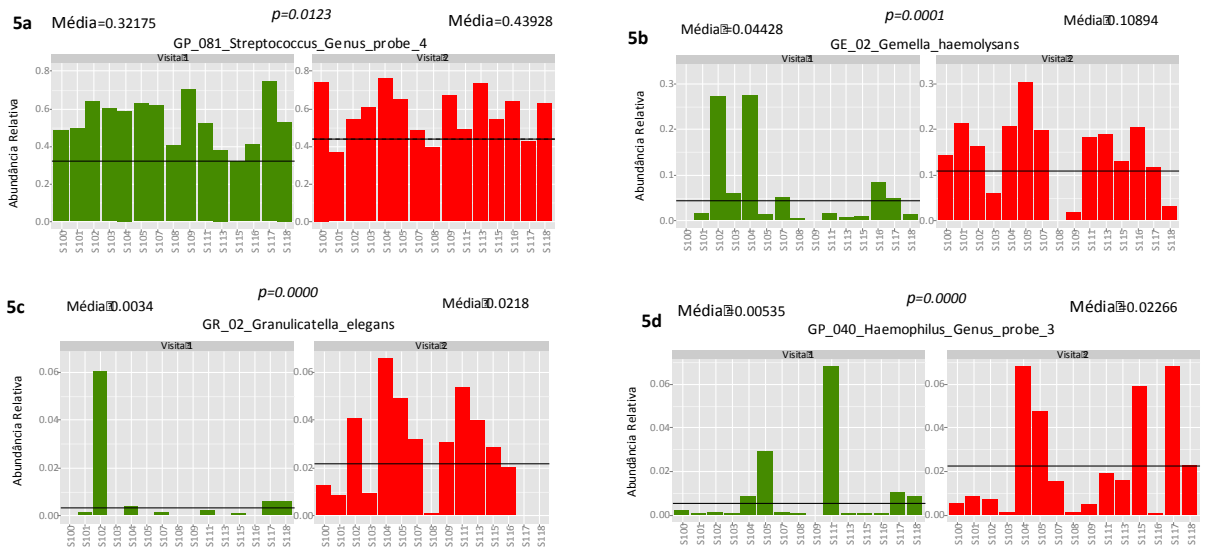
**Gráfico 4** – Espécies bacterianas encontradas em superabundância durante a fase inicial da MB (Visita 2) nos sítios da mucosa bucal: **4(a)** *Gemella hemolysans* e **4(b)** *Granulicatella elegans*



**Figura 11.** Análise de padrões de abundância microbiológica em sítios da língua entre as visitas do estudo. Nota-se superabundância das bactérias *Streptococcus spp.*, *Gemella haemolysans*, *Granulicatella elegans* e *Haemophilus sp.* durante a fase inicial da MB (Visita 2), ( $p < 0.05$ ;  $LDA > 2$ ).



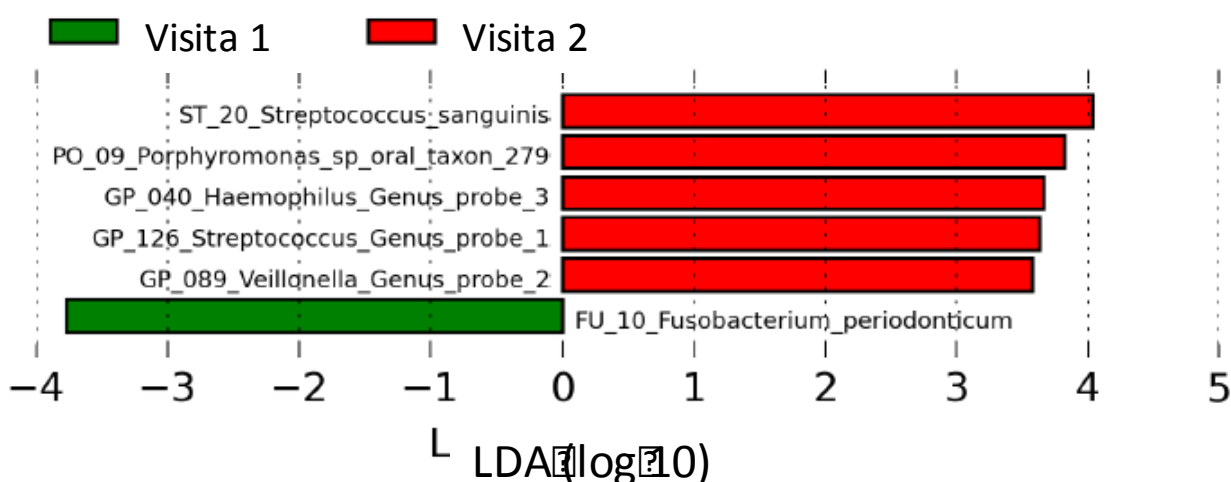
**Gráfico 5 (a-d)** – Abundância relativa de espécies bacterianas encontradas na Visita 1 e durante a fase inicial da MB (Visita 2) nos sítios de língua: **5(a)** *Streptococcus spp.*; **5(b)** *Gemella haemolysans*; **5(c)** *Granulicatella elegans*; **5(d)** *Haemophilus spp.*



### 5.3.3 Análise Metagenômica: Comparação entre Câncer da cavidade bucal e outros tipos de câncer

Ao analisar as amostras coletadas em pacientes com câncer da cavidade bucal entre as visitas do estudo observou-se que as bactérias *Streptococcus spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Haemophilus spp.* e *Veillonella spp.* foram encontradas em superabundância durante a fase inicial do desenvolvimento da MB (Visita 2) e, que *Fusobacterium periodonticum* encontrou-se em evidência significativa na Visita 1 do estudo (Figura 12). Em outros tipos de câncer de cabeça e pescoço (orofaringe, nasofaringe e outros), as bactérias que se destacaram por se apresentarem em abundância significativa na Visita 2 foram *Gemella hemolysans*, *Granulicatella elegans* e *Haemophilus spp.* Os microorganismos encontrados de forma significativa na Visita 1 desta análise foram *Leptotrichia sp.*, *Neisseria flavescens*, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemella spp.*, *Stomatobaculum sp* e *Veillonella spp.* (Figura 13). As informações descritas acima estão representadas na tabela 6.

**Figura 12.** Análise de padrões de abundância microbiológica entre as duas visitas do estudo em câncer da cavidade bucal



**Figura 13.** Análise de padrões de abundância microbiológica entre as duas visitas do estudo em câncer de orofaringe, nasofaringe e outros

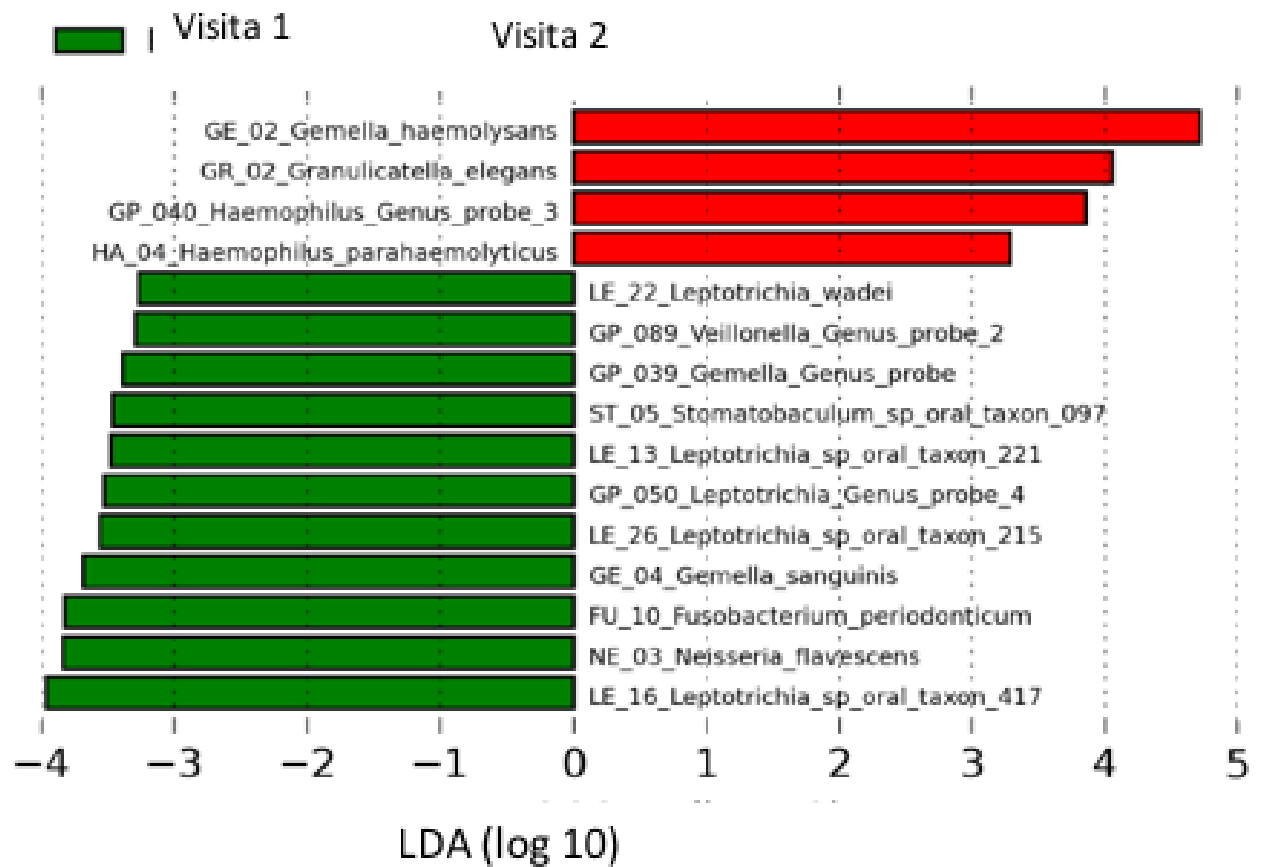


Tabela 6 – Espécies bacterianas encontradas em superabundância durante a fase inicial da MB (Visita 2) em câncer da cavidade bucal e em câncer da região de cabeça e pescoço (orofaringe, nasofaringe e sítio primário desconhecido)

Microorganismos	Análise Global					
	Cavidade Bucal			Outros (orofaríngea, nasofaríngea, sítio primário desconhecido)		
	Média		<i>p</i>	Média		<i>p</i>
	Visita 1	Visita 2		Visita 1	Visita 2	
<i>GE_02_Gemella_haemolysans</i>	N/A	N/A	N/A	0.02987	0.13487 ↑	0,0000
<i>GR_02_Granucattella_ellegans</i>	N/A	N/A	N/A	0.00152	0.02177 ↑	0,0000
<i>GP_040_Haemophilus_Genus_probe_3*</i>	0.00198	0.00659 ↑	0.0372	0.00797	0.02402 ↑	0.0003
<i>HA_04_Haemophilus_parahaemolyticus</i>	N/A	N/A	N/A	0.00155	0.00433 ↑	0.0000
<i>ST_20_Streptococcus_sanguinis</i>	0.0266	0.03866 ↑	0.0201	N/A	N/A	N/A
<i>PO_09_Porphryomonas_sp_oral_taxon_279</i>	0.00119	0.01085 ↑	0.0396	N/A	N/A	N/A
<i>GP_126_Streptococcus_Genus_probe_1**</i>	0.00644	0.01215 ↑	0.0263	N/A	N/A	N/A
<i>GP_089_Veillonella_Genus_probe_2***</i>	0.00644	0.01215 ↑	0.0263	0.01091 ↑	0.00194	0,0000

\**GP\_040\_Haemophilus\_Genus\_probe\_3* (*aegyptius*, *haemolyticus*, *influenzae*, *quentini*.sp. oral taxon 036, 908)

\*\**GP\_126\_Streptococcus\_Genus\_probe\_1* (*gordonii*, *sanguinis*)

\*\*\**GP\_089\_Veillonella\_Genus\_probe\_2* (*atypica*, *caviae*, *cricketi*, *dentocariosi*, *dispar*, *montpellierensis*, *parvula*, *ratti*, *rodentium*, *rogosae*, sp. oral taxon 780, 917)

↑ Superabundância microbiológica predominante na Visita 1

↑ Superabundância microbiológica predominante na Visita 2

N/A – Não aplicável

#### 5.4 ANÁLISE DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Ao realizar a análise dos níveis salivares de citocinas detectadas nos participantes nas duas visitas do estudo foi possível observar que os níveis de IL-6 foram maiores na Visita 2 em relação à Visita 1, com diferença estatisticamente significativa ( $p= 0.037$ ), como pode ser observado na tabela 7. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas visitas nos níveis salivares de IFN- $\delta$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-2, IL-4, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Entretanto, observa-se um aumento de IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF- $\alpha$  durante a Visita 2, sem significância estatística.

**Tabela 7** – Análise de citocinas pró-inflamatórias entre as visitas deste estudo (*Teste t Welch*)

Citocinas	Média (desvio padrao)		Valor de p
	Visita 1	Visita 2	
IFN- $\delta$	2.29 (5,01)	3.39(6.21)	0.611
IL-1 $\beta$	56.72(57.31)	116.6(238.1)	0.375
IL-10	1.01(1.57)	1.09(1.76)	0.910
IL-12p70	0.76(1.78)	1.04(1.86)	0.688
IL-13	6.54(4.51)	7.92(4.84)	0.441
IL-2	0.97(1.77)	0.76(1.72)	0.753
IL-4	0.12(0.39)	0.16(0.4)	0.809
IL-8	903.4(734.41)	1696.42(1895)	0.16
TNF- $\alpha$	4.7(9.87)	7.43(17.08)	0.609
IL-6	15.07(34.51)	103.76(140.2)	<b>0.037</b>

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, 100% dos pacientes desenvolveram mucosite bucal durante o tratamento anti-neoplásico (RT e/ou quimioRT), mostrando a alta incidência dessa toxicidade em pacientes com o diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço. Todos os pacientes com câncer na cavidade bucal foram submetidos a tratamento com Radioterapia, e 72% dos pacientes com o diagnóstico do câncer em outras regiões da cabeça e pescoço (orofaringe, nasofaringe e sítio primário desconhecido) receberam quimioRT como o tratamento de escolha. Estudos têm mostrado que a incidência da MB está associada a variáveis relacionadas ao paciente e ao tratamento ao qual este está sendo submetido. Por exemplo, a quimioterapia concomitante à RT resulta em aumento da frequência, gravidade e duração da mucosite bucal. A localização anatômica primária do tumor também é um fator de relevância. A probabilidade de um paciente com carcinoma de língua submetido à quimioRT em desenvolver mucosite bucal é de quase 100%. Por outro lado, um paciente com câncer de hipofaringe também recebendo quimioRT tem o mesmo risco situado em torno de 50%, pelo fato de os tecidos da cavidade bucal não estarem incluídos no campo primário de radiação (Sonis 2009). No nosso estudo, não houve diferença na incidência e no início do desenvolvimento da MB entre os diferentes tipos de câncer e a terapia anti-neoplásica de escolha. Essa observação demonstra que, além do campo de irradiação e da localização do câncer, fatores relacionados ao paciente, como idade, massa corporal, sexo, estado nutricional, estado de saúde e higiene bucal, função salivar, atividade do tumor e microbiota bucal também estão influenciando no risco do desenvolvimento da MB (Barasch and Peterson 2003).

Neste estudo, a idade do paciente foi associada, de forma significativa e positiva, com o início do desenvolvimento da MB. Ou seja, os pacientes mais jovens desenvolveram de forma mais rápida a MB do que os pacientes com idade mais avançada. São divergentes os dados publicados referentes à influência da idade sobre o desenvolvimento da mucosite bucal induzida pelo tratamento anti-neoplásico. Keefe e colaboradores (2007) sugeriram que idades extremas – baixas ou altas – podem ser consideradas fatores de risco para maior intensidade da mucosite, entretanto, existem poucas evidências que

confirmem essa hipótese (Keefe 2007). McCarthy e outros (1998) e Zalleberg e colaboradores (1998) relataram uma tendência no aumento da incidência e gravidade da MB em pacientes em idades mais avançadas (McCarthy et al. 1998; Zalcborg et al. 1998). Outro estudo demonstrou que os pacientes mais jovens submetidos aos agentes quimioterápicos apresentavam aumento no risco de desenvolverem mucosites (Wilkes 1998). As hipóteses para esse fato se fundamentam em uma maior taxa de renovação celular nas crianças e nos adolescentes, a qual torna a mucosa bucal mais suscetível aos efeitos das terapias antineoplásicas (Graham et al. 1993; Wilkes 1998). Essas alterações na integridade da mucosa contribuem consideravelmente para a mudança da microbiota bucal e a possível etiopatogenia MB (Sonis et al. 2004; Vanhoecke et al. 2015; Vasconcelos et al. 2016).

Sabe-se que o fluxo salivar, durante e após o tratamento com a RT, diminui drasticamente, alterando significativamente a viscosidade da saliva (Vanhoecke et al. 2015; Vasconcelos et al. 2016). Desde 1970, estudos demonstram claramente o impacto de hipossalivação na dinâmica da microbiota bucal. A mudança mais proeminente encontrada no estudo de Brown e outros (1975) foi o aumento de *Candida albicans*, que permaneceu persistente durante todo o tempo de duração da xerostomia (Brown et al. 1975). As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Tais microorganismos são encontrados entre 30% a 60% na saliva de indivíduos saudáveis e tornam-se patogênicos, caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou no comprometimento de barreiras anatômicas. As espécies de *Candida*, em geral, crescem bem na temperatura de 30°C, em pH ácido de 4,0 (Kim and Sudbery 2011). Em nosso estudo, foi observada a correlação negativa entre UFC de *Candida* e as variáveis de fluxo salivar e pH. Ou seja, quanto maior o número de UFC de *Candida*, menor se encontrava o fluxo da saliva e mais ácido o pH. Esses resultados indicam que o dano da radioterapia às glândulas salivares produz uma perda grave no fluxo salivar, que contribui para o rompimento da barreira natural da mucosa bucal e facilita a colonização microbiana (Scully et al. 1994; Alt-Epping et al. 2012; Wang et al. 2013).



Apesar de o presente estudo ter analisado apenas a fase inicial da MB, foi possível associar um maior número de UFC de *Candida spp.* com os pacientes que desenvolveram a MB mais rapidamente. Belazi e outros (2004) afirmam que, depois de aproximadamente duas semanas de tratamento radioterápico, o número de espécies de *Candida spp.* aumenta (Belazi et al. 2004). Inúmeros estudos têm mostrado uma associação significativa entre a gravidade da MB e a presença de *Candida spp.* (Gaetti-Jardim et al. 2011; Alt-Epping et al. 2012; de Mendonca et al. 2012; Laheij et al. 2012; Sonalika et al. 2012; Ramla et al. 2015; Jain et al. 2016). No nosso estudo, não foi possível realizar essa análise uma vez que a avaliação da MB se dava no primeiro dia de desenvolvimento da lesão, no qual a gravidade ainda se encontrava na sua fase mais branda.

A plausibilidade biológica da possível associação entre a presença de *Candida spp.* e o risco de desenvolvimento da MB pode ser devido ao aumento da expressão de receptores de lectina tipo C-like (CLRs), que estão envolvidos na modulação da resposta imune inata e na inflamação. Estes receptores podem se ligar a sítios reconhecedores de carboidratos, como a manose, tipicamente encontrada na superfície de fungos, como, por exemplo, a *Candida albicans* e podem ativar fatores de transcrição nuclear, como o NF-kB (Saijo et al. 2010; Saijo and Iwakura 2011; Zhu et al. 2013). Outros estudos são necessários para esclarecer esta hipótese.

A diversificação entre espécies de *Candida*, durante e após a realização da RT, foi constatada por diferentes pesquisadores (Gaetti-Jardim et al. 2011; Laheij et al. 2012). No nosso estudo, a espécie mais prevalente foi a *Candida albicans*, todavia observaram-se mudanças da espécie de *Candida albicans* para *Candida krusei* em dois pacientes, ainda na fase inicial da MB. É importante ressaltar esta mudança na espécie de *Candida*, uma vez que se tem empregado o uso profilático de fluconazol com o objetivo de prevenir e controlar a candidíase bucal (Koc and Aktas 2003). Nicolatou-Galitis e colaboradores (2006) verificaram os efeitos do fluconazol profilático em pacientes oncológicos de cabeça e pescoço submetidos à RT. Dos 63 pacientes, 34 receberam fluconazol durante a RT e foram comparados com 29 pacientes que somente fizeram RT. Depois de completar a RT, houve uma redução de 40,7% de prevalência de *Candida* no grupo tratado com fluconazol.

A gravidade da mucosite foi avaliada depois da prevenção da candidíase pelo fluconazol, que foi benéfico na incidência de mucosite graus 3 e 4. O autor defende a hipótese de que a candidíase desempenha um importante papel na gravidade da mucosite por radiação (Nicolatou-Galitis et al. 2006). Krcmery e outros (1999), no estudo sobre candidemias com espécies *albicans* e *não albicans*, verificaram que todos os pacientes com *Candida glabrata* e *Candida krusei* só apresentaram esses microorganismos após o fluconazol ter sido introduzido (Krcmery et al. 1999). *Candida krusei* é naturalmente resistente ao fluconazol, o que provavelmente explique seu aumento em pacientes neutropênicos expostos a esse antifúngico (Wingard 1995). Portanto, o uso generalizado de fluconazol tem que ser levado em consideração uma vez que tem contribuído para o aumento de infecções orofaríngeas com espécies de *Candida krusei*. Estudos têm demonstrado que a higiene bucal é uma estratégia de prevenção visto que reduz o desenvolvimento de microrganismos e também de mucosite severa, permitindo a eliminação de fatores de infecção (Elad et al. 2013a; McGuire et al. 2013; Lalla et al. 2014a; De Sanctis et al. 2016).

Identificação de espécies bacterianas da cavidade bucal e quantificação da abundância relativa destas espécies constitui um desafio, devido ao fato de que existe uma diversidade enorme de espécies que habitam a cavidade bucal, e muitas delas ainda não identificadas pelo DNA. Portanto, HOMINGS é somente capaz de fornecer uma semi-quantificação para a identificação das espécies microbiológicas. Para superar esta limitação, a tecnologia de HOMINGS detecta espécies microbianas em duas formas; a) número total de cada espécie onde sondas de DNA já foram estabelecidas (*via species-level probes*) em 100% e de número de gênero (*via species probes and genus probes*) com uma precisão de 85% para espécies que apresentam código genético muito similar e, portanto impossível de serem decodificados por uma técnica de hibridização usando sondas de 16S rRNA. Certamente que a identificação de espécies é mais importante, mas na ausência de uma sonda específica, uma informação baseada em gênero é também muito útil e informativa. Entretanto, no nosso estudo foi encontrado uma média de 14% de espécies consideradas como “não identificadas” por paciente. Isso corresponde a sequências que provavelmente não completaram a hibridização com a sonda específica ou a hibridização aconteceu em várias sondas. Estas sequências

que falharam a esta técnica fornecem oportunidades para construção de sondas mais específicas, as quais poderão identificar novas espécies no futuro. Portanto, ao analisarmos os resultados deste estudo, podemos observar que, muitas vezes, o microorganismo identificado apresenta a espécie ao qual pertence, mas outras, esta não foi identificada, apresentando apenas o gênero bacteriano.

Estudos têm mostrado que a terapia anti-neoplásica pode influenciar a colonização da microbiota bucal. Por exemplo, a predominância de bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia* foram encontradas em amostras de sangue de pacientes submetidos à RT e na cavidade bucal de pacientes tratados com quimioterapia. Da mesma forma, predominância de bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* foi observada no grupo de pacientes submetidos à quimioterapia e à quimioRT em amostras sanguíneas. Esses mesmos microorganismos apresentaram-se evidentes na cavidade bucal de pacientes tratados com RT e quimioRT. O patógeno que se apresentou com maior significância na cavidade bucal do grupo de pacientes tratados com RT e quimioRT foi a *Candida albicans* (Vanhoecke et al. 2015). Desta forma, é adequado citar que, em nosso estudo, foi realizada uma análise específica para os diferentes tipos de diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço (cavidade bucal e outros).

Na população do presente estudo, a bactéria *Haemophilus spp.* foi identificada em superabundância durante o desenvolvimento inicial da MB. Os *Haemophilus spp.* são organismos gram-negativos e anaeróbios facultativos, com pronunciada especificidade para o hospedeiro, sendo encontrados normalmente em mucosas do trato respiratório superior e na saliva. Nisengard RJ (1994) afirmam que o deslocamento desses microorganismos do habitat normal torna-os patógenos oportunistas (Nisengard RJ 1994). Nesse estudo, esse microorganismo apresentou-se predominantemente na região de língua e em ambos os tipos de câncer durante a fase inicial da MB, o que nos leva sugerir a sua função de biomarcador preditivo da MB nesta população oncológica. No entanto, não foram encontrados, na literatura, estudos que associem a presença desse microorganismo em pacientes com câncer de cabeça e pescoço durante ou após RT e/ou quimioRT. Em um estudo realizado por Olczak-Kowalczyk e outros (2012), ao avaliar amostras sanguíneas de

pacientes pediátricos submetidos à quimioterapia, com diagnóstico de bacteremia, encontraram resultados contrários ao nosso estudo, no qual o *Haemophilus spp.* apresentou-se predominantemente antes do desenvolvimento da MB ou após da sua remissão (4 a 6 semanas) (Olczak-Kowalczyk et al. 2012). Em um estudo onde a identificação da microbiota de pacientes saudáveis foi examinada, observou-se que a presença de *Haemophilus spp.*, na fase inicial de biofilme dentário, estava associada com a sua capacidade de coagregação com as bactérias *Streptococcus sanguinis* e *S. oralis* por meio do reconhecimento de receptores polissacarídeos específicos pela adesina presente na membrana externa e pela sua alta afinidade à mucina salivar MG1 encontrada na saliva, película adquirida do esmalte e da mucosa (Heller et al. 2016). Tais características podem explicar a superabundância de *Haemophilus spp.* em nosso estudo. Estas bactérias foram identificadas em sítios específicos de língua, em ambos os tipos de câncer, onde também foi observada uma superabundância de espécies bacterianas de *Streptococcus*.

Neste estudo, as espécies bacterianas *Gemella haemolysans* e *Granulicatella elegans* apresentaram-se superabundantes na fase inicial da MB, em ambos os tipos de câncer, especialmente no grupo de pacientes com câncer de orofaringe, nasofaringe e sítio primário desconhecido, tanto nos sítios específicos da língua quanto da mucosa bucal. *Gemella haemolysans* e *Ganulicatella elegans* são bactérias gram-positivas e anaeróbias facultativas. Esses microrganismos fazem parte da microbiota humana da cavidade bucal, sendo que a *Gemella haemolysans* é também comumente encontrada no trato respiratório e, em aproximadamente, 30% da região nasofaríngea. Em hospedeiros imunocomprometidos, essas bactérias atuam como patógenos oportunistas nos quais são capazes de causar infecções generalizadas e localizadas, estando associadas como uma possível causa da endocardite infecciosa (Ohara-Nemoto et al. 2005; Ramchandani et al. 2014; Patri and Agrawal 2016). Estudos têm associado a formação da fase inicial do biofilme dentário com a *Gemella haemolysans*, entretanto ainda não está estabelecido mecanismo de ação dessa bactéria, seja este por meio da coagregação ou simbiose (Heller et al. 2016).

Dois estudos corroboraram com os resultados desta pesquisa, no

entanto apenas um deles estudou a mesma população de pacientes. Hu e outros (2013), com o intuito de traçar o perfil microbiológico da cavidade bucal em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à RT, encontraram 11 gêneros bacterianos (*Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Capnocytophaga*, *Derxia*, *Neisseria*, *Rothia*, *Prevotella*, *Granulicatella*, *Luteococcus*, e *Gemella*) nos indivíduos estudados durante o tratamento anti-neoplásico (Hu et al. 2013). Resultados de outro estudo realizado em pacientes com câncer de mama, antes e após a quimioterapia, revelaram um aumento no número de espécies microbianas identificadas em amostras da mucosa bucal. Um total de 41 espécies foram detectadas, com predominância de *Gemella haemolysans* e *Streptococcus mitis* (Napenas et al. 2010).

Contraditoriamente, Ames e colaboradores (2012), para analisar os efeitos do transplante alogênico de células-tronco na microbiota bucal, coletaram amostras de saliva, mucosa bucal, língua e biofilme dentário antes e após o transplante. O número das espécies bacterianas – *Streptococcus*, *Gemella* e *Veillonella* – permaneceu estável (Ames et al. 2012).

Outro importante resultado encontrado em nosso estudo relacionado à *Gemella spp.* (*Gemella asaccharolytica*, *bergeri*, *cuniculi*, *haemolysans*, *morbillosum*, *palaticanis*, *sanguinis*) foi a presença dessa bactéria de forma superabundante na Visita 1 (antes do desenvolvimento da MB). Esse dado, adicionado à presença significativa da *Gemella haemolysans* na fase inicial da MB e da concordância com a literatura, sugere que essa espécie bacteriana representa um forte biomarcador microbiológico preditivo da MB em pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço.

A espécie bacteriana *Streptococcus spp.* foi encontrada em superabundância na Visita 2 (após o desenvolvimento inicial da MB), tanto em pacientes com carcinoma de cavidade bucal, assim como em pacientes com câncer em outras regiões da cabeça e do pescoço (orofaringe, nasofaringe e sítio primário desconhecido), quando o sítio específico analisado foi o de língua. Contudo, ao analisar os resultados separadamente (cavidade bucal e outros carcinomas), notou-se que *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, juntamente com a *Porphyromonas spp.* apresentaram uma maior abundância durante o desenvolvimento inicial da MB em pacientes com câncer na cavidade bucal quando comparado com outros tipos de câncer de cabeça e pescoço.

*Streptococcus spp.* são microorganismos gram-positivos, aeróbios e anaeróbios facultativos e constituem a principal população bacteriana da cavidade bucal, com espécies distintas associadas a diferentes nichos na boca. Por exemplo, *Streptococcus sanguinis* e *S. mutans* são encontrados no biofilme dentário, enquanto o *S. salivarius* é encontrado principalmente na língua, e o *S. mitis*, em outros tecidos mucosos (Nisengard 1994). No presente estudo, a região de maior abundância da espécie de *S. sanguinis* e *gordonii* foi na língua. *Porphyromonas spp.* são bactérias proteolíticas, gram-negativas, anaeróbias obrigatórias, comuns no biofilme dentário, que têm sido associados frequentemente ao desenvolvimento de periodontites devido a sua capacidade de induzir a liberação de citocinas, contribuindo, dessa forma, para a perpetuação do quadro inflamatório (Vanhoecke et al. 2015). Apesar desta bactéria ter sido encontrada em abundância em pacientes diagnosticados com câncer de cavidade bucal, em nosso estudo, a abundância dessa espécie não foi evidenciada em nenhum sítio em particular.

Em um estudo realizado por Hu e outros (2013), *Streptococcus spp.* foi o microorganismo que se apresentou em maior abundância durante as doses radioterápicas de 10cGy e 20cGy em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à RT. Tal resultado demonstra que essa bactéria foi encontrada abundantemente durante as primeiras semanas do tratamento radioterápico, corroborando o nosso resultado. Todavia, esse estudo não avaliou a presença ou ausência da mucosite bucal associada com esta bactéria (Hu et al. 2013). Tong e outros (2003) também avaliaram a presença de *Streptococcus spp.* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço antes e após a RT, e como resultado, encontraram o aumento significativo de *S. mitis* e *S. salivarius* (Tong et al. 2003). Estudos realizados em pacientes com leucemia submetidos à quimioterapia demonstraram elevada frequência do microorganismo *Streptococcus viridans* quando associados a MB (Okamoto et al. 2003; Huang et al. 2007; Olczak-Kowalczyk et al. 2012). *Streptococcus mitis* e *Gemella haemolysans* foram as bactérias mais encontradas em pacientes com câncer de mama após o tratamento com quimioterapia (Napenas et al. 2007). Laheij e colaboradores (2012) atribuíram à bactéria *Porphyromonas gingivalis* um papel de biomarcador preditivo para o desenvolvimento de úlceras orais ao evidenciar o aumento desses microorganismos na MB, em

pacientes com câncer submetidos a transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (Laheij et al. 2012).

Em geral, a presença de *Streptococcus spp.* está associada à formação do biofilme em sua fase inicial, devido aos seus mecanismos de aderência a película adquirida por meio de proteínas ricas em prolina,  $\alpha$ -amilase e glicoproteínas. Uma importante característica dessas bactérias é a sua capacidade em proliferar na presença de oxigênio, uma característica peculiar do biofilme em sua fase inicial. O estudo *in vitro* realizado por Cruz e colaboradores (2010) mostrou que doses terapêuticas de radiação podem promover a formação do biofilme bacteriano e aderência de *Streptococcus mutans* em restaurações dentárias (Cruz et al. 2010). Sabe-se que a relação de *Porphyromonas spp.* com biofilme dentário tem sido relacionado a sua fase de maturação. No entanto, estudos têm mostrado a presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* não somente na fase de maturação do biofilme como também na fase inicial de formação do biofilme, porém com a rápida substituição de *Porphyromonas gingivalis* por *Streptococcus spp.* e *Actinomyces spp.* (Heller et al. 2016), o que pode ter acontecido no o presente estudo.

Vanhoecke e outros (2015) afirmam que, apesar de ainda não estar claro na literatura, a extensão do papel de bactérias mucolíticas (algumas delas evidenciadas em nosso estudo), como *Streptococcus mitis*, *anginosus*, *mutans*, *oralis*, *sanguinis* e *sobrinus* na patogênese da MB – essas bactérias definitivamente têm efeitos degradantes na mucosa, por meio da produção de enzimas (como, por exemplo, a enzima glicosidase) que têm o potencial de degradar mucinas (Vanhoecke et al. 2015). O estudo também mostrou a capacidade que essas bactérias têm de transformar em fenótipos patogênicos em pacientes imunocomprometidos, sendo, muitas vezes, a causa de uma variedade de complicações infecciosas, a exemplo da endocardite (Mitchell 2011). Apesar destas características mencionadas acima, *Streptococcus spp.* têm sido considerados para o desenvolvimento de agente anti-microbiano (probiótico), devido a possível associação deste microorganismo à ( i ) não-indução a qualquer resposta pró-inflamatória, ( ii ) estimulação de uma resposta anti-inflamatória e ( iii ) modulação de genes associados com a adesão da camada epitelial e homeostase. Por exemplo, o comportamento de *S. salivarius*

*K12* tem considerado o seu potencial probiótico devido às características citadas anteriormente e por serem conhecidas como bactérias bem toleradas pelo hospedeiro, além de que, quando mantida na superfície epitelial, protege ativamente o hospedeiro de inflamação e de apoptose induzida por agentes patogênicos (Cosseau et al. 2008). Experimentos *in vitro* e *in vivo* adicionais são necessários para validar essa hipótese.

Adicionalmente a essas características peculiares, estudos realizados por Hasegawa e outros (2007) mostrou a ação de *S. gordonii* e *Porphyromonas gingivalis* em impactar a atividade da via de sinalização MAPK (Hasegawa et al. 2007), que tem sido abordada como uma via superativada em mucosites intestinais e bucais, sugerindo ser uma potente via para bactérias bucais em impactar mucosite (Bowen et al. 2007; Sonis et al. 2007). Fatores de virulência, como a LPS da *Porphyromonas gingivalis* também, têm sido relacionados à ativação de mediadores do sistema imune inato, TLR. Ainda não está estabelecido o potencial de envolvimento da via de sinalização de TLR em mucosites, no entanto estudo tem demonstrado que PAMPs microbianos contribuem para a ativação de TLR, apesar de ainda não se saber em que extensão (Vanhoecke et al. 2015).

Com resultados deste trabalho e com concordância com alguns estudos já apresentados na literatura, acredita-se que o *Streptococcus spp.* e o *Porphyromonas spp.* podem ser considerados biomarcadores preditivos da MB, principalmente em pacientes com câncer na cavidade bucal.

No nosso estudo, também foi observada a presença da bactéria *Prevotella oris* de forma superabundante durante a Visita 2, sugerindo a sua característica de biomarcador microbiológico em lesões iniciais de MB. Apesar de não haver, na literatura, estudos que associem a presença de *Prevotella spp.* com lesões iniciais da MB, essas bactérias estão associadas a periodontites e gengivites, e estudos têm sugerido a sua capacidade em agravar o processo inflamatório em MB (Laheij et al. 2012). Essa capacidade está associada aos fatores de virulência presentes nestas bactérias anaeróbias, gram-negativas, como por exemplo o LPS, o qual através da ativação de macrófagos estimula a produção de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , e MMPs (Page et al. 1997).

Durante a Visita 1 deste estudo, foi observado superabundância das



bactérias anaeróbicas obrigatórias, *Fusobacterium periodonticum* e do gênero bacteriano *Leptotrichia spp.* Sabe-se que *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Porphyromonas* e *Prevotella* são os principais microorganismos encontrados na fase de maturação do biofilme dentário (correspondendo às bactérias que se agregam entre si para formar essa estrutura). São comumente encontradas na fase de maturação do biofilme dentário e em ambientes de baixa tensão de oxigênio e rico em nutrientes, como o do sulco periodontal (Nisengard RJ 1994). O fato da *Leptotrichia spp.* e *Fusobacterium periodonticum* não ter sido associada à fase inicial da MB nos leva a acreditar que o procedimento de profilaxia bucal realizado durante a Visita 1 foi de grande importância para minimizar os efeitos secundários ao tratamento anti-neoplásico em mucosa bucal, uma vez que estas bactérias são consideradas patogênicas, causa de doença periodontal, e com capacidade de ativar o sistema imune inato através da estimulação de TLR-2 e TLR-4 (Sun et al. 2010).

Neste estudo, os níveis salivares da IL-6 foi encontrados aumentados de forma significante estatisticamente durante a fase inicial da MB. O aumento da IL-6 pode estar relacionado com o aumento da abundância relativa das bactérias, *Porphyromomas spp.* e *Prevotella spp.*, que são indutoras da produção de IL-6. Além disso, a IL-6 é um potente indicador da inflamação. Neste estudo não observou significância estatística nas outras citocinas analisadas, no entanto, pode se observar um aumento de TNF- $\alpha$  e IL-8 na visita 2 deste estudo. Sonis e outros (2000) detectaram um aumento na expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em células da submucosa de hamsters, após radioterapia da mucosa jugal, decorrente do processo inflamatório (Sonis et al. 2000; Sonis et al. 2004).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostrou mudança na dinâmica da microbiota bucal durante a fase inicial da MB. Nota-se que, a maioria das bactérias consideradas biomarcadores preditivos da MB neste estudo (*Gemella* spp. *Granulicatella elegans*, *Haemophilus* spp., e *Streptococcus* spp.), são bactérias anaeróbicas facultativas ou aeróbicas, o que nos leva a sugerir que a própria população bacteriana comensal contribui para o rompimento da homeostase da cavidade bucal após o início da terapia anti-neoplásica, através da ativação do sistema imune inato. Além disso, estas bactérias possivelmente atuam como agentes patogênicos oportunistas em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a RT e/ou quimio-RT.

Estudos mais aprofundados são necessários para explorar a atuação destes microorganismos no sistema imune inato, durante o desenvolvimento inicial de mucosite bucal. Uma vez, que o envolvimento da mudança microbiológica na patogênese da mucosite bucal induzida pela terapia anti-neoplásica estiver elucidada, será possível desenvolver terapias profiláticas e agentes antimicrobianos efetivos para a inibição do patógeno emergente específico ou para restaurar a homeostase da cavidade bucal.

## REFERÊNCIAS

- Brown LR, Dreizen S, Handler S, Johnston DA. 1975. Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. *J Dent Res.* 54(4):740-750.
- Graham KM, Pecoraro DA, Ventura M, Meyer CC. 1993. Reducing the incidence of stomatitis using a quality assessment and improvement approach. *Cancer Nurs.* 16(2):117-122.
- Nisengard RJ NM. 1994. Oral microbiology and immunology. . Saunders Company Philadelphia.477.
- Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. 1994. Candida and oral candidosis: A review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 5(2):125-157.
- Wingard JR. 1995. Importance of candida species other than c. Albicans as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis.* 20(1):115-125.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. 1997. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000. 14:216-248.
- McCarthy GM, Awde JD, Ghandi H, Vincent M, Kocha WI. 1998. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncol.* 34(6):484-490.
- Sonis ST. 1998. Mucositis as a biological process: A new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral oncology.* 34(1):39-43.
- Wilkes JD. 1998. Prevention and treatment of oral mucositis following cancer chemotherapy. *Semin Oncol.* 25(5):538-551.
- Zalcborg J, Kerr D, Seymour L, Palmer M. 1998. Haematological and non-haematological toxicity after 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced colorectal cancer is significantly associated with gender, increasing age and cycle number. Tomudex international study group. *Eur J Cancer.* 34(12):1871-1875.
- Krcmery V, Jr., Mrazova M, Kunova A, Grey E, Mardiak J, Jurga L, Sabo A, Suflarsky J, Sevcikova L, Sorkovska D et al. 1999. Nosocomial candidaemias due to species other than candida albicans in cancer patients. Aetiology, risk factors, and outcome of 45 episodes within 10 years in a single cancer institution. *Support Care Cancer.* 7(6):428-431.
- Biron P, Sebban C, Gourmet R, Chvetzoff G, Philip I, Blay JY. 2000. Research controversies in management of oral mucositis. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer.* 8(1):68-71.
- Peterson DE. 2000. Oral problems in supportive care: No longer an orphan topic? *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer.* 8(5):347-348.
- Raber-Durlacher JE, Weijl NI, Abu Saris M, de Koning B, Zwinderman AH, Osanto S. 2000. Oral mucositis in patients treated with chemotherapy for solid tumors: A retrospective analysis of 150 cases. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer.* 8(5):366-371.
- Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Mason L, Login G, Ymamkawa M, Moses G, Bouchard P et al. 2000. Defining mechanisms of

- action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol.* 36(4):373-381.
- Bensadoun RJ, Magne N, Marcy PY, Demard F. 2001. Chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: New trends in pathophysiology, prevention and treatment. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies.* 258(9):481-487.
- Epstein JB, Truelove EL, Oien H, Allison C, Le ND, Epstein MS. 2001. Oral topical doxepin rinse: Analgesic effect in patients with oral mucosal pain due to cancer or cancer therapy. *Oral oncology.* 37(8):632-637.
- Wijers OB, Levendag PC, Harms ER, Gan-Teng AM, Schmitz PI, Hendriks WD, Wilims EB, van der Est H, Visch LL. 2001. Mucositis reduction by selective elimination of oral flora in irradiated cancers of the head and neck: A placebo-controlled double-blind randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 50(2):343-352.
- Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. 2002. Hmgb1 as a cytokine and therapeutic target. *Journal of endotoxin research.* 8(6):469-472.
- Barasch A, Peterson DE. 2003. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: Unanswered questions. *Oral Oncol.* 39(2):91-100.
- Chan CW, Chang AM, Molassiotis A, Lee IY, Lee GC. 2003. Oral complications in chinese cancer patients undergoing chemotherapy. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer.* 11(1):48-55.
- Elting LS, Cooksley C, Chambers M, Cantor SB, Manzullo E, Rubenstein EB. 2003. The burdens of cancer therapy. *Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis.* *Cancer.* 98(7):1531-1539.
- Koc M, Aktas E. 2003. Prophylactic treatment of mycotic mucositis in radiotherapy of patients with head and neck cancers. *Jpn J Clin Oncol.* 33(2):57-60.
- Okamoto Y, Ribeiro RC, Srivastava DK, Shenep JL, Pui CH, Razzouk BI. 2003. Viridans streptococcal sepsis: Clinical features and complications in childhood acute myeloid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 25(9):696-703.
- Scully C, Epstein J, Sonis S. 2003. Oral mucositis: A challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: Part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. *Head Neck.* 25(12):1057-1070.
- Stokman MA, Spijkervet FK, Burlage FR, Dijkstra PU, Manson WL, de Vries EG, Roodenburg JL. 2003. Oral mucositis and selective elimination of oral flora in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: A double-blind randomised clinical trial. *Br J Cancer.* 88(7):1012-1016.
- Tong HC, Gao XJ, Dong XZ. 2003. Non-mutans streptococci in patients receiving radiotherapy in the head and neck area. *Caries Res.* 37(4):261-266.
- Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, Komaroff E, Nalysnyk L, Zilberberg MD. 2003a. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: A systematic literature review. *Radiother Oncol.* 66(3):253-262.
- Trotti A, Colevas AD, Setser A, Rusch V, Jaques D, Budach V, Langer C, Murphy B, Cumberlin R, Coleman CN et al. 2003b. Ctcae v3.0: Development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Seminars in radiation oncology.* 13(3):176-181.

- Belazi M, Velegraki A, Koussidou-Eremondi T, Andreadis D, Hini S, Arsenis G, Eliopoulou C, Destouni E, Antoniadou D. 2004. Oral candida isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: Prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 19(6):347-351.
- Giles FJ, Rodriguez R, Weisdorf D, Wingard JR, Martin PJ, Fleming TR, Goldberg SL, Anaissie EJ, Bolwell BJ, Chao NJ et al. 2004. A phase iii, randomized, double-blind, placebo-controlled, study of iseganan for the reduction of stomatitis in patients receiving stomatotoxic chemotherapy. *Leuk Res.* 28(6):559-565.
- Glenny AM, Gibson F, Auld E, Coulson S, Clarkson JE, Craig JV, Eden OB, Worthington HV, Pizer B, Group U-PMC. 2004. A survey of current practice with regard to oral care for children being treated for cancer. *European journal of cancer.* 40(8):1217-1224.
- Scully C, Epstein J, Sonis S. 2004. Oral mucositis: A challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: Diagnosis and management of mucositis. *Head & neck.* 26(1):77-84.
- Sonis ST. 2004a. Oral mucositis in cancer therapy. *J Support Oncol.* 2(6 Suppl 3):3-8.
- Sonis ST. 2004b. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer.* 4(4):277-284.
- Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB et al. 2004. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: Pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer.* 100(9 Suppl):1995-2025.
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology.* 43(11):5721-5732.
- Emery MP, Perrier LL, Acquadro C. 2005. Patient-reported outcome and quality of life instruments database (proqolid): Frequently asked questions. *Health and quality of life outcomes.* 3:12.
- Ohara-Nemoto Y, Kishi K, Satho M, Tajika S, Sasaki M, Namioka A, Kimura S. 2005. Infective endocarditis caused by *granulicatella elegans* originating in the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 43(3):1405-1407.
- Sonis ST. 2005. Is oral mucositis an inevitable consequence of intensive therapy for hematologic cancers? *Nat Clin Pract Oncol.* 2(3):134-135.
- Miller EH, Quinn AI. 2006. Dental considerations in the management of head and neck cancer patients. *Otolaryngologic clinics of North America.* 39(2):319-329.
- Nicolatou-Galitis O, Velegraki A, Sotiropoulou-Lontou A, Dardoufas K, Kouloulis V, Kyprianou K, Kolitsi G, Skarleas C, Pissakas G, Papanicolaou VS et al. 2006. Effect of fluconazole antifungal prophylaxis on oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy. *Support Care Cancer.* 14(1):44-51.
- Scully C, Sonis S, Diz PD. 2006. Oral mucositis. *Oral Dis.* 12(3):229-241.
- Stiff PJ, Erder H, Bensinger WI, Emmanouilides C, Gentile T, Isitt J, Lu ZJ, Spielberger R. 2006. Reliability and validity of a patient self-administered daily questionnaire to assess impact of oral mucositis (om) on pain and daily functioning in patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation (hsct). *Bone Marrow Transplant.* 37(4):393-401.

- Bowen JM, Gibson RJ, Tsykin A, Stringer AM, Logan RM, Keefe DM. 2007. Gene expression analysis of multiple gastrointestinal regions reveals activation of common cell regulatory pathways following cytotoxic chemotherapy. *Int J Cancer*. 121(8):1847-1856.
- Hasegawa Y, Mans JJ, Mao S, Lopez MC, Baker HV, Handfield M, Lamont RJ. 2007. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species. *Infect Immun*. 75(5):2540-2547.
- Huang WT, Chang LY, Hsueh PR, Lu CY, Shao PL, Huang FY, Lee PI, Chen CM, Lee CY, Huang LM. 2007. Clinical features and complications of viridans streptococci bloodstream infection in pediatric hemato-oncology patients. *J Microbiol Immunol Infect*. 40(4):349-354.
- Keefe DM. 2007. Intestinal mucositis: Mechanisms and management. *Curr Opin Oncol*. 19(4):323-327.
- Napenas JJ, Brennan MT, Bahrani-Mougeot FK, Fox PC, Lockhart PB. 2007. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 103(1):48-59.
- Quinn B, Stone R, Uhlenhopp M, McCann S, Blijlevens N. 2007. Ensuring accurate oral mucositis assessment in the european group for blood and marrow transplantation prospective oral mucositis audit. *European journal of oncology nursing : the official journal of European Oncology Nursing Society*. 11 Suppl 1:S10-18.
- Sonis S, Haddad R, Posner M, Watkins B, Fey E, Morgan TV, Mookanampambal L, Ramoni M. 2007. Gene expression changes in peripheral blood cells provide insight into the biological mechanisms associated with regimen-related toxicities in patients being treated for head and neck cancers. *Oral Oncol*. 43(3):289-300.
- Sonis ST. 2007. Pathobiology of oral mucositis: Novel insights and opportunities. *J Support Oncol*. 5(9 Suppl 4):3-11.
- Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R. 2008. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer immunity*. 8:10.
- Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. 2008. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 40(6-7):1362-1378.
- Corby PM, Biesbrock A, Bartizek R, Corby AL, Monteverde R, Ceschin R, Bretz WA. 2008. Treatment outcomes of dental flossing in twins: Molecular analysis of the interproximal microflora. *Journal of periodontology*. 79(8):1426-1433.
- Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, Gardy JL, Chikatamarla A, Gellatly S, Yu LL, Pistolic J, Falsafi R, Tagg J et al. 2008. The commensal streptococcus salivarius k12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun*. 76(9):4163-4175.
- Jensen SB, Mouridsen HT, Reibel J, Brunner N, Nauntofte B. 2008. Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary salivary gland hypofunction. *Oral Oncol*. 44(2):162-173.
- Blijlevens NM, Logan RM, Netea MG. 2009. The changing face of febrile neutropenia-from monotherapy to moulds to mucositis. *Mucositis: From*

- febrile neutropenia to febrile mucositis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 63 Suppl 1:i36-40.
- Djuric M, Jankovic L, Jovanovic T, Pavlica D, Brkic S, Knezevic A, Markovic D, Milasin J. 2009. Prevalence of oral herpes simplex virus reactivation in cancer patients: A comparison of different techniques of viral detection. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 38(2):167-173.
- Sonis ST. 2009. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncol*. 45(12):1015-1020.
- Srikrishna G, Freeze HH. 2009. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia*. 11(7):615-628.
- Cruz AD, Cogo K, Bergamaschi Cde C, Boscolo FN, Groppo FC, Almeida SM. 2010. Oral streptococci growth on aging and non-aging esthetic restorations after radiotherapy. *Braz Dent J*. 21(4):346-350.
- Garra G, Singer AJ, Taira BR, Chohan J, Cardoz H, Chisena E, Thode HC, Jr. 2010. Validation of the wong-baker faces pain rating scale in pediatric emergency department patients. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine*. 17(1):50-54.
- Napenas JJ, Brennan MT, Coleman S, Kent ML, Noll J, Frenette G, Nussbaum ML, Mougeot JL, Paster BJ, Lockhart PB et al. 2010. Molecular methodology to assess the impact of cancer chemotherapy on the oral bacterial flora: A pilot study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 109(4):554-560.
- Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, Fujikado N, Kusaka T, Kubo S, Chung SH et al. 2010. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of th17 cell differentiation is essential for host defense against candida albicans. *Immunity*. 32(5):681-691.
- Sonis ST. 2010. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral diseases*. 16(7):597-600.
- Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. 2010. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 81(10):1488-1496.
- Thomas CM, Versalovic J. 2010. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut microbes*. 1(3):148-163.
- van Vliet MJ, Harmsen HJ, de Bont ES, Tissing WJ. 2010. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS pathogens*. 6(5):e1000879.
- Gaetti-Jardim EJ, Ciesielski FI, de Sousa FR, Nwaokorie F, Schweitzer CM, Avila-Campos MJ. 2011. Occurrence of yeasts, pseudomonads and enteric bacteria in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. *Braz J Microbiol*. 42(3):1047-1055.
- Kim J, Sudbery P. 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 49(2):171-177.
- Mitchell J. 2011. *Streptococcus mitis*: Walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol Oral Microbiol*. 26(2):89-98.
- Saijo S, Iwakura Y. 2011. Dectin-1 and dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol*. 23(8):467-472.

- Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12(6):R60.
- Sonis ST. 2011. Oral mucositis. *Anticancer Drugs.* 22(7):607-612.
- Alt-Epping B, Nejad RK, Jung K, Gross U, Nauck F. 2012. Symptoms of the oral cavity and their association with local microbiological and clinical findings-- a prospective survey in palliative care. *Support Care Cancer.* 20(3):531-537.
- Ames NJ, Sulima P, Ngo T, Barb J, Munson PJ, Paster BJ, Hart TC. 2012. A characterization of the oral microbiome in allogeneic stem cell transplant patients. *PloS one.* 7(10):e47628.
- de Mendonca RM, de Araujo M, Levy CE, Morari J, Silva RA, Yunes JA, Brandalise SR. 2012. Prospective evaluation of hsv, candida spp., and oral bacteria on the severity of oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Support Care Cancer.* 20(5):1101-1107.
- Elad S, Epstein JB, Raber-Durlacher J, Donnelly P, Strahilevitz J. 2012. The antimicrobial effect of iseganan hcl oral solution in patients receiving stomatotoxic chemotherapy: Analysis from a multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized, phase iii clinical trial. *J Oral Pathol Med.* 41(3):229-234.
- Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, Shimoda S, Iwasaki H, Shimono N, Ayabe T et al. 2012. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting paneth cell production of alpha-defensins. *Blood.* 120(1):223-231.
- Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, Liu C, West ML, Singer NV, Equinda MJ et al. 2012. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of experimental medicine.* 209(5):903-911.
- Kashiwazaki H, Matsushita T, Sugita J, Shigematsu A, Kasashi K, Yamazaki Y, Kanehira T, Yamamoto S, Kondo T, Endo T et al. 2012. Professional oral health care reduces oral mucositis and febrile neutropenia in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Support Care Cancer.* 20(2):367-373.
- Laheij AM, de Soet JJ, von dem Borne PA, Kuijper EJ, Kraneveld EA, van Loveren C, Raber-Durlacher JE. 2012. Oral bacteria and yeasts in relationship to oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Support Care Cancer.* 20(12):3231-3240.
- Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB et al. 2012. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 13(9):R79.
- Olczak-Kowalczyk D, Daszkiewicz M, Krasuska S, Dembowska-Baginska B, Gozdowski D, Daszkiewicz P, Fronc B, Semczuk K. 2012. Bacteria and candida yeasts in inflammations of the oral mucosa in children with secondary immunodeficiency. *J Oral Pathol Med.* 41(7):568-576.
- Panghal M, Kaushal V, Kadayan S, Yadav JP. 2012. Incidence and risk factors for infection in oral cancer patients undergoing different treatments protocols. *BMC Oral Health.* 12:22.
- Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, Huttenhower C, Izard J. 2012. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome



- based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome biology*. 13(6):R42.
- Sharma A, Rath GK, Chaudhary SP, Thakar A, Mohanti BK, Bahadur S. 2012. Lactobacillus brevis cd2 lozenges reduce radiation- and chemotherapy-induced mucositis in patients with head and neck cancer: A randomized double-blind placebo-controlled study. *European journal of cancer*. 48(6):875-881.
- Sonalika WG, Amsavardani Tayaar S, Bhat KG, Patil BR, Muddapur MV. 2012. Oral microbial carriage in oral squamous cell carcinoma patients at the time of diagnosis and during radiotherapy - a comparative study. *Oral Oncol*. 48(9):881-886.
- Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, Lee YJ, Dubin KA, Socci ND, Viale A et al. 2012. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 55(7):905-914.
- van der Beek MT, Laheij AM, Raber-Durlacher JE, von dem Borne PA, Wolterbeek R, van der Blij-de Brouwer CS, van Loveren C, Claas EC, Kroes AC, de Soet JJ et al. 2012. Viral loads and antiviral resistance of herpesviruses and oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone marrow transplantation*. 47(9):1222-1228.
- Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, Bateman E, Blijlevens N, Gibson RJ, Logan RM, Nair RG, Stringer AM, Yazbeck R et al. 2013. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*. 21(11):3233-3241.
- Chavan RS, Pannaraj PS, Luna RA, Szabo S, Adesina A, Versalovic J, Krance RA, Kennedy-Nasser AA. 2013. Significant morbidity and mortality attributable to rothia mucilaginosa infections in children with hematological malignancies or following hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric hematology and oncology*. 30(5):445-454.
- Elad S, Bowen J, Zadik Y, Lalla RV. 2013a. Development of the mascc/isoo clinical practice guidelines for mucositis: Considerations underlying the process. *Support Care Cancer*. 21(1):309-312.
- Elad S, Bowen J, Zadik Y, Lalla RV, Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral O. 2013b. Development of the mascc/isoo clinical practice guidelines for mucositis: Considerations underlying the process. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*. 21(1):309-312.
- Gurgan CA, Ozcan M, Karakus O, Zincircioglu G, Arat M, Soydan E, Topcuoglu P, Gurman G, Bostanci HS. 2013. Periodontal status and post-transplantation complications following intensive periodontal treatment in patients underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation conditioned with myeloablative regimen. *Int J Dent Hyg*. 11(2):84-90.
- Hu YJ, Shao ZY, Wang Q, Jiang YT, Ma R, Tang ZS, Liu Z, Liang JP, Huang ZW. 2013. Exploring the dynamic core microbiome of plaque microbiota during head-and-neck radiotherapy using pyrosequencing. *PLoS One*. 8(2):e56343.
- Lalla RV. 2013. The mascc/isoo mucositis guidelines update: Introduction to the first set of articles. *Support Care Cancer*. 21(1):301-302.

- Limaye SA, Haddad RI, Cilli F, Sonis ST, Colevas AD, Brennan MT, Hu KS, Murphy BA. 2013. Phase 1b, multicenter, single blinded, placebo-controlled, sequential dose escalation study to assess the safety and tolerability of topically applied ag013 in subjects with locally advanced head and neck cancer receiving induction chemotherapy. *Cancer*. 119(24):4268-4276.
- McGuire DB, Fulton JS, Park J, Brown CG, Correa ME, Eilers J, Elad S, Gibson F, Oberle-Edwards LK, Bowen J et al. 2013. Systematic review of basic oral care for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*. 21(11):3165-3177.
- Qutob AF, Allen G, Gue S, Revesz T, Logan RM, Keefe D. 2013. Implementation of a hospital oral care protocol and recording of oral mucositis in children receiving cancer treatment : A retrospective and a prospective study. *Support Care Cancer*. 21(4):1113-1120.
- Sonis ST. 2013. Oral mucositis in head and neck cancer: Risk, biology, and management. American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting.
- Wang Y, Zhou X, Xu X. 2013. Oral microbiota: An overlooked etiology for chemotherapy-induced oral mucositis? *J Formos Med Assoc*.
- Zhu LL, Zhao XQ, Jiang C, You Y, Chen XP, Jiang YY, Jia XM, Lin X. 2013. C-type lectin receptors dectin-3 and dectin-2 form a heterodimeric pattern-recognition receptor for host defense against fungal infection. *Immunity*. 39(2):324-334.
- Bhattacharya R, Xu F, Dong G, Li S, Tian C, Ponugoti B, Graves DT. 2014. Effect of bacteria on the wound healing behavior of oral epithelial cells. *PloS one*. 9(2):e89475.
- Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsrucker C, Koestler J, Peter K, Zhu W, Sporrer D, Hehlhans T, Kreutz M et al. 2014. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: Loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 20(5):640-645.
- Laheij AM, de Soet JJ. 2014. Can the oral microflora affect oral ulcerative mucositis? Current opinion in supportive and palliative care. 8(2):180-187.
- Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, McGuire DB, Migliorati C, Nicolatou-Galitis O, Peterson DE et al. 2014a. Mascc/isoo clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 120(10):1453-1461.
- Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, McGuire DB, Migliorati C, Nicolatou-Galitis O, Peterson DE et al. 2014b. Mascc/isoo clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 120(10):1453-1461.
- Ramchandani MS, Rakita RM, Freeman RV, Levy WC, Von Homeyer P, Mokadam NA. 2014. Total artificial heart as bridge to transplantation for severe culture-negative prosthetic valve endocarditis due to gemella haemolysans. *ASAIO J*. 60(4):479-481.
- Russi EG, Raber-Durlacher JE, Sonis ST. 2014. Local and systemic pathogenesis and consequences of regimen-induced inflammatory responses in patients with head and neck cancer receiving chemoradiation. *Mediators of inflammation*. 2014:518261.

- Touchefeu Y, Montassier E, Nieman K, Gastinne T, Potel G, Bruley des Varannes S, Le Vacon F, de La Cochetiere MF. 2014. Systematic review: The role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - current evidence and potential clinical applications. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 40(5):409-421.
- Andrade ME, Araujo RS, de Barros PA, Soares AD, Abrantes FA, Generoso SV, Fernandes SO, Cardoso VN. 2015. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. *Clinical nutrition*.
- Ciorba MA, Hallemeier CL, Stenson WF, Parikh PJ. 2015. Probiotics to prevent gastrointestinal toxicity from cancer therapy: An interpretive review and call to action. *Current opinion in supportive and palliative care*. 9(2):157-162.
- Laheij AM, van Loveren C, Deng D, de Soet JJ. 2015. The impact of virulence factors of porphyromonas gingivalis on wound healing in vitro. *Journal of oral microbiology*. 7:27543.
- Palm E, Khalaf H, Bengtsson T. 2015. Suppression of inflammatory responses of human gingival fibroblasts by gingipains from porphyromonas gingivalis. *Molecular oral microbiology*. 30(1):74-85.
- Ramla S, Sharma V, Patel M. 2015. Influence of cancer treatment on the candida albicans isolated from the oral cavities of cancer patients. *Support Care Cancer*.
- Stringer AM, Logan RM. 2015. The role of oral flora in the development of chemotherapy-induced oral mucositis. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 44(2):81-87.
- Vanhoecke B, De Ryck T, Stringer A, Van de Wiele T, Keefe D. 2015. Microbiota and their role in the pathogenesis of oral mucositis. *Oral Dis*. 21(1):17-30.
- Villa A, Sonis ST. 2015. Mucositis: Pathobiology and management. *Curr Opin Oncol*. 27(3):159-164.
- De Sanctis V, Bossi P, Sanguineti G, Trippa F, Ferrari D, Bacigalupo A, Ripamonti CI, Buglione M, Pergolizzi S, Langendjik JA et al. 2016. Mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and systemic therapies: Literature review and consensus statements. *Crit Rev Oncol Hematol*. 100:147-166.
- Heller D, Helmerhorst EJ, Gower AC, Siqueira WL, Paster BJ, Oppenheim FG. 2016. Microbial diversity in the early in vivo-formed dental biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 82(6):1881-1888.
- Jain M, Shah R, Chandolia B, Mathur A, Chauhan Y, Chawda J, Mosby S, Bhagalia S. 2016. The oral carriage of candida in oral cancer patients of indian origin undergoing radiotherapy and/or chemotherapy. *J Clin Diagn Res*. 10(2):ZC17-20.
- Patri S, Agrawal Y. 2016. Granulicatella elegans endocarditis: A diagnostic and therapeutic challenge. *BMJ Case Rep*. 2016.
- Vasconcelos RM, Sanfilippo N, Paster BJ, Kerr AR, Li Y, Ramalho L, Queiroz EL, Smith B, Sonis ST, Corby PM. 2016. Host-microbiome cross-talk in oral mucositis. *J Dent Res*.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Escala para Classificação de Mucosite Oral (OMS)

<b>OMS</b>	
<b>Grau 0</b>	Sem alterações
<b>Grau 1</b>	Dor e eritema
<b>Grau 2</b>	Eritema, úlceras, consegue comer sólidos
<b>Grau 3</b>	Úlceras, dieta somente líquida
<b>Grau 4</b>	Impossível se alimentar

APÊNDICE B – Comitê de Ética



**NYU Langone**  
MEDICAL CENTER

Date: February 20, 2014

**Protocol Review Monitoring Committee**  
PRMC Administrative Approval Letter

**NYU# 514-00082**

**PI:** Patricia Corby, DDS, MS

**Study Title:** ORAL CARE PROTOCOL FOR THE PREVENTION AND MANAGEMENT OF CHEMPOTHERAPY AND RADIATION THERAPY-INDUCED ORAL MUCOSITIS

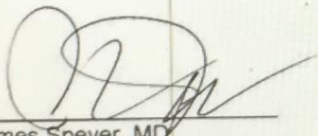
**Approved**, please forward to the Institutional Review Board.

**Deferred**, please address the below comments by \_\_\_\_\_.

**Rejected**, please address the below comments by \_\_\_\_\_.

Please forward this letter to your Regulatory Coordinator for submission to the IRB.

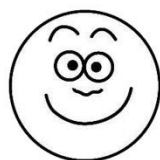
**Comments:**

Chairman PRMC:  \_\_\_\_\_  
James Speyer, MD

Date: 2/25/14

## APÊNDICE C – Escala de Dor Wong-Baker FACES

### Wong-Baker FACES® Pain Rating Scale



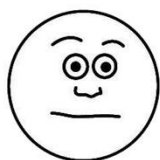
**0**

No  
Hurt



**2**

Hurts  
Little Bit



**4**

Hurts  
Little More



**6**

Hurts  
Even More



**8**

Hurts  
Whole Lot



**10**

Hurts  
Worst

[www.wongbakerFACES.org](http://www.wongbakerFACES.org)

©1983 Wong-Baker FACES® Foundation. Used with permission.

#### **NOTA:**

Explique aos indivíduos o que cada face representa em nível de dor:

Face 0 sem dor alguma.

Face 2 dói apenas um pouco.

Face 4 dói um pouco mais.

Face 6 dói ainda mais.

Face 8 dói muito.

Face 10 dói mais do que podemos imaginar, no entanto, você não precisa estar chorando para sentir esta dor.

“Escolha a face que melhor retrara a dor a qual esta sentindo”: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE D – Escala EORTC QLQ-C30 v3

<b>EORTC - QLQ-C30 (version 30)</b>					
<p>We are interested in some things about you and your health. Please answer all of the questions yourself by circling the number that best applies to you. There are no "right" or "wrong" answers. The information that you provide will remain strictly confidential.</p> <p>Please fill in your initials:                      Your birthdate (Day, Month, Year):                      Today's date (Day, Month, Year):</p>		<b>Not at all</b>	<b>A Little</b>	<b>Quite a Bit</b>	<b>Very Much</b>
<b>1</b>	Do you have any trouble doing strenuous activities, like carrying a heavy shopping bag or a suitcase?	1	2	3	4
<b>2</b>	Do you have any trouble taking a <u>long</u> walk?	1	2	3	4
<b>3</b>	Do you have any trouble taking a <u>short</u> walk outside of the house?	1	2	3	4
<b>4</b>	Do you need to stay in bed or a chair during the day?	1	2	3	4
<b>5</b>	Do you need help with eating, dressing, washing yourself or using the toilet?	1	2	3	4
<b>During the past week:</b>		<b>Not at all</b>	<b>A Little</b>	<b>Quite a Bit</b>	<b>Very Much</b>
<b>6</b>	Were you limited in doing either your work or other daily activities?	1	2	3	4
<b>7</b>	Were you limited in pursuing your hobbies or other leisure time activities?	1	2	3	4
<b>8</b>	Were you short of breath?	1	2	3	4
<b>9</b>	Have you had pain?	1	2	3	4
<b>10</b>	Did you need to rest?	1	2	3	4
<b>11</b>	Have you had trouble sleeping?	1	2	3	4
<b>12</b>	Have you felt weak?	1	2	3	4
<b>13</b>	Have you lacked appetite?	1	2	3	4
<b>14</b>	Have you felt nauseated?	1	2	3	4
<b>15</b>	Have you vomited?	1	2	3	4
<b>16</b>	Have you been constipated?	1	2	3	4

**EORTC - QLQ-C30 (version 30)**

<b>During the past week:</b>		<b>Not at all</b>	<b>A Little</b>	<b>Quite a Bit</b>	<b>Very Much</b>
<b>17</b>	Have you had diarrhea?	1	2	3	4
<b>18</b>	Were you tired?	1	2	3	4
<b>19</b>	Did pain interfere with your daily activities?	1	2	3	4
<b>20</b>	Have you had difficulty in concentrating on things, like reading a newspaper or watching television?	1	2	3	4
<b>21</b>	Did you feel tense?	1	2	3	4
<b>22</b>	Did you worry?	1	2	3	4
<b>23</b>	Did you feel irritable?	1	2	3	4
<b>24</b>	Did you feel depressed?	1	2	3	4
<b>25</b>	Have you had difficulty remembering things?	1	2	3	4
<b>26</b>	Has your physical condition or medical treatment interfered with your <u>family life</u> ?	1	2	3	4
<b>27</b>	Has your physical condition or medical treatment interfered with your <u>social activities</u> ?	1	2	3	4
<b>28</b>	Has your physical condition or medical treatment caused you financial difficulties?	1	2	3	4

**For the following questions please circle the number between 1 and 7 that best applies to you**

29. How would you rate your overall health during the past week?

1            2            3            4            5            6            7

Very poor

Excellent

30. How would you rate your overall quality of life during the past week?

1            2            3            4            5            6            7

Very poor

Excellent



**APÊNDICE E – Escala EORTC QLQ-H&N35**

**EORTC QLQ - HN35**

<b>During the past week:</b>		<b>Not at all</b>	<b>A Little</b>	<b>Quite a Bit</b>	<b>Very Much</b>
<b>31</b>	Have you had pain in your mouth?	1	2	3	4
<b>32</b>	Have you had pain in your jaw?	1	2	3	4
<b>33</b>	Have you had soreness in your mouth?	1	2	3	4
<b>34</b>	Have you had a painful throat?	1	2	3	4
<b>35</b>	Have you had problems swallowing liquids?	1	2	3	4
<b>36</b>	Have you had problems swallowing pureed food?	1	2	3	4
<b>37</b>	Have you had problems swallowing solid food?	1	2	3	4
<b>38</b>	Have you choked when swallowing?	1	2	3	4
<b>39</b>	Have you had problems with your teeth?	1	2	3	4
<b>40</b>	Have you had problems opening your mouth wide?	1	2	3	4
<b>41</b>	Have you had a dry mouth?	1	2	3	4
<b>42</b>	Have you had sticky saliva?	1	2	3	4
<b>43</b>	Have you had problems with your sense of smell?	1	2	3	4
<b>44</b>	Have you had problems with your sense of taste?	1	2	3	4
<b>45</b>	Have you coughed?	1	2	3	4
<b>46</b>	Have you been hoarse?	1	2	3	4
<b>47</b>	Have you felt ill?	1	2	3	4
<b>48</b>	Has your appearance bothered you?	1	2	3	4

EORTC QLQ - HN35					
During the past week:		Not at all	A Little	Quite a Bit	Very Much
49	Have you had trouble eating?	1	2	3	4
50	Have you had trouble eating in front of your family?	1	2	3	4
51	Have you had trouble eating in front of other people?	1	2	3	4
52	Have you had trouble enjoying your meals?	1	2	3	4
53	Have you had trouble talking to other people?	1	2	3	4
54	Have you had trouble talking on the telephone?	1	2	3	4
55	Have you had trouble having social contact with your family?	1	2	3	4
56	Have you had trouble having social contact with friends?	1	2	3	4
57	Have you had trouble going out in public?	1	2	3	4
58	Have you had trouble having physical contact with family or friends?	1	2	3	4
59	Have you felt less interest in sex?	1	2	3	4
60	Have you felt less sexual enjoyment?	1	2	3	4

EORTC QLQ - HN35					
During the past week:		YES		NO*	
61	Have you used pain-killers?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
62	Have you taken any nutritional supplements (excluding vitamins)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
63	Have you used a feeding tube?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
64	Have you lost weight?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
65	Have you gained weight?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## APÊNDICE F – Termo de Consentimento



Version Date: 4/23/2014

### Research Subject Informed Consent Form

---

<b>Title of Study:</b>	Oral Care Protocol for the Management of Chemotherapy and Radiation Therapy Induced Oral Mucositis  14-00082
<b>Principal Investigator:</b>	Patricia Corby Bluestone Center for Clinical Research NYU College of Dentistry 421 First Ave, 2W New York, NY 10010 (212) 998-9713
<b>Emergency Contact:</b>	Patricia Corby (212) 998-9713

---

#### 1. About volunteering for this research study

You are being invited to take part in a research study. Your participation is voluntary which means you can choose whether or not you want to take part in this study.

People who agree to take part in research studies are called "subjects" or "research subjects". These words are used throughout this consent form. Before you can make your decision, you will need to know what the study is about, the possible risks and benefits of being in this study, and what you will have to do in this study. You may also decide to discuss this study and this form with your family, friends, or doctor. If you have any questions about the study or about this form, please ask us. If you decide to take part in this study, you must sign this form. We will give you a copy of this form signed by you for you to keep.

#### 2. What is the purpose of this study?

The purpose of this study is to test an oral health protocol as a way to treat oral mucositis in patients undergoing cancer treatment and receiving radiation or chemoradiation. Many individuals receiving radiotherapy or chemoradiation experience painful sores in their mouth. This condition is called oral mucositis. There is no widely accepted treatment or prevention for this condition.

This study will test whether oral cleanings performed by dental care providers will reduce the severity, duration and pain of oral mucositis, and whether it changes the amount and type of bacteria in the mouth.

#### 3. How long will I be in the study? How many other people will be in the study?

This study will enroll 40 subjects total.

The length of this study will vary, depending on the type of radiotherapy or chemoradiation you will receive as well as the study group to which you are assigned. The average participant will attend approximately 10 visits over the course of approximately 4 months.

Approved For Period: 5/3/2014 - 3/27/2015

